

Tesis de Posgrado

Análisis de la interacción planta-virus mediante la caracterización molecular de plantas transgénicas que expresan proteínas de movilización de PVX

Kobayashi, Ken

2002

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Kobayashi, Ken. (2002). Análisis de la interacción planta-virus mediante la caracterización molecular de plantas transgénicas que expresan proteínas de movilización de PVX. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3437_Kobayashi.pdf

Cita tipo Chicago:

Kobayashi, Ken. "Análisis de la interacción planta-virus mediante la caracterización molecular de plantas transgénicas que expresan proteínas de movilización de PVX". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3437_Kobayashi.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Análisis de la interacción planta-virus
mediante la caracterización molecular de
plantas transgénicas que expresan
proteínas de movilización de PVX**

**Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires**

Ken Kobayashi

Director: Dr. Alejandro N. Mentaberry

**Instituto de Investigaciones en Ingeniería
Genética y Biología Molecular (CONICET)
Departamento de Ciencias Biológicas, FCEN-UBA**

2002

Nº 3437

Agradecimientos:

Sinceramente, tengo que agradecer a muchísimas personas. Espero no olvidarme de alguien, y si lo hago, sepan que no quise ser un desagradecido.

Fueron muchos años, aunque parece que fue ayer el día que empecé mi vida en el laboratorio. Y recuerdo muchas caras y muchos momentos. El Doctorado no me resultó simplemente una carrera de postgrado. Creo que aprendí, no solamente de biología, o mejor dicho, sobre un virus de papa en particular, sino también de muchas otras cosas. Lo que sí puedo confesar es que no aprendí como debiera, el arte de la escritura.

Quisiera agradecer en el primer lugar, a mi Director de tesis Dr. Alejandro Mentaberry. Sin su apoyo y esfuerzo, no hubiese sido posible concluir con este proyecto del Doctorado. Sinceramente, muchas gracias.

Muchas gracias al Dr. Fernando Bravo-Almonacid. Su ayuda fue invaluable. Fue una persona muy generosa conmigo, y sus consejos fueron un alivio durante los momentos de tormenta sobre mi mesada.

Quisiera no olvidarme de agradecer al Dr. Daniel Goldstein, quien me impulsó a seguir por este camino, y al Dr. Pablo Rabinowicz, quien fue mi primer Maestro en el arte de las pipetas.

Mil gracias a la Lic. Silvia Cabral, quien se encargó de la transformación vegetal, protoplastos, y muchas otras cosas más. Sin su ayuda, no habría ninguna planta transgénica ni Tesis.

Muchas gracias a la Dra. Gabriela Calamante. Gracias a su trabajo de muchos años y esfuerzo, hoy podemos contar con la facilidad de trabajar en muchas cosas, en especial la copia completa clonada del genoma de PVX. Personalmente, admiro enormemente las miles de horas de pipeteo y dedicación que ella tuvo durante su Doctorado.

Muchas gracias a la Dra. Ximena Ares. Aprendí muchas cosas de ella, mucho más de lo que ella se imagina. Casi todo lo que hice durante mi Doctorado fue tratar de imitar lo que ella hizo durante su Doctorado. Por eso, también fue una Maestra.

Agradezco a los “viejos” y a los “nuevos” del grupo papa. Muchas gracias, sobretodo, por aguantarme. Reconozco que a veces, soy una persona difícil. En especial a la Lic. Mercedes Rivero, por su ayuda y participación durante la transformación de papas y de tabaco.

Muchas gracias a los Dres. Hector Torres y Mirtha Flawia.

Muchas gracias a la gente del INGEBI. En especial al Dr. Jorge Muschiatti y a la Lic. Marcela Raíces, por las correcciones y críticas del paper.

Agradezco al Dr. Oscar Taboga de INTA-Castelar, por su ayuda en el tema de Baculovirus. A la Dra Sara Maldonado, por su ayuda en el tema de microscopía. A la Dra. Gabriela Levitus y al Lic. Sergio Ghio, por la ayuda que me brindaron con la vacuna de DNA. Muchas gracias al Dr. Tomás Santa-Coloma y al Lic. Michele Bianchini, por la ayuda y el asesoramiento en el tema de los *oligobodies*. Gracias a la Dra. Barrios Rendo de la empresa Biosidus, por su asistencia en la obtención de antisueros. También agradezco a los Dres. Catherine Sarrobert y Chirstophe Robaglia (CEA, Francia), por sus colaboraciones en el proyecto sobre la caracterización fisiológica de las plantas transgénicas.

Quisiera dar mis sinceros agradecimientos a la Universidad de Buenos Aires, al programa FOMEC, a la Fundación Antorchas, al INGEBI y a la empresa Biosidus. Y también a la Argentina.

A todos mis queridos, familiares, y amigos de siempre, muchas gracias.

Y a mi esposa Carolina que la amo.

Muchas gracias.

RESUMEN

pp. 1

INTRODUCCION GENERAL

pp. 3-24

1. Infección viral en plantas

1.1. Infección viral	3
1.2. Movilización viral	4
1.3. Proteínas de movilización	7
1.4. Los plasmodesmos	9
1.5. Alteraciones fisiológicas provocadas por la infección viral	12

2. Respuestas defensivas de plantas

2.1. Patología y síntomas	14
2.2. Sistemas defensivos de las plantas	15
2.3. Respuesta HR	16
2.4. Resistencia Sistémica Adquirida	17
2.5. Silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS)	18

3. Los Potexvirus

	20
3.1. Ciclo replicativo de PVX	21
3.2. Movilización de Potexvirus	23
3.3. Antecedentes de plantas transgénicas que expresan proteínas TGB	23

CAPITULO 1

INTRODUCCION

pp. 25-28

1. Funciones de la proteína p12

26

2. Localización subcelular de la proteína p12

27

OBJETIVOS

pp. 29

Producción de plantas transgénicas p12 y p8

pp. 30-50

1. Clonado de los genes ORF3 y ORF4 del PVX.	30
2. Obtención de plantas transgénicas p12	
2.1. Subclonados de ORF3 y ORF4 en el vector binario pBI121	31
2.2. Transformación vegetal mediante <i>A. tumefaciens</i>	32
2.3. Caracterización de las plantas transgénicas p12	33
2.4. Caracterización de las plantas transgénicas p8	35
3. Producción de antisueros anti-p12 y anti-p8	
3.1. Subclonados de los genes ORF3 y ORF4 en vectores de expresión bacteriana	36
3.2. Subclonado del ORF3 en un vector de expresión basado en baculovirus	37
3.3. Expresión de las proteínas p12 y p8 en células eucariotas sf9 mediante baculovirus recombinantes	39
3.4. Purificación e inoculación de las proteínas p12 y p8 para la obtención de antisueros	41
3.5. Expresión de la proteína p12 en la cepa BL24 de <i>E. coli</i>	42
3.6. Inmunización de ratones mediante inoculación de DNA	46
3.7. Expresión de la región hidrofílica de proteína p12 en células de <i>E. coli</i>	46
3.7. <i>Oligobodies</i>	46
4. Experimento de trans-complementación	
4.1. Construcción de una versión modificada de PVX mutada en el gen ORF3	48
4.2. Ensayos de infección con pPVX Δ p12 en plantas p12	49

Caracterización de la interacción plantas transgénicas p12 y PVX pp. 51-69

1. Alteraciones histológicas en plantas p12	51
2. Aparición de síntomas atípicos en plantas p12 infectadas con PVX	51
3. Resistencia a PVX en plantas transgénicas p12	54
4. Ensayos de replicación viral en protoplastos de plantas p12	56
5. Ensayos de infección con virus pertenecientes a otros grupos	57
6. Caracterización de la respuesta defensiva presente en las plantas p12	
6.1. Determinación del nivel de transcripto transgénico en presencia del virus	59
6.2. Ensayo de co-infección PVY-PVX en plantas p12	61
6.3. Ensayo de re-inoculación con PVX	63
7. Detección de marcadores bioquímicos asociados a la respuesta HR en plantas p12 infectadas por PVX	64
8. Inducción de genes PR en plantas p12 durante la infección con PVX	64
9. Ensayo de SAR en plantas p12	66
10. Determinación de la tasa de movilización viral célula a célula en plantas p12 infectadas con PVX	
10.1. Ensayo de inoculación localizada	68

DISCUSION pp. 70-80

CAPITULO 2

INTRODUCCION	pp. 81-84
1. Funciones de la proteína p24	81
2. Expresión de la proteína p24 en planta de tabaco	83
OBJETIVOS	pp. 85
RESULTADOS	pp. 86-96
1. Caracterización de plantas transgénicas p24	86
2. Acumulación de azúcares en plantas p24	89
3. Fotosíntesis en plantas p24	90
4. Síntesis de almidón en plantas p24	92
5. Contenido de nitratos en plantas p24	92
6. Análisis microscópico de los cloroplastos de plantas p24	93
7. Análisis de expresión de los genes fotosintéticos y defensivos en plantas p24	95
DISCUSION	pp. 97-102
CONCLUSIONES	pp. 103-105
MATERIALES Y METODOS	pp. 106-131
1. Líneas de plantas	106
2. Virus	106
3. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	107
4. Métodos de ingeniería genética	108
5. Plásmidos comerciales e iniciadores	108

6. Transformación de discos de hoja de tabaco	109
7. Rusticación de plantas y condiciones de crecimiento	109
8. Mediciones del peso promedio de callos transgénicos	110
9. Ensayo de actividad de NPT II	110
10. Análisis de segregación mendeliana del gen npt II	111
11. <i>Northern-blot</i>	111
Transferencia de RNA a membranas de Nylon	111
Hibridación	111
cDNAs utilizadas como sondas	111
12. <i>Southern blot</i>	112
13. Marcación de sondas por iniciación al azar de la polimerización	112
14. Electroforesis	113
Geles de agarosa nativos	113
Geles de agarosa con formaldehído	113
Electroforesis de proteínas	114
Electroforesis para secuenciación	115
15. <i>Western blot</i>	116
Antisueros utilizados	116
16. Extracción de proteínas	117
Método rápido	117
Método para determinar la concentración de proteínas totales	117
17. Transcripción <i>in vitro</i> utilizando la RNA polimerasa del fago T7	117
18. Cultivo y electroporación de protoplastos	119
Recuento de protoplastos viables utilizando diacetato de fluoresceína	120
19. Purificación de TMV	120
20. Ensayos de infección	121
21. Ensayos de ELISA	121
22. Muestras de hojas	122
Muestras de hojas en el experimento de inoculación localizada	122
23. Secuenciación	123
Secuenciación manual	123
Secuenciación automática	123
24. Inmunización de conejos	123
25. Inmunización de ratones con DNA plasmídico	124
26. Baculovirus	124
Líneas celulares	125

Co-transfecciones para generar baculovirus recombinantes	126
Ensayos de <i>dot-blot</i> para confirmar la producción de baculovirus recombinantes	126
Titulación del virus	127
27. Expresión de la proteína p12 en la cepa BL24 de <i>E. coli</i>	127
28. Observaciones microscópicas	128
29. Mediciones de parámetros fisiológicos	129
Mediciones de intercambio carbónico	129
Mediciones de los niveles de azúcares y nitrato	129
Mediciones de la emisión de fluorescencia de clorofila	130

BIBLIOGRAFIA

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
aa	Aminoácido
cDNA	DNA copia
cm	Centímetro
CP	Proteína de cápside (<i>coat protein</i>)
Da	Dalton
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DPI	Días post infección
DTT	Ditiotreitol
E	Eisntein
ER	Retículo endoplasmático
FD	Faradio
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
gRNA	RNA genómico
h	Hora
HR	Respuesta Hipersensible
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactósido
JA	Acido Jasmónico
kb	Kilo base
L	Litro
MBP	<i>Maltose binding protein</i>
MEL	<i>Mass exclusion limit</i>
min	Minuto
mg	Miligramo
MOPS	Acido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico
MP	Proteína de movimiento (<i>movement protein</i>)
MS	Murashigue-Skoog

NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nm	Nanómetro
NO	Oxido Nítrico
OAS	Origen de encapsidación (<i>origin of assembly</i>)
ORF	Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PD	Plasmodesmos
PF	Peso Fresco
PRs	<i>Pathogenesis-related proteins</i>
PTGS	Silenciamiento génico post-transcripcional
rpm	Revoluciones por minuto
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RUBISCO	Ribulosa bifosfato carboxilasa
SA	Acido Salicílico
SAR	Resistencia Sistémica Adquirida
SEL	Límite de exclusión (<i>size exclusion limit</i>)
sgRNA	RNA subgenómico
ssRNA	RNA simple cadena
TGB	Bloque triple de genes
μm	Micrómetro
vol	Volumen
wt	<i>Wild type</i>

NOMENCLATURA VIRAL

ABREVIATURA	VIRUS	GRUPO
AIMV	Alfalfa Mosaic Virus	Illarvirus
BMV	Brome Mosaic Virus	Bromovirus
BNYVV	Beet Necrotic Yellow Vein Virus	Furovirus
BSMV	Barley Stripe Mosaic Virus	Hordeivirus
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus	Caulimovirus
CMV	Citomegalovirus	Virus animal
FMV	Foxtail Mosaic Virus	Potexvirus
NMV	Nacissus Mosaic Virus	Potexvirus
PAMV	Papaya Mosaic Virus	Potexvirus
PLRV	Potato Leaf Roll Virus	Luteovirus
PVS	Potato Virus S	Carlavirus
PVM	Potato Virus M	Carlavirus
PVX	Potato Virus X	Potexvirus
PVY	Potato Virus Y	Potyvirus
RCNMV	Red Clover Necrotic Mosaic Virus	Dianthovirus
SqLCV	Squash Leaf Curl Virus	Geminivirus
TEV	Tobacco Etch Virus	Potyvirus
TMV	Tobacco Mosaic Virus	Tobamovirus
ToMV	Tomato Mosaic Virus	Tobamovirus
WCIMV	White Clover Mosaic Virus	Potexvirus

RESUMEN

Durante la primera etapa del presente trabajo, se transformaron *Nicotiana tabacum* con el gen ORF3 que codifica la proteína p12 de PVX, con el fin de estudiar los efectos que provoca la expresión de esta proteína viral en la interacción planta-virus. A pesar de que las plantas transgénicas mostraron un aspecto normal, observaciones hechas con el microscopio revelaron la presencia de alteraciones en sus hojas. Al infectar estas plantas con PVX, se observó en sus hojas la aparición de síntomas atípicos y el desarrollo de resistencia al virus. Los síntomas consistían en la formación de anillos amarillos concéntricos rodeados de tejido necrosado. Además, los mismos eran acompañados de cambios bioquímicos asociados a la respuesta hipersensible (HR), y no se formaban en plantas transgénicas sanas ni en plantas no transgénicas infectadas con PVX. No se observó una resistencia similar cuando las plantas p12 se inocularon con TMV o PVY, lo que sugirió la existencia de un mecanismo de resistencia específica contra PVX. A pesar de la aparición de síntomas de tipo HR, no se observó la inducción de una respuesta SAR en plantas p12 infectadas con PVX. Tampoco, se encontraron evidencias que indiquen la presencia de resistencia mediada por RNA.

Durante la segunda etapa del trabajo, se analizaron plantas transgénicas previamente transformadas con el gen ORF2 que codifica la proteína p24 de PVX, con el fin de estudiar las alteraciones fisiológicas provocadas por la expresión de la misma. Estas plantas mostraron una apariencia clorótica y un marcado enanismo. A pesar de poseer hojas más pequeñas, distancias internodales más cortas y reducción del tamaño en todos sus órganos, las plantas p24 poseían una relación de los tamaños tallo/raíz normal. Además, el tamaño de meristema radicular resultó más pequeño que el de las plantas control. Otros análisis revelaron que la tasa fotosintética estaba disminuida en las plantas p24 y que los niveles de almidón, tanto en las hojas como en las raíces, se encontraban reducidos. Además, las hojas mostraron un alto contenido de nitrato y una considerable acumulación de transcritos de proteínas PR. Varias líneas de evidencia sugieren que el fenotipo enano de las plantas p24 sería una consecuencia directa de la actividad de la proteína p24, y no un efecto indirecto de la disminución de la fotosíntesis o de los cambios metabólicos.

ABSTRACT

In the first part of the present work, *Nicotiana tabacum* were transformed with the PVX ORF3 gene coding for the p12 protein, with the aim of studying the effects provoked by its overexpression. Although the transgenic plants exhibited a normal morphological aspect, microscopic examination revealed extensive alterations in leaf tissue structure. After challenging with PVX, the transgenic plants showed resistance to PVX infection and formation of leaf symptoms consisting of concentric rings encircled by necrotic borders. These novel symptoms were accompanied by biochemical changes normally associated with the Hypersensitive Response (HR) and were absent in non-infected transgenic plants or in PVX-infected non-transgenic plants. No equivalent virus resistance was observed after inoculation with TMV or PVY, suggesting the presence of a specific resistance mechanism in p12 plants. Despite the development of HR-like symptoms, SAR was not induced in PVX-infected p12 transgenic plants. No evidence of an RNA-mediated resistance mechanism was found.

During the second part of this work, transgenic *N. tabacum* plants previously transformed with the PVX ORF2 gene coding the p24 movement protein were further analyzed with the aim of studying the physiological alterations provoked by viral MP. These plants exhibit a slightly chlorotic appearance and a pronounced stunted phenotype. Although p24 plants have smaller leaves, shorter internodes and reduced organs, their shoot to root ratio remained similar to that of control plants. Moreover, root meristems were smaller in p24 plants than in control plants. Further analyses of transgenic plants showed considerable reductions in photosynthetic rates and lower starch levels in both leaves and roots. In addition, p24 leaves showed higher nitrate levels and a significant accumulation of PRs transcripts. Different lines of evidence suggest that the stunted phenotype observed in p24 plants is a direct consequence of p24 activity and not an indirect effect derived from diminished photosynthesis or other metabolic changes.

INTRODUCCION GENERAL

INTRODUCCION GENERAL

1. Infección viral en plantas

1.1. Infección viral

Para que una infección viral se desarrolle exitosamente deben ocurrir las siguientes cuatro etapas en forma sucesiva: a) ingreso del virus en la célula vegetal, b) replicación del genoma viral, c) transporte viral de una célula a la otra hasta alcanzar el sistema vascular de la planta y, d) transporte sistémico o de larga distancia a través de los vasos y conductos floemáticos para permitir la invasión y el inicio de un nuevo ciclo infectivo en otros tejidos. Las cuatro etapas son fundamentales y necesarias para el desarrollo exitoso de la patogénesis, pero se cree que la más crítica es la movilización viral. Por ejemplo, se ha visto que ciertos virus, a pesar de tener la capacidad de replicarse en ciertas células, no pueden infectar determinados hospedadores debido a su incapacidad para moverse.

Numerosas evidencias señalan la participación de factores celulares en las distintas etapas del ciclo infectivo. Debido al reducido tamaño de los genomas de la mayoría de los virus vegetales (aproximadamente entre 5 a 10 kb), los mismos no contienen todos los genes necesarios para desarrollar el ciclo infectivo y expresar la patogenicidad. Por ello, como sucede comúnmente en este tipo de interacciones, los virus utilizan parte de la maquinaria bioquímica presente en la célula vegetal para multiplicarse en la misma. En los últimos tiempos, se descubrieron proteínas virales cuya función está regulada por distintos procesos celulares, tales como las modificaciones post-traduccionales, la distribución subcelular y los sistemas de degradación proteica. En el caso de una infección productiva, esta adaptación por parte del virus al ambiente intracelular del hospedador es definida, en términos de la fitopatología clásica, como compatibilidad genética. Debido a la diversidad de ambientes intracelulares que existen entre individuos de la misma especie, y aún, dentro de un mismo individuo, es explicable la existencia de virus que pueden infectar sólo a un determinado tipo de tejidos, o de virus que pueden infectar exclusivamente a un cierto grupo o género de plantas. Si el hospedador no aporta los requerimientos necesarios para sustentar el ciclo biológico de un patógeno particular, no habrá infección. Por ejemplo, si la

proteína de cápside de un determinado virus requiere de una etapa de fosforilación para liberarse del ácido nucleico viral y permitir su posterior replicación, y la célula infectada no expresa una kinasa capaz de reconocer a ésta proteína y fosforilarla, no se producirá la infección. En términos de la fitopatología clásica, esta interacción planta-patógeno se define como incompatible.

1.2. Movilización viral

Los mecanismos involucrados en el proceso de la movilización viral han comenzado a dilucidarse hace aproximadamente dos décadas, pero todavía no se conocen en detalle. Para que un virus pueda moverse de una célula a otra (en forma de virión o de complejo riboproteico) debe atravesar los canales intercelulares conformados por los plasmodesmos. Para ello, los virus vegetales hacen uso de proteínas de movilización codificadas por ellos mismos (Deom *et al.*, 1992). Un número creciente de evidencias indican la presencia de interacciones entre las proteínas de movilización con otras proteínas virales y del hospedador, ya sean citoplasmáticas o componentes de los plasmodesmos (Lucas y Gilbertson, 1994, Lazarowicz y Beachy, 1999). En particular, la interacción virus-plasmodesmo provee un modelo interesante para el estudio de las complejas interacciones entre la planta y el patógeno.

El estudio de la movilización viral es de gran interés tanto para la fitopatología como para la biología vegetal. El hecho de que los virus de plantas se movilicen en un tiempo muy corto desde la entrada a la célula, y la velocidad con que lo hacen, indica que los mismos utilizan canales de transporte preexistentes en las plantas. En caso contrario, el virus debería producir todos los elementos involucrados en el transporte, lo que le demandaría codificar en su genoma los genes encargados del proceso. Por otro lado, la expresión de estos genes llevaría un tiempo considerable que podría resultar incompatible con los tiempos de una infección. A partir estos datos y de las nuevas evidencias obtenidas en los estudios de movilización de virus y viroides (ver más adelante), se ha consolidado la idea de que los virus de plantas adquirieron la capacidad de moverse a partir de la utilización de los sistemas de transporte célula a célula y de larga distancia propios de las plantas (Xenocotle-Cázares *et al.*, 1999; Oparka *et al.*, 1999). Los virus de RNA podrían haber incorporado durante su co-evolución con las plantas, secuencias parciales o totales de mRNA correspondientes a las subunidades de los plasmodesmos o a componentes del huésped que intervengan en el tráfico de macromoléculas (Lucas y Wolf, 1993), adquiriendo de esta manera una ventaja selectiva. El gran número de genes de la planta que probablemente estén

involucrados en el tráfico a través de los plasmodesmos, y la extensa divergencia evolutiva a partir de esos ancestros comunes, podrían explicar la falta de similitud aparente entre las distintas MPs virales

Una de los primeros interrogantes en relación con la movilización viral se refería a los mecanismos por los que los virus lograban pasar de una célula a otra atravesando la pared celular. Una respuesta aparentemente obvia fue que el virus se desplazaba por los plasmodesmos. Sin embargo, el diámetro del poro de los mismos no era lo suficientemente grande para permitir el pasaje del virion y/o del ácido nucleico viral. Además, hoy se sabe que el plasmodesmo dista de ser un simple canal citoplasmático, y que se trata de una estructura compleja compuesta por membranas y proteínas (muchas de ellas aún desconocidas) distribuidas en distintos dominios. La comprensión del mecanismo de movilización viral ha sido y continúa siendo un desafío difícil de responder para muchos investigadores.

Las primeras evidencias sobre proteínas virales involucradas en el proceso de movilización se obtuvieron a partir de estudios realizados con la proteína p30 de TMV (Deom *et al.*, 1987, Wolf *et al.*, 1989, Citovsky, *et al.*, 1990, Ding *et al.*, 1992). Esta proteína, la primera caracterizada como una MP, es capaz de dilatar el poro de los plasmodesmos cuando se la expresa transitoriamente en células del mesófilo (mediante microinyección o biolística) o en plantas transgénicas. Además, se determinó que esta MP se une al ácido nucleico viral y es responsable de su transporte de una célula a otra. Desde entonces, se han identificado y estudiado las MPs de diferentes virus con resultados similares. La aplicación de diversas técnicas de estudio permitió proponer una serie de modelos para explicar el proceso de movilización viral dentro de la planta (Fig.1; Lucas y Gilbertson, 1994, Carrington *et al.*, 1996).

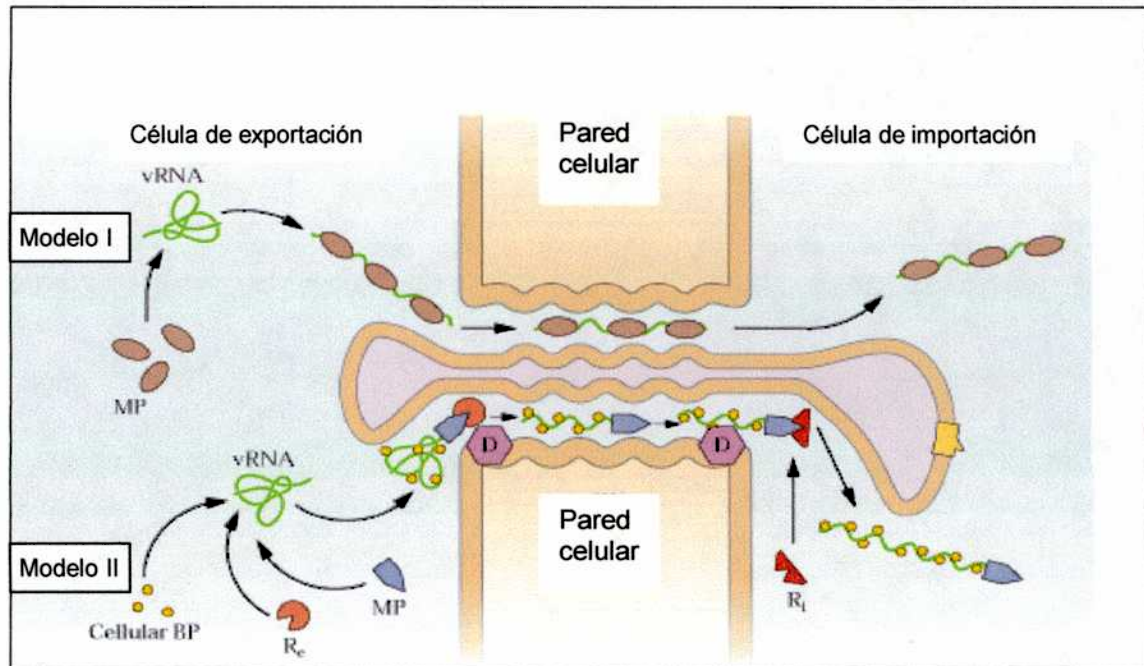


Figura 1. Dos modelos para explicar el transporte célula a célula del RNA viral (vRNA). Se cree que mecanismos similares operan en el transporte de proteínas y RNAs endógenos en plantas sanas. En ambos casos, es importante un primer paso de desnaturalización del vRNA. En el Modelo 1, la MP se une al vRNA y el complejo MP-vRNA se moviliza a través del plasmodesmo. En el modelo 2, se postula la participación de proteínas endógenas de planta (BP) junto con la MP viral. La BP y la MP conforman junto con el vRNA un complejo riboproteico que se desplaza por el plasmodesmo, probablemente unido a un receptor citosólico (R_e). Se postula la existencia de una proteína de anclaje (D) asociada al poro que estaría implicada en la dilatación del mismo, y/o en la desnaturalización del vRNA. Ilustración tomada de *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, ASPB (2000).

De acuerdo con el modelo de movilización más aceptado para TMV, la MP actuaría como una chaperona, que se une al ácido nucleico viral para dirigirlo hacia los plasmodesmos, guiándose para ello por elementos del citoesqueleto. Una vez alcanzados los plasmodesmos, la MP incrementaría el diámetro de los mismos para facilitar el pasaje del complejo hacia las células vecinas (McLean *et al.*, 1997, Heinelen *et al.*, 1995). En apoyo de este modelo, se ha detectado la presencia de MPs en los canales plasmodesmales de células infectadas en plantas de tabaco (Ding *et al.*, 1992a; Moore *et al.*, 1992). Más recientemente, se determinó la participación del retículo endoplasmático (ER) en la movilización viral. El llamado ER cortical interactuaría directamente con varias organelas, proteínas de citoesqueleto y componentes de membranas plasmáticas y pared celular (Staehelin, 1997). La posible participación del ER cortical durante la movilización viral se vincula con su asociación a las actinas y los desmotúbulos que conforman la estructura central de los plasmodesmos (Ding *et al.* 1992). Además, se ha demostrado que existe una

asociación específica entre la MP de TMV y el ER cortical durante el curso de la infección (Reichel y Beachy, 1998). Por otra parte, en estudios *in vitro* realizados con proteínas de fusión entre GFP y proteínas del bloque triple de los Hordeivirus y Potexvirus, se demostró que las proteínas TGB2 (ver más adelante) tienen una estrecha asociación con el ER en células de la epidermis (Solovyev *et al.* 2000). Se ha planteado la posibilidad de que los procesos de replicación y movilización viral estén acoplados mediante el ER, el que serviría como un carril entre las membranas asociadas al complejo de replicación y los plasmodesmos (Lazarowicz y Beachy, 1999; Huang y Zhang 1999; Reichel *et al.*, 1999).

En 2000 se aisló una proteína de la pared celular que se asocia específicamente con la MP de TMV y es necesaria para la movilización viral (Chen *et al.*, 2000; Dorokhov, *et al.*, 1999). Esa proteína, que actuaría como un receptor de la MP, es una pectina metilesterasa que se localiza en las paredes celulares y en los plasmodesmos. Los trabajos citados sugieren que la interacción entre la MP y esta enzima permite dirigir a la MP hacia los plasmodesmos. Alternativamente, esta interacción podría interferir con la actividad enzimática. Normalmente, la pectina metilesterasa interviene en el reciclaje de los componentes de la pared celular y en la regulación de la porosidad de la misma a través de la modulación del pH y del balance iónico (Nairn *et al.*, 1998). Por ende, los cambios en su actividad podrían resultar en alteraciones en la permeabilidad de los plasmodesmos.

Además del modelo “tipo tobamovirus” que utilizan el mecanismo descrito arriba, se conoce otro tipo de mecanismo de movilización viral de “tipo comovirus”, caracterizado por la formación de túbulos que atraviesan la pared celular. Entre los virus que utilizan este mecanismo, se incluyen los comovirus, caulimovirus, nepovirus y tospovirus. El transporte viral involucra la formación de túbulos conformados por MPs que atraviesan los plasmodesmos y que contienen partículas virales en su interior.

1.3. Proteínas de movilización

Generalmente se definen como proteínas de movilización virales a aquellas que son capaces de interactuar con los elementos de los plasmodesmos, modificar su estructura dilatando el diámetro de su poro, asociarse con el RNA viral y/o virion, y atravesar los poros para pasar de una célula a la otra. Al principio, las MPs fueron identificadas mediante estudios de mutagénesis dirigida de genomas de virus vegetales (Meshi *et al.*, 1987). Una demostración clara y elegante de las funciones de

la MP de TMV se realizó mediante la obtención de plantas transgénicas. Estas plantas, que expresaban constitutivamente la proteína p30, presentaban una dilatación constitutiva de sus plasmodesmos, lo que permitía la difusión pasiva de marcadores de alto peso molecular (Dextrano-FITC) entre células adyacentes (Wolf *et al.*, 1989). Se han realizado también mutagénesis dirigida en las MPs de varios virus para tratar de identificar sus dominios funcionales. Los efectos inducidos por MPs mutadas se estudiaron mediante dos métodos principales: a) el gen mutado se introdujo en plantas transgénicas para estudiar su capacidad de complementar un virus mutante defectivo en transporte; b) el gen mutado se introdujo en un clon infectivo de cDNA del virus en reemplazo del gen nativo. En el caso de la MP de TMV, sólo fue posible deletar hasta 55 aminoácidos del extremo C-terminal sin que perdiera su función (Berna *et al.*, 1991). En el caso de AIMV, mediante mutagénesis de la MP se pudo identificar un dominio necesario para la asociación de esta proteína con las paredes celulares de las plantas transgénicas (Erny *et al.*, 1992). En el caso de las proteínas TGB2 de WCIMV y PVX, cambios de secuencias en el dominio hidrofílico central de las proteínas las convierten en mutantes dominantes negativas (Beck *et al.*, 1994; Seppanen *et al.*, 1997).

En algunos grupos virales, además de la MP, la CP viral resulta indispensable para la movilización. Por ejemplo, en el caso de los Potexvirus, la CP viral también posee la propiedad de localizarse en los plasmodesmos y de asociarse con el gRNA para atravesar los mismos como un complejo de RNA y proteínas (Lough *et al.*, 2000). A pesar de reunir casi todas las propiedades de una MP, la CP de Potexvirus no es considerada como tal debido a que no es capaz de dilatar el poro del plasmodesmo (Oparka, *et al.*, 1997), lo que se considera una propiedad distintiva de las MPs.

En años recientes, se descubrieron proteínas endógenas de plantas que reunían todas las propiedades de la MPs. Entre estas proteínas pueden mencionarse a los factores de transcripción Knotted-1 de maíz y LEAFY de *Arabidopsis*, la proteína CmPP36 de calabaza y la tioredoxina h de arroz (Lucas *et al.*, 1995, Sessions *et al.*, 2000, Xoconostle-Cázares *et al.*, 1999, 2000, Ishiwatari *et al.*, 1998). Además, se identificaron decenas de proteínas endógenas en la savia floemática muchas de las cuales tenían la capacidad de dilatar los poros de los plasmodesmos y de moverse de célula a célula (Ruiz-Medrano *et al.*, 1999). Estas evidencias sugieren que los virus vegetales han adquirido sus funciones de movilización a partir de genes endógenos del hospedante. En favor de dicha hipótesis, se encontró una proteína endógena en el exudado del floema de calabaza que era reconocida por un antisuero específico contra

la MP del RCNMV. Dicha proteína se comportaba de manera muy similar a una MP viral, pudiendo promover su propia movilización y la de su mRNA entre células del mesófilo, así como movilizarse a larga distancia a través del floema (Xonocotle-Cázares *et al.*, 1999).

Como se mencionó antes, todas las MPs, tanto las endógenas de plantas como las virales, interactúan con elementos de los plasmodesmos. Sin embargo, las comparaciones de las estructuras primarias entre las MPs de plantas y de virus, así como entre MPs pertenecientes a distintas familias virales, mostraron que existe poca homología entre ellas. Hasta la fecha, no se halló ninguna secuencia consenso o dominio en común entre las MPs que han sido caracterizadas, lo que hace suponer que existe algún tipo de consenso conformacional compartido entre ellas.

A partir de estos estudios, se postuló un nuevo modelo de regulación en el que los plasmodesmos juegan un papel fundamental en el control de expresión génica durante el desarrollo vegetal regulando el intercambio de macromoléculas informativas (mRNA, proteínas y RNPs). Este nuevo concepto, propuesto por Lucas y sus colaboradores, postula que las plantas poseen una "organización supracelular órgano-independiente". Según este modelo, la planta logra integrar y coordinar los procesos fisiológicos que ocurren entre sus diferentes órganos mediante la propagación de moléculas de señalización a través de comunicaciones intercelulares (Crawford y Zambryski, 2000; Ruiz-Medrano *et al.*, 2001).

1.4. Los plasmodesmos

Numerosas evidencias indican que el tránsito de macromoléculas a través de los plasmodesmos se encuentra altamente regulado y que estos canales intercelulares juegan un papel fundamental en muchos procesos metabólicos y de desarrollo de la planta.

El plasmodesmo está constituido por una conexión tubular de membrana plasmática que atraviesa la pared celular y conecta dos células adyacentes. Esta conexión posee en su centro una extensión modificada del ER, el desmotúbulo, que se extiende a lo largo de la cavidad central del poro. De esta forma, el desmotúbulo conecta el ER de las células adyacentes. El centro del desmotúbulo es muy compacto, y entre éste y la membrana plasmática existe un espacio citoplásmico que conforma la denominada cavidad central. La mayor parte de esta cavidad está recubierta por proteínas que muy

probablemente están asociadas a la membrana plasmática y a la membrana del desmotúbulo. En las extremidades del plasmodesmo, la cavidad central y la manga citoplásmica terminan en una especie de cuello (región del cuello). En éste, como así también a lo largo de la cavidad central, se observan estructuras radiales que podrían estar involucradas en la regulación de la permeabilidad del canal (Fig. 2). Normalmente, los plasmodesmos permiten el pasaje pasivo de moléculas de hasta 1 kDa de tamaño (MEL < 1 kDa), dependiendo del tipo de células en que están localizados (estado abierto). Sin embargo, en su estado dilatado, permiten el pasaje de moléculas de hasta 50 kDa de tamaño.

Hasta la fecha, se han podido identificar muy pocas de las proteínas asociadas a los plasmodesmos debido a que, al encontrarse estrechamente unidas a las paredes celulares, su purificación resulta muy difícil. Entre las proteínas caracterizadas hasta ahora se halla una proteína de tipo conexina (*connexin-like*), similar a la conexina de los *gap-junctions* de tejidos animales, la actina, la microtubulina, la miosina, la carleticulina, la centrina, y una kinasa dependiente de calcio (CDPK, *calcium dependent protein kinase*) (White *et al.*, 1994; Yahalom *et al.*, 1998; Baluska *et al.*, 1999; Blackman *et al.*, 1999; Reichel *et al.*, 1999).

Los mecanismos involucrados en la dilatación o *gating* del poro plasmodesmal no han sido aún develados. En presencia de las MPs virales, dicho proceso se traduce en el aumento del MEL hasta alcanzar valores de 20-40 kDa. Se determinó que la dilatación del plasmodesmo es ATP-dependiente, lo que sugiere la ocurrencia de fosforilaciones en las proteínas implicadas en este proceso. En apoyo de esta idea, se purificó una CDPK asociada a la pared celular y se observó que la misma era capaz de autofosforilarse y de fosforilar a otras proteínas de la pared. Asimismo, se demostró que muchas de las MPs virales conocidas son fosforiladas en células de plantas. La MP de TMV se fosforila en protoplastos infectados (Watanabe *et al.*, 1992) y en reacciones *in vitro* (Citovsky *et al.*, 1993). Los sitios de fosforilación de esta proteína se encuentran dentro de los 10 aminoácidos del extremo C-terminal. Sin embargo, el papel que cumple la fosforilación en la función de las MP es todavía incierto. Bema *et al.* (1991) reportaron que es posible deletar uno de los residuos fosforilables sin que se pierda la función de movilización. Esto implicaría que la fosforilación no es esencial para la actividad biológica de estas MP, al menos en las condiciones en que fueron realizados los ensayos.

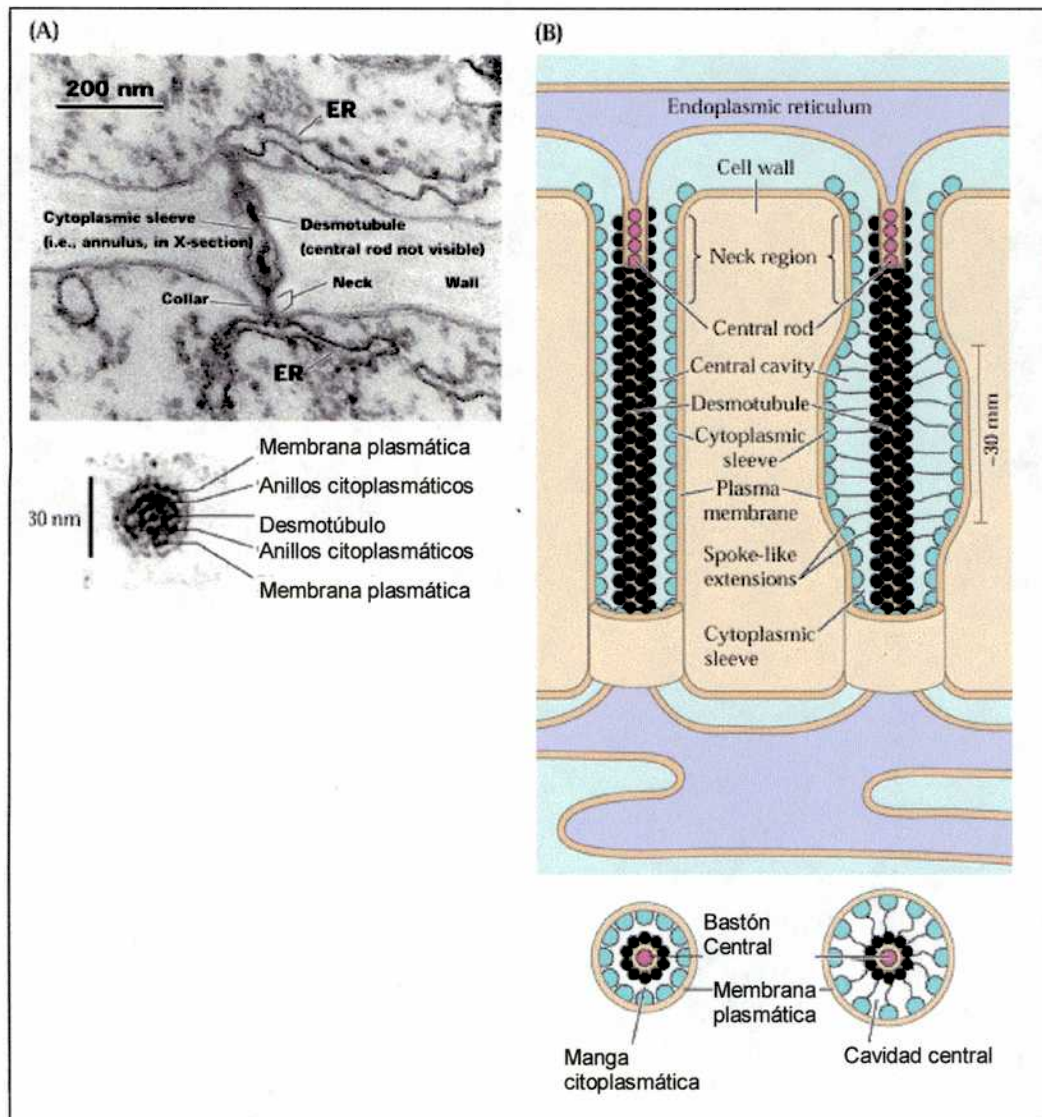


Figura 2. A) Microscopías electrónicas de un plasmodesmo en cortes longitudinal y transversal. B) Un modelo de la estructura del plasmodesmo. La membrana plasmática y el ER se continúan entre las dos células adyacentes. Tomado de *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, ASPB (2000). ER y *Endoplasmic reticulum*: retículo endoplasmático. *Cell wall*: pared celular. *Cytoplasmic sleeves*: manga citoplasmática. *Desmotubule*: desmotúbulo. *Neck region*: región del cuello. *Central rod*: bastón central. *Central cavity*: cavidad central. *Plasma membrane*: membrana plasmática. *Spoke-like extensions*: extensiones en forma de espículas. *Cytoplasmic annulus*: anillo citoplasmático.

Se observó que el citoesqueleto está efectivamente implicado en el *gating* de los plasmodesmos. Asimismo, se demostró que despolimerizando los filamentos corticales de actina mediante tratamientos químicos aumentaba el valor de MEL de los plasmodesmos. Uno de los candidatos más atractivos como motor en el proceso de *gating* de los poros es la miosina, una proteína dependiente de ATP que genera movimiento direccional y está asociada a la actina (Overall y Blackmann, 1996; Baluska *et al.*, 2001). Además, la MP de TMV co-localiza con los microtúbulos y en

menor medida con filamentos de actina en estudios de localización subcelular (Heinlein *et al.*, 1995; McLean *et al.*, 1995). A partir de estos datos, se propuso que las fibras del citoesqueleto actuarían como rutas para dirigir el complejo viral ribonucleoproteico, transportándolo hacia y a través de los plasmodesmos.

En un trabajo reciente se demostró que los plasmodesmos de las células del mesófilo de hojas modifican sus valores de MEL durante el pasaje de su condición de tejido importador (o sumidero) en la etapa joven a tejido exportador (o fuente) en el estado adulto de la hoja (Oparka *et al.*, 1999). Por ejemplo, las células de mesófilo de las hojas jóvenes de tabaco poseen plasmodesmos con valores de MEL de hasta 40 kDa, permitiendo que la proteína GFP expresada en floema ingrese a las células de mesófilo en forma pasiva. Por el contrario, los valores de MEL de los plasmodesmos de hojas exportadoras poseen valores de hasta 1 kDa. Esto sugiere que, las propiedades de los plasmodesmos dependen, entre otras cosas, de la edad de las hojas. Recientemente se comprobó que el estado fisiológico también influye en el estado de permeabilidad de los plasmodesmos y que en una hoja co-existen células con plasmodesmos “cerrados”, que no dejan pasar ninguna molécula; “abiertos”, que dejan pasar moléculas pequeñas de hasta 1 kDa; y “dilatados” que permiten el pasaje de moléculas grandes de hasta 30 a 60 kDa (Crawford y Zambryski, 2000).

1.5. Alteraciones fisiológicas provocadas por la infección viral

En todas las interacciones entre plantas y virus que resultan en la formación de síntomas visibles, como clorosis y necrosis, existen cambios en la morfología y en el metabolismo de los cloroplastos. Se conoce muy poco sobre los mecanismos moleculares responsables de la patología viral en plantas, pero se cree que la mayoría de los síntomas son consecuencia de las alteraciones metabólicas provocadas por la infección y no de la replicación viral *per se*. Tampoco se conoce mucho sobre estas alteraciones metabólicas, y sólo existen reportes aislados describiendo las alteraciones fisiológicas provocadas por ciertos virus. Por ejemplo, continua siendo una incógnita en qué medida participan los distintos componentes virales en la iniciación y el mantenimiento de las manifestaciones patológicas. Una mejor comprensión de los mecanismos de patogenesis contribuirá a entender las complejas interacciones que existen entre las plantas y los virus y a diseñar posibles estrategias para el control de estos últimos.

La severidad de los síntomas difiere entre las diferentes cepas de virus y es indicativa del grado de alteración de los cloroplastos. Los cambios fisiológicos provocados por una infección son muy variables y difíciles de estudiar debido a las complejas interacciones con el ambiente y con el virus (ver más adelante). Por este motivo, muchos estudios sobre el estrés provocado por las infecciones virales se concentran en evaluar los cambios observados en la fotosíntesis, y en las alteraciones estructurales y funcionales de los cloroplastos.

Debido a la propiedad inherente a las MPs virales de alterar la permeabilidad de los plasmodesmos, se ha postulado que la presencia de estas proteínas en la planta, ya sea durante una infección normal o como producto de transgenes, podría afectar directamente la fisiología vegetal. En teoría, la expresión de una determinada MP viral en una planta transgénica permitiría evaluar algunos de sus posibles efectos durante el proceso la infección, independientemente de los producidos por otras proteínas virales. Este enfoque ha sido utilizado previamente para tratar de establecer las funciones localizadas en las MPs virales. Por ejemplo, luego de transformar plantas de tabaco con el gen de la proteína p30 de TMV, se observaron alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y en la partición de los fotoasimilados (Lucas *et al.*, 1993; Olesinski *et al.*, 1995; Lucas y Wolf, 1999). En estas plantas, los niveles de sacarosa, glucosa, fructosa y almidón estaban más elevados en las hojas maduras “fuente”, y la relación de biomasa tallo/raíz estaba alterada. Además, se observó una menor tasa de exportación de los fotoasimilados en comparación con las plantas control (Olesinski *et al.*, 1995). Sin embargo, estas plantas no presentaban anomalías respecto de su capacidad fotosintética (Lucas *et al.*, 1993). En forma similar, se encontraron marcadas alteraciones en el contenido de azúcares de las hojas en plantas de tabaco transgénicas transformadas con el gen de la proteína p17 de PLRV. En este caso, también se determinó que había una disminución en la exportación de los fotoasimilados desde las hojas “fuente” hacia los vasos floemáticos, lo que provocó la acumulación de sacarosa y de almidón (Herbers *et al.*, 1997). Además, estas plantas mostraban un marcado enanismo, el que se presentaba acompañado de lesiones cloróticas y de necrosis en las hojas. Curiosamente, este fenotipo era muy similar al descrito en plantas transgénicas de tabaco en las que, expresando genes de enzimas tales como la pirofosfatasa inorgánica de *E. coli* o la invertasa de levadura, se habían provocado alteraciones importantes en la acumulación de azúcares (Sonnewald *et al.*, 1991; Sonnewald, 1992). La tasa fotosintética de las plantas p17 de PLRV era menor que la de las plantas control, y esto aparecía acompañado de una marcada disminución en los niveles de expresión de RUBISCO y de otras proteínas

fotosintéticas. En estas plantas también pudo detectarse la inducción de genes defensivos PR y, en probable relación con esto, se observó una relativa resistencia a PVY. Al analizar la ultraestructura de los plasmodesmos, se observó que aquellos que conectan las células acompañantes con los elementos del floema se encontraban alterados. A partir de esta evidencia, los autores postularon que las alteraciones halladas en los plasmodesmos de las células acompañantes producirían una disminución en la tasa de exportación de fotoasimilado. Ello conduciría a la acumulación de azúcares en las hojas y provocaría la represión de genes fotosintéticos (Krapp *et al.*, 1993; Krapp y Stitt, 1995) y la inducción de genes defensivos.

2. Respuestas defensivas en plantas

2.1. Patología y síntomas

Cuando una planta es susceptible a determinada infección viral, se enferma y, en la mayoría de los casos, desarrollan síntomas. Los síntomas pueden variar dependiendo de diversos factores, pero principalmente dependen del tipo o especie de patógeno en cuestión. Esto ha permitido que los fitopatólogos puedan desarrollar métodos para determinar y clasificar al/los patógenos presentes en la planta mediante la observación de los síntomas. Por otra parte, un determinado patógeno puede provocar diferentes síntomas dependiendo del hospedador que se encuentre infectando. En el caso de una infección provocada por una determinada especie viral, la misma puede provocar una variada gama de síntomas, muchas veces asociadas a la edad, el estado fisiológico, el estado nutricional, la temperatura, la humedad, y conjunto de otros factores abióticos que rodean a la planta. Estos datos demuestran que la infección viral es influenciada por los cambios fisiológicos y metabólicos que tienen lugar en las células. Al variar el ambiente que rodean a las mismas, el ambiente intracelular se modifica y, por consiguiente surgen cambios en el desarrollo del síntoma y de la infección viral. Por ejemplo, si se somete a plantas susceptibles a un determinado virus a un ambiente desfavorable, tal como temperatura elevada y falta de agua, la infección no progresa.

2.2. Sistemas defensivos en plantas

Un agente patogénico es aquél que posee la capacidad de invadir exitosamente a la planta y desencadenar el estado de enfermedad. Sin embargo, en muchos casos el estado patogénico no puede establecerse y, de hecho, la mayoría de las plantas y cultivos presentes en la naturaleza resultan inmunes a la mayoría de los patógenos. Esto se debe a que las plantas han desarrollado sistemas de defensa efectivos contra los diversos tipos de patógenos (hongos, bacterias, virus, nemátodos e insectos). En el caso de las infecciones virales, son de particular importancia los sistemas defensivos activados por el propio patógeno, los que comúnmente se agrupan bajo la denominación de resistencia inducida. Tanto este tipo de resistencia como la falta de adaptación de los virus a determinados ambientes celulares, constituyen casos de incompatibilidad genética entre planta y patógeno en los que no se produce el desarrollo de la enfermedad.

La activación de los mecanismos de resistencia requiere en primer lugar que la planta detecte la presencia del patógeno. Se sabe que, inmediatamente después del reconocimiento, ocurren distintos procesos celulares, tales como aperturas de canales iónicos en la membrana plasmática, fosforilación de proteínas, activación de enzimas involucradas en el metabolismo primario y secundario, y generación y propagación de moléculas de señalización, tales como ROS, SA, JA y NO. Posteriormente, siguiendo un esquema de expresión temporal y espacial precisamente coordinado, se inducen los genes que participan de las respuestas defensivas. De esta manera, una vez desencadenada la respuesta, se crea en la planta un ambiente desfavorable para el establecimiento del patógeno, éste es restringido espacialmente y, eventualmente, eliminado de la misma.

Los estudios realizados por Flor sobre cultivares de lino y distintas cepas de la roya de este cultivo en los años 40 del siglo pasado llevaron a definir los llamados genes de resistencia (R) y avirulencia (Avr) y a postular un modelo de relaciones genéticas para explicar el fenómeno de la resistencia inducida. En el modelo de "gen por gen" propuesto por Flor (1971), la resistencia sólo ocurre cuando la planta posee un gen R y el patógeno un gen de Avr, en ambos caso de tipo dominante. En términos moleculares, este modelo implica la existencia de dos productos génicos (o de productos derivados de ellos) que se reconocen en forma específica. En el caso de los virus de plantas, los productos de los genes Avr se corresponden con alguna de las proteínas virales, por lo que sus funciones normales son conocidas en la mayoría de

los casos. Por ejemplo, el gen de resistencia N de tabaco reconoce a la replicasa del virus TMV y este reconocimiento desencadena una respuesta HR. En el caso de PVX, se han identificados varios genes R en distintas especies de *Solanum*. Los mismos confieren resistencia a diferentes cepas de PVX, pero no a todas. Por ejemplo, los cultivares de papa que contienen a los genes Nb y Rx son resistentes a la cepa CP2 de PVX (Grupo II), pero son susceptibles a las cepas pertenecientes al patotipo HB (Fernandez-Northecote, *et al.*, 1990). En cambio los cultivares que contienen el gen Nx son resistentes a las cepas pertenecientes a los grupos I y III (Cockerham 1970). Se ha demostrado recientemente que el determinante de avirulencia para el gen Nb se encuentra localizado en la proteína p24 de PVX (Malcuit *et al.*, 1999). En cambio, para los casos de los genes Rx y Nx, el gen Avr viral es la CP (Kavanagh *et al.*, 1992; Santa Cruz y Baulcombe, 1993)

2.3. Respuesta HR

La HR se caracteriza por ser una respuesta temprana y rápida de reacciones defensivas asociadas con la muerte celular. En la mayoría de los casos, la HR esta asociada a la defensa mediada por los genes R. Existen al menos dos posibles mecanismos que llevan a la muerte celular, y por consiguiente, a la restricción de la dispersión del patógeno. En el caso en que participan los genes R, la necrosis de los tejidos infectados es generalmente consecuencia de la inducción de un mecanismo de muerte celular programada genéticamente regulado. Otro tipo de muerte celular puede producirse como consecuencia de las alteraciones metabólicas provocadas por la enfermedad, las que pueden inducir la sobreproducción de radicales libres, con los consiguientes efectos tóxicos para la célula.

Generalmente, el primer evento que sucede al reconocimiento del patógeno es la producción de ROS, entre las que se incluyen H_2O_2 y $O^{\cdot -}$. Aunque no se ha identificado aún a la enzima involucrada en la producción de H_2O_2 , se cree que por analogía con los sistemas animales, se trata de una NADPH oxidasa localizada en la membrana plasmática. Hasta la fecha se han postulado tres roles fundamentales para las ROS: en primer lugar, poseen un efecto tóxico directo sobre el patógeno. En segundo lugar, favorecen la polimerización de la lignina y el *cross-linking* de glicoproteínas y polisacáridos que componen la pared celular, todo lo cual conduce al fortalecimiento de la misma. En tercer lugar, las ROS actúan como moléculas de señalización que inducen la expresión de genes defensivos. Además de las ROS, durante el curso de la HR se producen también otras moléculas que participan de distintas cascadas de

transducción y que activan a factores de transcripción encargados de inducir la expresión de genes defensivos. Entre esas moléculas se cuentan SA, JA, NO, y hormonas como el etileno.

En los tejidos en donde se produce una HR, casi siempre se observan depósitos de callosa en las paredes celulares y en los poros de los plasmodesmos, lo que contribuye a detener el avance del patógeno. Se observa también una alta expresión de genes correspondientes a proteínas PR, las que en muchos casos poseen actividades enzimáticas involucradas en la degradación de componentes de las paredes celulares de los patógenos vegetales.

Las distintas moléculas de señalización y las proteínas defensivas pueden ejercer efectos sinérgicos o antagónicos durante la respuesta defensiva. Además, existen mecanismos de regulación por retroalimentación positiva y/o negativa, y se han recogido numerosas evidencias que indican la existencia de *cross-talk* entre las rutas de transducción de señales mediadas por distintas moléculas defensivas, lo que permitiría a la planta coordinar y regular la respuesta. Si no existiese este tipo de regulación fina en la respuesta, la misma resultaría en un fenómeno descontrolado que sería perjudicial para las plantas, ya que durante este proceso se producen numerosas sustancias tóxicas. Se han aislado plantas mutantes que carecen de dicha regulación en las que, en ausencia del patógeno, se producen lesiones necróticas en forma espontánea (Dietrich *et al.*, 1998).

Una característica particular de este tipo de respuesta defensiva es que no es específica contra un determinado patógeno. Por ejemplo, la respuesta de una planta frente a la infección por un virus abarca una extensa serie de compuestos y proteínas antimicrobianas, muchos de los cuales, como es el caso de las proteínas PR, no tienen efectos directos sobre la patogenia viral. Sin embargo, ciertos tipos de patógenos activan preferencialmente algunas rutas de transducciones de señalización (SA en el caso de virus, y JA en el caso de insecto), y los compuestos defensivos que se expresan pueden ser selectivamente mediado por unos u otros (PRs ácidas mediadas por SA; PRs básicas e inhibidores de proteasas mediados por JA y etileno).

2.4. Resistencia sistémica adquirida (SAR)

La SAR es una repuesta defensiva tardía y actúa en forma sistémica en toda la planta. Se induce luego de desencadenarse una respuesta defensiva local, asociada casi

siempre a una respuesta de tipo HR. La SAR se caracteriza por actuar en toda la planta, disminuyendo los síntomas y los efectos patogénicos de infecciones subsiguientes provocados por el patógeno original o por otros pertenecientes a otras especies y grupos. Por ende, es una respuesta inespecífica que convierte a muchas de las interacciones originalmente compatibles entre la planta y distintos patógenos en interacciones incompatibles. Se cree que es un mecanismo de defensa que evolucionó en la planta para impedir los continuos ataques provocados por los patógenos. Una vez establecida, la SAR puede durar varias semanas (Ross *et al.*, 1961). Se sabe que las plantas atacadas por patógenos producen señales químicas que no sólo inducen su propia SAR, sino que también, mediante la liberación de compuestos volátiles como metil salicilato y metil jasmonato, promueven el desarrollo de SAR en plantas vecinas (Dumer *et al.*, 1997).

Aún se desconocen los mecanismos íntimos que desencadenan la SAR en una planta. Por ejemplo, no se ha identificado todavía a la molécula que sirve como señal para inducir el desarrollo de SAR en los tejidos no infectados de la planta. Se sabe que la protección mediada por SAR depende de la producción de SA, aunque se desconoce la función específica de este compuesto en la misma. En los últimos años, se pudieron identificar genes involucrados en la inducción de SAR mediante estudios de plantas mutantes (Ryals, *et al.*, 1995). De entre ellos, el más estudiado es el gen *nim1/npr1*. En plantas mutantes de *nim1/npr1*, las proteínas PR no se expresan y la SAR no se induce luego de la infección por un patógeno. Sin embargo, estas plantas pueden desarrollar una respuesta defensiva local de tipo HR y acumular SA. Más recientemente se ha podido comprobar la participación de la kinasa MAPK4 (*mitogen-activated protein kinase*) en la iniciación de la SAR (Petersen *et al.*, 2000). Las MAPKs fueron identificadas originalmente como proteína-quinasas que participan de las cascadas de señalización del proceso de inducción de la mitosis en las células animales. En el trabajo citado se demostró que en plantas en que se disminuyó la expresión de MAPK4 mediante la producción de RNA antisentido, la SAR estaba constitutivamente activada, lo que sugiere que MAPK4 es un regulador negativo de esta respuesta.

2.5. Silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) o co-supresión:

El silenciamiento génico es un fenómeno que fue originalmente detectado en plantas transgénicas en las cuales se intentó sobreexpresar determinados genes. En ciertos casos, se observó que la transcripción de los mRNAs transgénicos no resultaba

afectada, pero que los mismos eran específicamente degradados por un mecanismo citoplasmático que involucraba RNAsas de la célula vegetal (Baulcombe 1996). Aunque también se ha observado silenciamiento génico a nivel transcripcional, la forma más común de este fenómeno ocurre a nivel post-transcripcional (PTGS). Un mecanismo similar a éste está involucrado en un tipo de respuesta defensiva específicamente inducida por patógenos virales. En este caso, el proceso de transcripción nuclear no es importante ya que, con pocas excepciones, la mayoría de las especies de virus vegetales se replican en el citoplasma y poseen genomas constituidos por RNA. Aunque los mecanismos responsables de activar el silenciamiento inducido por virus se desconocen, ciertas evidencias señalan que, cuando la cantidad de una determinada especie de RNA (como sería el caso de un genoma viral) supera un cierto umbral, la misma es detectada por la célula y degradada específicamente. Se sabe que en la activación del PTGS están involucrados RNAs aberrantes, RNAs de doble cadena y oligonucleótidos de RNA de 20 a 25 nt. Además, el PTGS se induce no sólo en la hoja infectada, sino también en los tejidos distales, lo que indica la presencia de una señal móvil capaz de transmitir y activar este proceso en el resto de la planta. Debido a la especificidad de esta respuesta, se cree que dicha señal involucraría a un RNA de secuencia complementaria a la del RNA silenciado.

Como una forma de contrarrestar esta respuesta defensiva, los virus vegetales recurren a distintas estrategias que aseguran su replicación y distribución por el hospedante. Muchos virus vegetales logran minimizar los efectos del PTGS mediante la replicación y movilización rápida de su propio genoma. Otros poseen proteínas que, además de cumplir funciones específicas durante la patogénesis, tienen la capacidad de suprimir la activación, la propagación y/o el mantenimiento del PTGS. Por ejemplo, este es el caso de las proteínas HC-Pro de PVY, p24 MP de PVX y 2b de CMV. Debido a la fuerte capacidad supresora de la proteína HC-Pro, las co-infecciones provocadas por PVY y PVX originan síntomas muy severos en las plantas afectadas. Se ha comprobado también que aquellas plantas que expresan la proteína HC-Pro, ya sean a partir de una infección o de un transgén, no pueden inducir el PTGS (Anandalakshmi *et al.*, 1997).

3. Los *Potexvirus*

El PVX es el miembro tipo del grupo de los *Potexvirus*. Las partículas virales son filamentosas y levemente flexuosas y miden entre 470 y 580 nm de largo y 11 a 13 nm de ancho. Cada virión contiene una molécula de RNA genómico de simple cadena de polaridad positiva cuyo peso molecular es de 2.1×10^6 Da (Bercks, 1976). La cápside viral está compuesta por monómeros de una única proteína de 25 kDa, dispuestos en un arreglo helicoidal. El RNA genómico de PVX tiene aproximadamente 6400 nucleótidos de longitud, está poliadenilado en el extremo 3' y contiene una estructura de tipo "CAP" (m^7Gppp) en su extremo 5' (Sonenberg *et al.*, 1978; Morozov *et al.*, 1981). El PVX-CP2 es un aislado obtenido en el Centro Internacional de la Papa (Lima, Perú) que se encuentra presente sólo en la región sudamericana. La secuencia completa del virus fue obtenida en INGEBI-CONICET (Orman *et al.*, 1990). El virus posee 5 ORFs organizados en un patrón altamente conservado. Los ORFs se numeran de 1 a 5 en dirección 5'-3' y codifican polipéptidos de 166 (ORF1), 24 (ORF2), 12 (ORF3), 8 (ORF4) y 25 kDa (ORF5), respectivamente. El producto del ORF 1 (comúnmente denominado "replicasa viral") juega un papel multifuncional en el proceso de replicación del virus y el ORF5 codifica la proteína de la cápside viral. Los ORFs 2, 3 y 4, comprendidos en el denominado TGB, codifican proteínas involucradas en el movimiento viral y tienen la característica de hallarse parcialmente superpuestos. La misma disposición de genes involucrados en el movimiento viral se encuentra en virus pertenecientes a los grupos de *Hordei*-, *Furo*-, y *Carlavirus*. Las proteínas codificadas por estos genes son genéricamente designadas como TGB1, TGB2 y TGB3 (Beck *et al.*, 1991, Gilmer *et al.*, 1992, Herzog *et al.*, 1998, Petty y Jackson 1990). La participación de las proteínas TGB en la movilización viral fue claramente demostrada en trabajos de mutagénesis dirigida (Beck *et al.*, 1991), así como en ensayos de trans-complementación entre virus defectivos en los genes TGB y en plantas transgénicas que expresan las respectivas proteínas (Bleykasten-Grosshans *et al.*, 1997; Morozov *et al.*, 1997; Verchot *et al.*, 1998; Lough *et al.*, 1998).

En PVX-CP2, el ORF2 codifica una proteína TGB1 de 24 kDa que contiene en su secuencia dominios conservados presentes en NTPasas y helicasas (Gorbalenya *et al.*, 1988; Rouleau *et al.*, 1994; Kalirina *et al.*, 1996, Wong *et al.*, 1998, Morozov, *et al.*, 1999). La TGB1 es considerada la MP viral pero, a diferencia de la MP de TMV, su actividad debe ser complementada por la presencia de la CP y de las proteínas TGB2 y TGB3. Estas dos últimas se consideran proteínas asociadas al proceso de transporte viral. Se han presentado evidencias que indican la existencia de interacciones

específicas entre TGB1, TGB2, y TGB3 durante el proceso de movilización (Solovyev, *et al.*, 1999; Yang *et al.* 2000; Lough *et al.*, 2000; Lawrence y Jackson, 2001) y se asume que TGB2 y TGB3 tendrían funciones reguladoras en el transporte viral. Sin embargo, no se ha podido definir la naturaleza de dichas interacciones.

Los ORFs 3 y 4 codifican las proteínas TGB2 y TGB3, respectivamente. La proteína TGB2 de PVX-CP (p12) posee un peso molecular de 12 kDa y la proteína TGB3 (p8) de 8 kDa (Morozov *et al.*, 1991, Kooning y Dolja, 1990; Zhou y Jackson, 1996). La p12 de PVX, tiene dos segmentos hidrofóbicos separados por una región de aminoácidos hidrofílicos. La proteína p8 contiene aminoácidos hidrofóbicos en su región N terminal que pueden formar una estructura secundaria de tipo α -hélice (Morozov *et al.*, 1987, 1989 y 1991). En experimentos de traducción *in vitro* de los ORF3 y 4 realizados con RNA viral, se observó que ambas proteínas permanecían asociadas a la fracción membranosa (Morozov *et al.*, 1990). La proteína p8 de PVX ha sido localizada en la pared celular y en la membrana plasmática de plantas infectadas y transgénicas (Hefferon *et al.*, 1997). Las mutaciones que anulan la expresión de los ORF3 y 4 no alteran la capacidad replicativa del virus en los protoplastos (Verchot *et al.*, 1998; Lough *et al.*, 1998).

3.1. Ciclo replicativo de PVX

La replicasa viral posee en la región C terminal, un dominio conservado que se encuentra normalmente en las RNA polimerasas dependientes de RNA (Haseloff *et al.*, 1984; Kramer y Argos, 1984). En la región media, la proteína presenta homología con secuencias presentes en helicasas bacterianas (Gorbalenya *et al.*, 1988), mientras que en la región N-terminal, se ubica una secuencia consenso de las metil-transferasas. La replicasa viral se encuentra asociada a la fracción membranosa correspondiente a las endomembranas de las células infectadas y se traduciría directamente a partir del gRNA del virus. Se asume que la replicasa, además de efectuar la replicación viral, participa del proceso de transcripción de los sgRNAs usando como molde el gRNA viral.

La expresión de los restantes ORFs se produce a partir de la traducción de los sgRNAs respectivos. En el caso de PVX, se producen 3 especies de sgRNAs poliadenilados que poseen el mismo extremo 3' co-terminal. Se han caracterizado secuencias conservadas corriente arriba de los ORFs 2 y 5 que conforman los respectivos promotores subgenómicos (Morozov *et al.*, 1990). El primer sgRNA se

produce a partir del promotor subgenómico ubicado corriente arriba del ORF2 y posee aproximadamente 2,1 kb. El segundo sgRNA abarca 1,4 kb y se transcribiría a partir de un promotor subgenómico comprendido en la secuencia del ORF2. Hasta hace poco, se tenían datos contradictorios sobre la existencia de este sgRNA debido a su bajo nivel de acumulación. Su existencia fue confirmada por Verchot *et al.* (1998). El tercer mRNA subgenómico comprende 0,9 kb y se produce a partir de un promotor subgenómico corriente arriba del ORF5. Al igual que el sgRNA de 2,1 kb, se acumula abundantemente en las células infectadas (Fig. 3).

El primer y tercer sgRNA sirven como templates para la traducción de la proteína p24 y de la CP viral, respectivamente. Durante la infección, ambas proteínas se acumulan en grandes cantidades. El segundo sgRNA serviría como un mensajero bicistrónico para la traducción de las proteínas p12 y p8. La traducción de la proteína p8 a partir de este sgRNA ocurriría mediante un mecanismo de iniciación por *leaky scanning* de los ribosomas. Según este modelo de traducción, los ribosomas de la planta reconocerían al codón de iniciación de la proteína p8 ignorando el codón de iniciación correspondiente a la proteína p12 que se encuentra corriente arriba. Se cree que de esta forma en la célula se traducirían aproximadamente tres moléculas de p12 por cada molécula de p8, ya que la traducción de la primera estaría favorecida respecto de la segunda. Sin embargo, no se tiene ningún dato directo acerca de la proporción en que se producen estas dos proteínas. Se piensa que esta estrategia de traducción permite regular los niveles de expresión entre estas dos proteínas virales y que ésta sería la causa de la alta conservación en la organización de los ORFs en los grupos de virus que poseen un TGB.

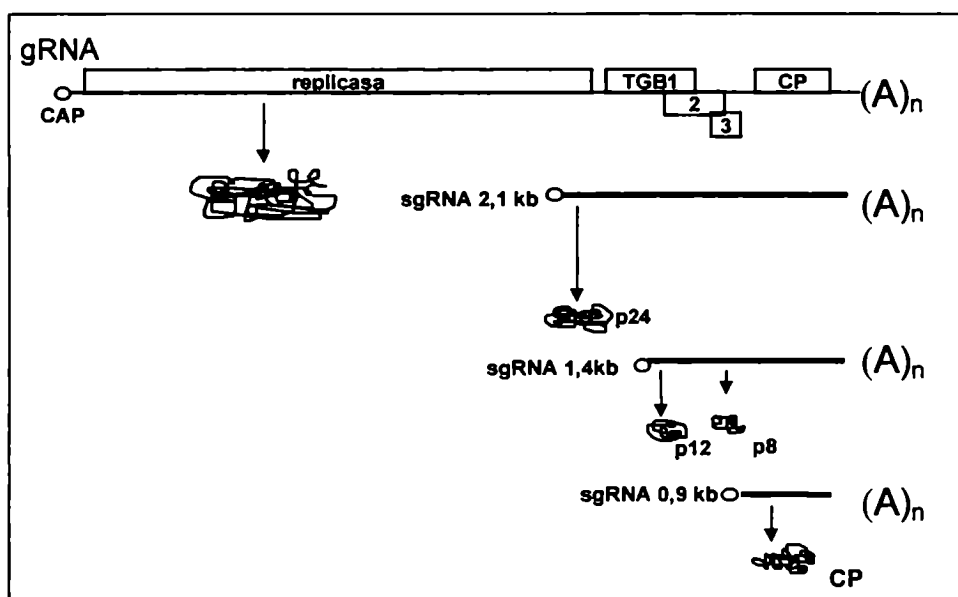


Figura 3. Esquema de organización genómica de PVX y de su estrategia de expresión génica.

3.2. Movilización de *Potexvirus*

La proteína TGB1 sería la responsable de dilatar los poros de los plasmodesmos y, junto con la CP, de transportar al genoma viral de una célula a la otra (Angell *et al.*, 1996; Lough *et al.*, 1998). Sin embargo, dichos resultados se obtuvieron a partir de ensayos realizando con microinyecciones de proteínas expresadas y purificadas de bacterias. Además, según un consenso alcanzado posteriormente a estos experimentos, la técnica de microinyección alteraría la fisiología celular (Itaya *et al.*, 1997), lo que pondría en duda las conclusiones previas obtenidas por este método. Actualmente, se tiende a utilizar el bombardeo con micropartículas recubiertas de DNA, RNA o proteínas para introducir estas moléculas en las células. En principio, esta técnica alteraría menos la fisiología celular, permitiendo estudiar la permeabilidad de los plasmodesmos independientemente de otros factores de estrés.

Resultados recientes obtenidos en el estudio de la movilización de WCIMV empleando técnicas de microbombardeo indican que la proteína TGB1 integraría un complejo molecular compuesto de gRNA viral, la p24 y la CP, y que ésta sería la forma de pasaje del virus de una célula a la otra (Lough *et al.*, 2000). Al contrario de lo propuesto inicialmente (Oparka *et al.*, 1999), este complejo tendría una composición distinta de la de un virión. Además, se obtuvieron evidencias indirectas de que las proteínas p12 y p8 no serían co-transportadas durante la movilización del virus. Según un modelo propuesto, las dos proteínas menores del TGB cumplirían papeles accesorios en el transporte intracelular del complejo. Se sugiere que ambas proteínas participarían en la movilización del complejo gRNA-p24-CP desde el sitio de formación del complejo hasta los plasmodesmos, posiblemente anclando dicho complejo a alguna estructura subcelular para finalmente estabilizarlo en los plasmodesmos (Lough *et al.*, 2000).

3.3. Antecedentes de plantas transgénicas que expresan proteínas TGB

Se han transformado decenas de plantas transgénicas con genes pertenecientes a distintas especies virales. En lo que se refiere al grupo de los *Potexvirus*, existen plantas de tabaco y de papa transformadas con cada uno de los 5 genes descritos en la sección anterior (Hefferon *et al.*, 1997; Ares *et al.*, 1998; Verchot *et al.*, 1998; Lough *et al.*, 1998).

En etapas anteriores, otros miembros de nuestro laboratorio de INGEBI-CONICET, obtuvieron plantas de tabaco y de papa que expresan la CP (Orman, comunicación personal; Bravo-Almonacid, comunicación personal), la MP p24 (Ares, 1997) y la replicasa (Calamante, 1998) de PVX. En el caso de las plantas transgénicas p24, se observó que las mismas eran resistentes a infecciones provocadas por *Tobamovirus* (TMV, y Ob), pero susceptibles tanto a infecciones provocadas tanto por PVX como por PVY (Ares *et al.*, 1998). Por otro lado, las plantas de papa transformadas con la CP de PVX resultaron resistentes, e incluso en algunos casos inmunes, a PVX. Tal como fuera descrito por otros (Register *et al.*, 1988; Negidat *et al.*, 1990), esta resistencia estaría operando mediante un mecanismo de protección mediada por CP.

Respecto de las plantas transgénicas que expresan las proteínas TGB2 y TGB3, se reportaron diferentes resultados. En un estudio realizado por Beck *et al.* (1994), una serie de plantas transgénicas que expresaban una versión de la proteína TGB2 de WCIMV mutada en el dominio hidrofílico resultó resistente a la infección por varias cepas de WCIMV, así como por PVX y PVS. Estos autores sugieren que la causa de dicha resistencia se debe a que la mutación introducida originaba una versión dominante negativa de la proteína TGB2, la que competía con la proteína producida por el virus. De la misma manera, al transformar plantas de papa con una versión de la proteína p12 de PVX mutada en su dominio hidrofílico se observó resistencia ante la infección con PVX, PAMV, PVS y PVM (Seppanem *et al.*, 1997).

Por otro lado, existen reportes de plantas transgénicas transformadas con los genes de las proteínas TGB2 y TGB3, o con los dos genes juntos, pero no se reportaron, cambios en la sintomatología, alteraciones fenotípicas de las plantas o algún tipo de resistencia (Beck *et al.*, 1994; Seppanem *et al.*, 1997). Debe recordarse que en ningún caso se pudo detectar la presencia de la proteína TGB2 en forma directa debido a la falta de anticuerpos apropiados. Por esta razón, en todos los trabajos con TGB2, la presencia de proteína viral funcional se dedujo en forma indirecta a través de ensayos de trans-complementación utilizando variantes mutadas de virus delecionadas en el TGB2 (Lough *et al.*, 1998, Verchot *et al.*, 1998).

CAPITULO 1

CAPITULO 1

INTRODUCCION

INTRODUCCION

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas TGB2 de virus pertenecientes a los géneros *Potexvirus*, *Hordeivirus*, *Carlavirus* y *Furovirus* exhiben una alta homología entre ellas (Morozov *et al.*, 1989). En todas las proteínas de este tipo existen dos regiones hidrofóbicas separadas por una región hidrofílica que muy probablemente representen dominios transmembrana (Morozov *et al.*, 1987, 1989; Beck *et al.*, 1991; Solovyev *et al.*, 1996). De hecho, la proteína p12 traducida *in vitro*, se localiza en la fracción membranosa (Morozov *et al.*, 1990 y 1991). La secuencia nucleotídica del gen de la proteína p12 de PVX y la traducción de su respectiva secuencia aminoácida se muestran en la la Fig. 4.

1 1	ATG	TCC	GCG	CAG	GGG	CAT	AGA	CTG	ACC	GCA	CCG	GTC	AAC	TCT	GAA
	M	S	A	Q	G	H	R	L	T	A	P	V			
	AAA	GTG	TAC	ATA	GTA	TTA	GGT	TTA	TCA	TTT	GCT	TTG	ATT	TCA	ATT
	ACT	TTC	CTG	CTT	TCT	AGA	AGT	AAC	TTG	CCT	CAC	GTC	GGG	GAC	AAT
				L	S	R	S	N	L	P	H	V	G	D	N
	ATC	CAC	AGC	CTA	CCA	CAC	GGG	GGA	GCC	TAC	AGG	GAC	GGC	ACA	AAG
	I	H	S	L	P	H	G	G	A	<u>Y</u>	<u>R</u>	<u>D</u>	G	T	K
	GCG	GTA	CTA	TAC	AAT	TCA	CCC	AAC	TTC	GGC	TCT	AGA	ACT	AGC	CTG
	A	V	L	Y	N	S	P	N	F	G	S	R	T	S	L
	AGC	AAC	GGC	AAG	AAC	GCA	GCC	TTC	GCT	GTT	GTG	CTT	TTG	CTG	TCG
	CTA	CTA	ATA	TAT	GGA	AGC	AGG	TGC	TTA	TCT	CAA	CGC	AAT	CAT	CTT
					G	S	R	C	L	S	Q	R	N	H	L
	TGT	GCT	TGT	GGC	AAC	AAT	CAT	AGC	AGT	CAT	TAG				
	C	A	C	G	N	N	H	S	S	H	*				

348

115

Fig. 4. Secuencia nucleotídica del gen de la proteína p12 de PVX y traducción de la respectiva secuencia aminoácida.

Los aminoácidos marcados en color verde indican los dominios hidrofóbicos que, según la predicción de estructuras secundarias, formarían a dos α -hélices típicas de dominios de transmembrana. Los residuos subrayados indican tres aminoácidos hidrofílicos que se encuentran presentes en todas las TGB2 y que, al ser modificados, origi-

nan una proteína mutante dominante negativa capaz de suprimir la movilización de los virus que poseen el mismo TGB (Beck *et al.*, 1991; Seppanen *et al.*, 1997). El color amarillo indica un aminoácido que podría ser glicosilado según las predicciones del programa de computación PSORT (*Prediction of Protein Localization Sites*, version 6.4 WWW). Según esta predicción, la p12 podría ser una proteína de membrana tipo IA (Klein *et al.*, 1985), con localización subcelular en la membrana plasmática o en el ER, aunque no podría descartarse completamente una posible localización en el lumen del ER o en el espacio extracelular. La proteína p12 posee también sitios consenso de miristoilación en distintos dominios de su secuencia. Sin embargo, se sabe que aquellos sitios que no se localizan en los primeros 10 aminoácidos de la proteína no son funcionales.

1. Funciones de la proteína p12

Las funciones específicas que cumple la proteína p12 durante la movilización viral no han sido aún develadas, como así tampoco la localización subcelular de la misma. Por otra parte, está claramente demostrado que la proteína p12 (y sus equivalentes en otros virus que poseen TGB) es indispensable para la movilización viral (Petty y Jackson, 1990; Beck *et al.*, 1991; Gilmer *et al.*, 1992; Lough *et al.*, 1998).

Recientemente, los investigadores Tamai y Meshi (2001) reportaron experimentos de infección de *Nicotiana benthamiana* con distintas versiones de PVX deficientes en la movilización, trans-complementadas con plásmidos conteniendo los genes de las proteínas p24, p12, p8, y CP. Paralelamente, se expresaron los genes de las distintas proteínas virales junto con el gen reportero GFP con el fin de determinar la capacidad de cada una de ellas para modular la dilatación de los plasmodesmos. La proteína GFP tiene aproximadamente 27 kDa de masa molecular relativa y se localiza normalmente en el citoplasma. Cuando los poros de los plasmodesmos se encuentran dilatados por alguna causa, la GFP logra difundir hacia las células vecinas. Sorprendentemente, estos autores llegaron a conclusiones opuestas a las reportadas por Lough *et al.*, (2000) y Yang *et al.*, (2000) (ver punto 3.2). En primer lugar, observaron que la GFP era capaz de difundirse fuera de la célula en que era inicialmente expresada sólo en presencia de la proteína p12 (ver Fig. 5). Además, hallaron que tanto la proteína p12 como la p24 eran capaces de trans-complementar la movilización de virus deletados en los respectivos genes a dos o tres células adyacentes a las transfectadas inicialmente. Esto sugiere que la proteína p12 no actuaría solamente a nivel intracelular,

tal como fue propuesto por otros autores (Lough, *et al.*, 2000; Solovyev *et al.*, 2000), si no que también participa en procesos intercelulares relacionados con la movilización viral. Finalmente, los mismos autores mostraron que la presencia de la proteína p8 no era indispensable para la movilización viral, sino que modularía la función de la proteína p12 durante este proceso (Tamai y Meshi, 2001).

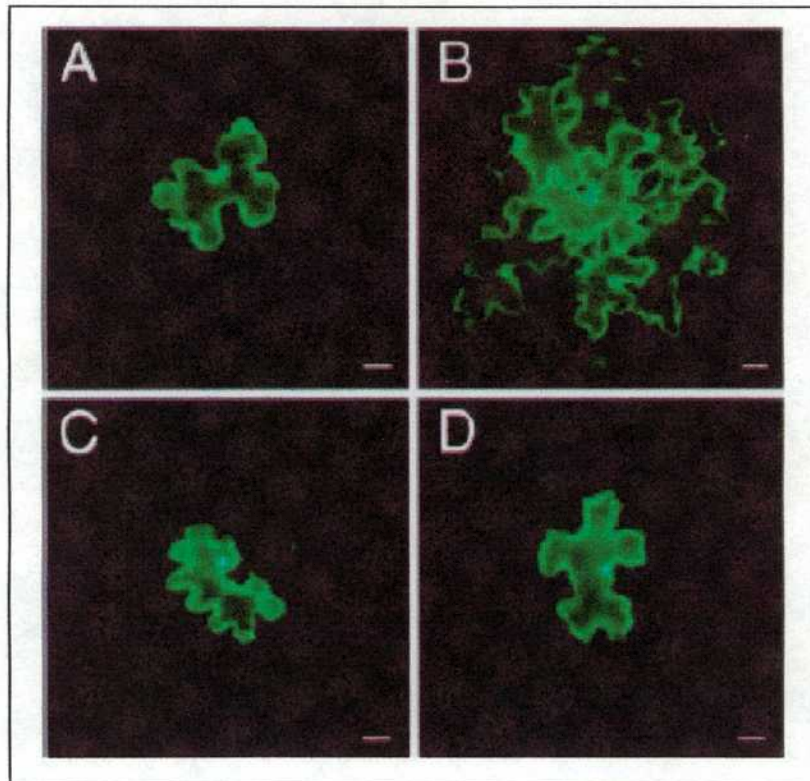


Figura 5. Experimento para determinar la capacidad de distintas proteínas de PVX en incrementar el valor del MEL plasmodesmal en células de tabaco co-bombardeadas con un plásmido conteniendo el gen de GFP citosólico y plásmidos que permiten expresar: A: la proteína p24. B: la proteína p12. C: la proteína p8. D: la CP viral. Como se observa en B, la proteína p12 es capaz de incrementar el MEL de los plasmodesmos y permitir la difusión pasiva de GFP hacia células vecinas. Las fotos fueron tomadas 24 horas después del bombardeo. Barra = 25 μ m. Tamai A y Meshi T. (2001). *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 1158-1167

2. Localización subcelular de la proteína p12

Hasta el momento no se ha logrado producir antisueros específicos contra la proteína p12 de PVX o contra las proteínas homólogas de otros *Potexvirus*. Se cree que el principal impedimento para lograr esto radica en la alta toxicidad que presenta la proteína p12 en la mayoría de los sistemas de expresión bacterianos. Por otro lado, se sabe que la cantidad de proteína que se expresa durante la infección viral es muy ba-

ja, lo cual dificulta aún más su detección y purificación. Existe una sola referencia en la literatura en que se reporta la obtención de antisueros contra esta proteína y su detección en extractos de plantas infectadas (Price, 1992), pero estos resultados no han podido ser reproducidos.

Los datos disponibles sugieren que la proteína p12 se localizaría en los plasmodesmos durante el transporte viral. En un trabajo previo se observó que la proteína de fusión p12/GFP se localizaba en estructuras endomembranas, probablemente el ER (Solovyev *et al.*, 2000). Cuando esta misma fusión se co-expresó junto con la proteína p8, esta localización se modificó para concentrarse en sectores discretos próximos a la membrana plasmática, muy probablemente en la cercanía de los plasmodesmos. No se han obtenido evidencias de una interacción directa entre las proteínas p12 y p8 durante el proceso de re-localización de la primera. Aunque el significado de este cambio de localización de la proteína p12 permanece incierto y el mecanismo implicado se desconozca, algunos indicios sugieren que formaría parte del proceso de transporte del complejo RNA-CP-p24 hacia los poros de los plasmodesmos. En apoyo de esta hipótesis, Erhardt *et al.* (1999) mostraron que, en presencia de las otras proteínas del TGB, una fusión de la proteína TGB1 de un furovirus con la proteína GFP se localizaba en puntos discretos cerca de la pared celular. En forma similar, Lawrence y Jackson (2001), transfectaron protoplastos con una fusión de la proteína TGB1 de un hordeivirus con GFP y observaron una localización subcelular de TGB1 en puntos discretos de la membrana plasmática que dependía de la presencia de otras proteínas del TGB.

Para poder construir un modelo del mecanismo de movilización de PVX, sería necesario determinar exactamente la localización de la p12 durante la infección viral. Este enfoque permitiría caracterizar aquellas proteínas endógenas (muy probablemente proteínas del plasmodesmo) implicadas en el proceso de movilización viral y aportar mayores conocimientos acerca del funcionamiento de los plasmodesmos.

CAPITULO 1

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo general de la primera parte del trabajo de Tesis fue evaluar el efecto de la expresión de los genes correspondientes a las proteínas p12 y p8 de PVX en plantas transgénicas. Con este fin, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1) Obtener plantas transgénicas que expresen los genes de las proteínas p12 y p8. Caracterizar el nivel de expresión y el número de copias de los transgenes en las líneas transgénicas obtenidas.
- 2) Evaluar los efectos de la expresión de la proteína p12 en la patogenia viral.
- 3) Evaluar el posible establecimiento de resistencia antiviral en las plantas transgénicas p12.
- 4) Estudiar posibles alteraciones fenotípicas provocadas por la expresión de la p12 en las plantas transgénicas.
- 5) Expresar y purificar las proteínas p12 y p8 para su utilización en la producción de anticuerpos.

CAPITULO 1

RESULTADOS

Producción de plantas transgénicas **p12 y p8**

Producción de plantas transgénicas p12 y p8

1. Clonado de los genes ORF3 y ORF4 del PVX

Hace aproximadamente 10 años, se obtuvo en el laboratorio un clon denominado 5X41 a partir de una biblioteca de cDNA del genoma de PVX-CP2 (Orman *et al*, 1990; GeneBank Accession N° X55802) que contiene en su secuencia parte del gen de la replicasa viral (ORF 1), los genes del bloque triple (ORFs 2, 3, y 4), y el gen de la CP (ORF 5). Posteriormente, la Dra. Ares subclonó las secuencias correspondientes a los ORFs 3 y 4 a partir del clon 5X41 en el vector comercial TA. Para tal fin, se habían diseñado cuatro oligonucleótidos iniciadores con el objeto de amplificar los fragmentos de DNA correspondientes a los ORFs 3 y/o 4 mediante la técnica de PCR (Fig. 6). Para facilitar los pasos de subclonado posteriores y favorecer la traducción proteica en plantas, se incluyeron en las secuencias de los iniciadores sitios de reconocimientos para las enzimas de restricción y la secuencia AACAA en la posición adyacente al codón de iniciación de los oligonucleótidos a y c (ver Materiales y Métodos). De esta forma se obtuvieron, tres clones recombinantes conteniendo los fragmentos correspondientes a los ORF3 y/o 4. El vector que contenía al ORF3 se denominó pTAA, el que contenía al ORF4, pTAC4, y el que incluía los ORFs 3 y 4, pTAB5. Todos los genes clonados fueron secuenciados completamente para confirmar la ausencia de mutaciones que pudieran haberse introducido durante el proceso de amplificación. Se descartó al clon pTAA porque se encontraron cambios en algunas bases respecto de la secuencia del ORF3. Se decidió utilizar a los clones pTAB5 y pTAC4 como fuentes de las secuencias respectivas (ver Sección 2-1).

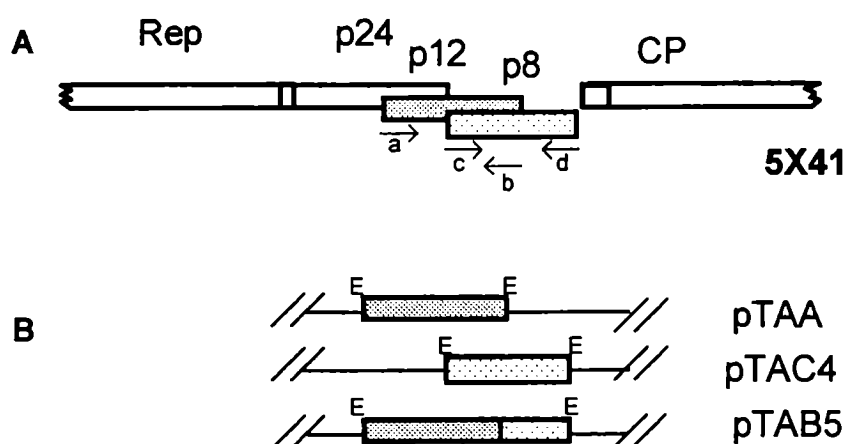


Fig. 6. Esquema del clonado de los ORFs 3 y 4. A) Esquema del clon 5X41. B) Esquema de los clones recombinantes. Se indican los fragmentos de PCR obtenidos a partir del clon 5X41 y subclonados en el vector TA. Para la amplificación del fragmento correspondiente al ORF3 se utilizaron los iniciadores a y b, para el fragmento ORF4 se utilizaron los iniciadores c y d, y para el fragmento ORFs 3 y 4 se emplearon los iniciadores a y d, respectivamente. E: sitio de restricción para la enzima Eco RI.

2.1. Subclonados de ORF3 y ORF4 en el vector binario pBI121

Uno de los principales objetivos de la Tesis fue la obtención de plantas de tabaco transgénicas que expresaran a la proteína p12 de PVX. Con tal fin, se subclonó la secuencia del ORF3 proveniente del clon pTAB5 en el vector binario pBI121 como se muestra en la Fig. 7A. El proceso del subclonado se detalla en la leyenda de la figura. El clon resultante, denominado pBI12a, se utilizó para transformar células de *A. tumefaciens*, las que luego se utilizaron para introducir al gen ORF3 en el genoma vegetal bajo el promotor constitutivo p35S. De la misma manera, se subclonó el ORF4 a partir del clon pTAC (Fig. 7B)

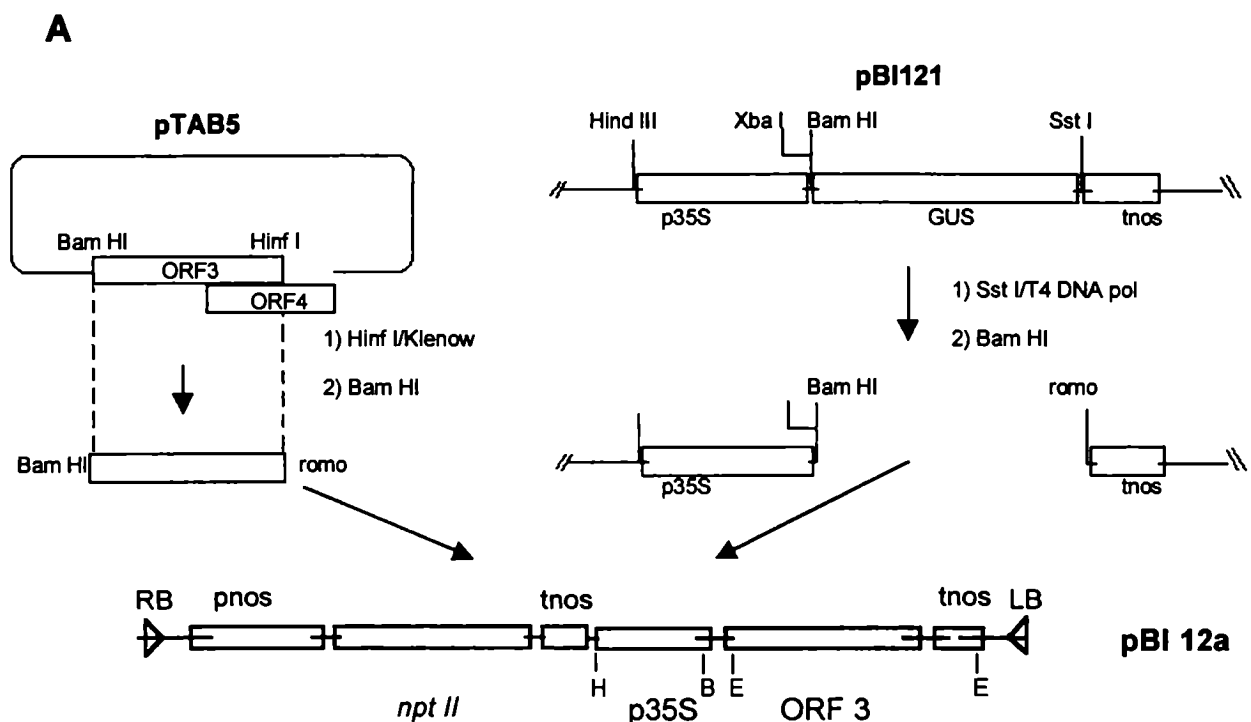


Fig. 7A. Esquema de los pasos de clonado para el vector pBI12a. La secuencia correspondiente al ORF3 fue liberada a partir del clon pTAB5, mediante sucesivas digestiones con las enzimas *Hinf* I (este extremo fue convertido en la forma romo con la DNA polimerasa I fragmento Klenow) y *Bam* HI. Luego, el inserto fue subclonado directamente en el vector pBI121 sucesivamente tratado con las enzimas *Sst* I más DNA polimerasa T4 (convertido en romo) y *Bam* HI. LB y RB: bordes izquierdo y derecho del T-DNA. pnos: promotor del gen de la nopalina sintetasa. *npt II*: gen de la neomicina fosfotransferasa, p35S: promotor del transcripto de 35S del CaMV. tnos: terminador del gen de la nopalina sintetasa. Los sitios de restricción del pBI12a están indicados como H: *Hind* III; B: *Bam* HI; E: *Eco* RI.

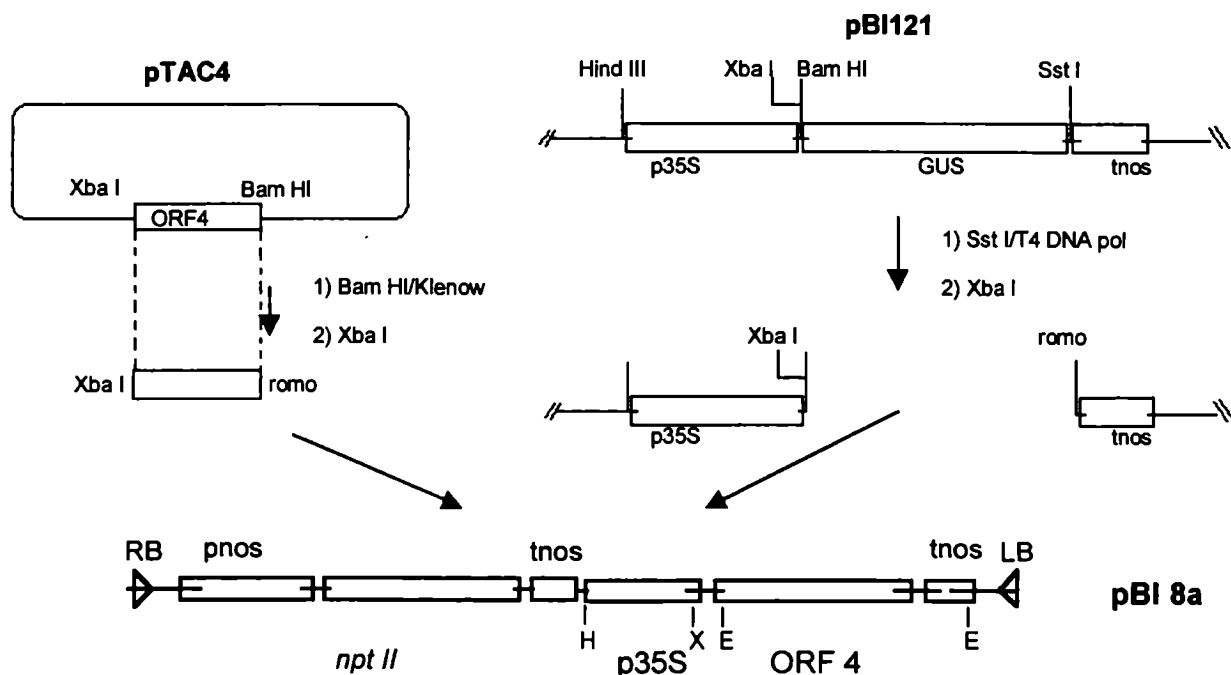


Fig. 7B. Esquema de los pasos de clonado para el vector pBI8a. La secuencia correspondiente al ORF4 fue liberada a partir del clon pTAC4, mediante sucesivas digestiones con las enzimas Bam HI (este extremo fue convertido en la forma romo con la DNA polimerasa I fragmento Klenow) y Xba I. Luego, el inserto fue subclonado directamente en el vector pBI121 sucesivamente tratado con las enzimas Sst I más DNA polimerasa T4 (convertido en romo) y Xba I. LB y RB: bordes izquierdo y derecho del T-DNA. pnos: promotor del gen de la nopalina sintetasa. *npt II*: gen de la neomicina fosfotransferasa, p35S: promotor del transcripto de 35S del CaMV. tnos: terminador del gen de la nopalina sintetasa. Los sitios de restricción para las enzimas del pBI8a están indicados como H: Hind III; X: Xba I; E: Eco RI.

2.2. Transformación vegetal mediante *A. tumefaciens*

Se co-cultivaron explantos de hojas de tabaco *N. tabacum* Xanthi D8 NN crecidas *in vitro*, con un cultivo saturado de *Agrobacterium* conteniendo el plásmido pBI12a (ver Materiales y Métodos). Después de la incubación, los explantos fueron transferidos a un medio conteniendo kanamicina como agente de selección de callos transgénicos. Posteriormente, se transfirió un solo brote (o callo) por explanto de hoja a otro medio de crecimiento para desarrollar plántulas, favoreciendo así la selección de eventos de transformación independientes. Luego de 2 a 3 meses, los callos se diferenciaron en plántulas y las mismas fueron finalmente individualizadas para ser designadas como líneas transgénicas. Se procedió de la misma forma para la obtención de líneas transgénicas de plantas p8. En este caso, la incubación se realizó utilizando un cultivo saturado de *Agrobacterium* conteniendo el plásmido pBI8a.

Se seleccionaron en total 20 líneas transformadas con pBI12a y 20 líneas transformadas con pBI8a. Las plantas fueron crecidas en el invernáculo, se autopolinizaron y se obtuvieron semillas F1 de ambos tipos de plantas.

2.3. Caracterización de las plantas transgénicas p12

Como se muestra en la Fig. 7, durante la transformación vegetal se introdujo, además del gen ORF3, el gen que confiere resistencia a kanamicina (*npt II*). La proteína NPT II, además de permitir la selección de plantas transformadas en medio conteniendo el antibiótico, permitió evaluar la presencia del transgen en las mismas mediante un ensayo de fosforilación *in vitro*, lo cual facilitó el descarte de aquellas que pudieran haber escapado a la selección. Del total de 20 plantas seleccionadas, se analizaron 15 plantas y en todas se obtuvieron señales positivas. En la Fig. 8, se muestra el análisis correspondiente a algunas muestras provenientes de plantas resistentes a kanamicina, transformadas con el vector pBI12a.

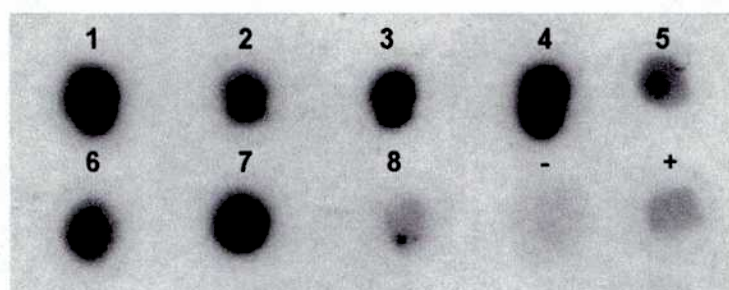


Fig. 8 Ensayo de NPT II en plantas transformadas con el vector pBI12a. Se muestra una placa autoradiográfica correspondiente a una membrana de fosfocelulosa con extractos de plantas seleccionadas en kanamicina, indicados del 1 al 8. Control -: extracto de una planta no transgénica. Control +: extracto de una planta transgénica NPT II.

Posteriormente, las plantas p12 fueron analizadas mediante el ensayo de *Northern blot* para estimar el nivel de acumulación del transcripto del ORF3 en las plantas transgénicas. Como se muestra en la Fig. 9, se detectaron bandas correspondientes al mRNA del ORF3 en varias de las plantas analizadas. Al comparar los niveles de expresión de las distintas líneas, se pudo determinar que las plantas p12-13 y p12-101 acumulaban más cantidad de mRNA del ORF3 que las plantas p12-2 y p12-3.

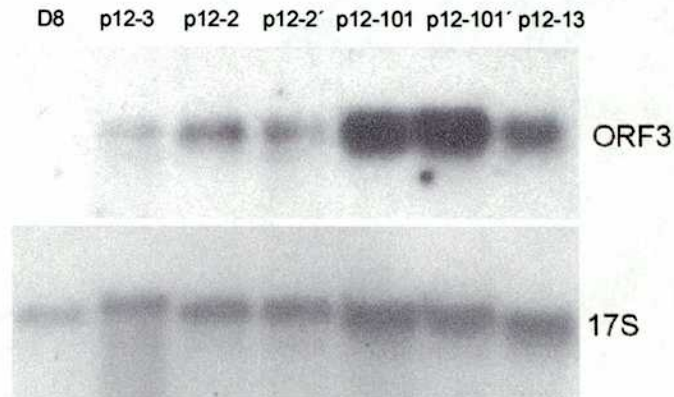


Fig. 9. Análisis de *Northern Blot* de las plantas p12. Se analizaron varias plantas transgénicas p12 (carriles p12-3 a p12-13) y se determinaron los niveles de expresión del transgen utilizando como sonda un fragmento de cDNA conteniendo las secuencias de los genes ORFs 3 y 4 marcado con P^{32} . D8: planta control no transgénica. Para el control de siembra se utilizó como sonda un fragmento de DNA conteniendo la secuencia del DNA ribosomal de 17S.

Luego, se analizaron las plantas p12 seleccionadas mediante la técnica de *Southern blot* para determinar el número de copias del transgen. Como se muestra en la Fig. 10, se observó una sola banda en la muestra correspondiente a la línea p12-3 lo que, de acuerdo con el mapa de restricción correspondiente, indica la presencia de una única copia del transgen (ver Fig. 7) En otras plantas, como p12-2 y p12-101, se observó más de una banda por genoma.

Paralelamente a este análisis, se estudió la segregación mendeliana del gen de selección *npt II* en las mismas plantas trasgénicas y en sus descendientes (ver Materiales y Métodos), lo que permitió confirmar los resultados obtenidos en el ensayo de *Southern blot*. Se eligió a la planta p12-3 para obtener una línea homocigota. Cinco plantas F1 de p12-3 (plantas denominadas de I al V) fueron autopolinizadas para obtener semillas F2 de cada una de ellas. La totalidad de las plantas F2 provenientes de las plantas F1 IV y V resultaron resistentes a kanamicina, indicando que éstas plantas F1 eran plantas homocigotas. La obtención de una línea p12 homocigota era necesaria para trabajar con individuos idénticos (clones) en experimentos que requieren una fuerte correlación estadística, como es el caso de los ensayos de resistencia y/o obtener plantas transgénicas dobles mediante cruzamiento con otras plantas transgénicas (por ejemplo, con plantas p8).

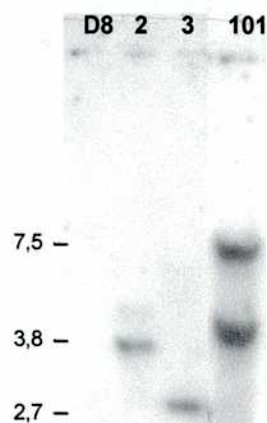


Fig. 10. Análisis de *Southern blot* de plantas p12. Se digirieron 10 µg de DNA genómico purificado de plantas transgénicas y control con Hind III. La hibridación se realizó utilizando como sonda un fragmento de cDNA conteniendo las secuencias de los genes ORFs 3 y 4. La planta p12-3 (3) posee una copia del transgen; las plantas p12-2 y p12-101 (2 y 101) poseerían por lo menos dos copias. Los números de la izquierda indican el tamaño aproximado de los fragmentos de DNA en kb. D8: planta control no transgénica.

2.4. Caracterización de las plantas transgénicas p8

Paralelamente a la caracterización de las plantas p12, las plantas p8 fueron analizadas mediante ensayos de fosforilaciones *in vitro*, de *Northern blot* y estudios de segregación mendeliana del gen *npt II*. Como en el caso de las plantas p12, todas las muestras p8 analizadas dieron señales positivas en el ensayo de fosforilación *in vitro*. Posteriormente, en el análisis por *Northern blot*, se confirmó la expresión de mRNA del ORF4 en algunas de las plantas seleccionadas (Fig. 11).

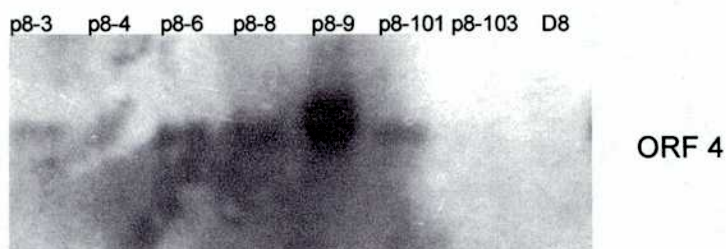


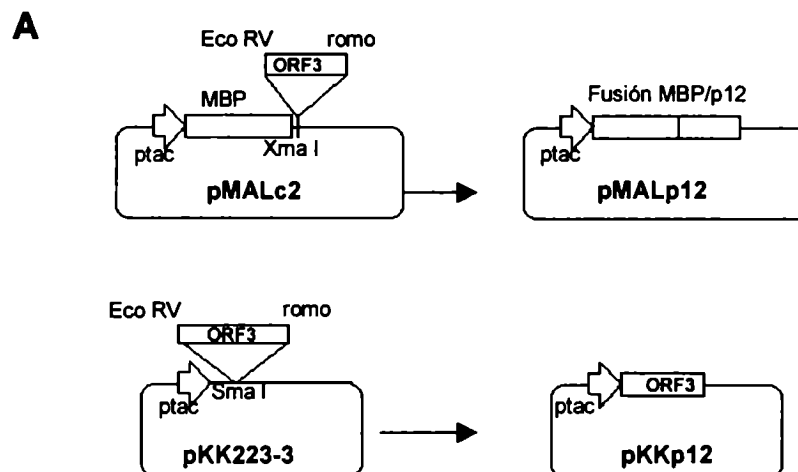
Fig. 11. Análisis de *Northern blot* de plantas p8. Se analizaron varias líneas transgénicas p8 (carriles p8-3 a p8-103) y se determinó la expresión del transgen utilizando como sonda un fragmento de cDNA conteniendo la secuencia del gen ORF 4 marcado con P³². D8: planta control no transgénica.

No se determinó el número de copias del transgen de las plantas p8 por la técnica de *Southern blot*. Sin embargo, el análisis de segregación del gen *npt II* permitió identificar aquellas líneas que contenían una sola copia del transgen para obtener posteriormente una línea homocigota mediante autocruzamiento. De esta manera, se seleccionó la línea homocigota p8-12.

3. Producción de antisueros anti-p12 y anti-p8

3.1. Subclonados de los genes ORF3 y ORF4 en vectores de expresión bacteriana

Primeramente, se intentó expresar a las proteínas p12 y p8 en células bacterianas utilizando los vectores de expresión comerciales pMALc y pKK223-3. Con tal fin, los fragmentos correspondientes a las secuencias de los ORFs 3 ó 4 fueron subclonados directamente en cada uno de los vectores. El esquema seguido para el clonado se esquematiza en la Fig. 12. Luego, se seleccionaron varios clones transformados con cada construcción y se procedió a expresar las proteínas p12 y p8 en células bacterianas. A pesar de los reiterados intentos, en ningún momento se detectó la expresión de dichas proteínas (por lo menos a niveles detectables en geles de SDS-PAGE). Se desconoce con certeza la causa de esta falta de expresión en bacterias, ya que no se encontraron mutaciones ni corrimientos del marco de lectura en las secuencias subclonadas en los plásmidos recombinantes obtenidos. Se especula que las proteínas p12 y p8 podrían resultar tóxicas para las bacterias, debido a su naturaleza hidrofóbica (ver Introducción). Existen reportes indicando que algunas proteínas muy hidrofóbicas, han resultado difíciles de expresar en células bacterianas (Sisk *et al.*, 1992).



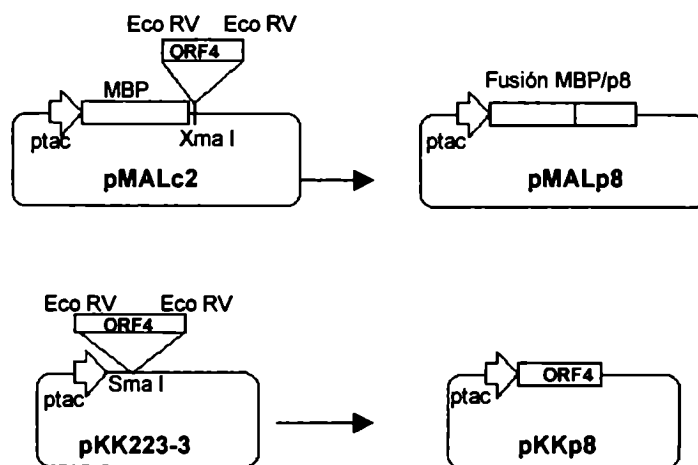
B

Fig. 12. Esquema de los pasos de subclonados de los genes ORFs 3 y 4 en vectores de expresión bacteriana pMALc2 y pKK223-3. A) La secuencia correspondiente al ORF3 fue liberada del clon pTAB5, mediante digestión con las enzimas Hinf I (el extremo fue convertido en la forma romo con la DNA polimerasa I, fragmento Klenow) y Eco RV. Luego, el inserto fue subclonado directamente en el vector pMALc previamente tratado con la enzima Xmn I, de manera tal de conformar un marco de lectura continuo entre las secuencias del ORF3 y el gen MBP. Para la construcción del plásmido pKKp12, el fragmento del ORF3 fue subclonado en el vector pKK223-3 previamente tratado con la enzima Sma I. B) Se procedió en forma análoga para el subclonado del ORF4. La secuencia correspondiente al ORF4 fue liberada a partir del clon pTAC4, con la enzima Eco RV. Luego, el inserto fue subclonado en el vector pMALc previamente tratado con la enzima Xmn I. Para la construcción del plásmido pKKp8, el fragmento correspondiente al ORF4 fue subclonado en el vector pKK223-3 previamente tratado con la enzima Sma I. ptac: promotor artificial del gen Lac que es inducible por el IPTG.

3.2. Subclonado del ORF3 en un vector de expresión basado en baculovirus

Como una alternativa a la expresión en bacterias, se diseñó una estrategia de expresión basada en baculovirus y en células de insecto. En muchos casos, el uso de células eucariotas permite sortear el problema de expresar proteínas muy hidrofóbicas debido a que la presencia de endomembranas facilita la exclusión de las mismas del citoplasma por compartimentalización, lo que determina una mejor tolerancia a su toxicidad. Con tal fin, se subclonaron los genes correspondientes a los ORFs 3 y 4 en un vector que contiene el promotor y parte del gen de la polihedrina del baculovirus pVL1393. Al co-transfectar el plásmido recombinante con el genoma del baculovirus (ver Materiales y Métodos) en células sf9, ocurre una recombinación homóloga entre el DNA viral y el DNA plasmídico, produciéndose un genoma de baculovirus

recombinante que contiene al gen de interés bajo el promotor del gen de la polihedrina. El clon resultante, que contiene los genes correspondientes a los ORFs 3 y 4 en una disposición similar a la que se encuentra en el genoma de PVX, se denominó pVL12a. Cabe destacar que, a pesar de la presencia de los dos genes, el clon pVL12a sólo expresaría la proteína p12, dado que el clonado fue realizado de tal manera de conservar el consenso traduccional (secuencia de Kozack) que estaba presente en el extremo 5' de la secuencia del ORF3 en el clon pTAB5. La secuencia del ORF4 en el plásmido pTAB5 no contenía el consenso traduccional. Paralelamente, se obtuvo el clon denominado pVL8a que contenía únicamente a la secuencia correspondiente al ORF4. En forma similar que lo realizado con el pVL12a, se respetó el consenso traduccional que estaba presente en el extremo 5' de la secuencia del ORF4 en el clon pTAC4 para la construcción del clon pVL8a (Fig. 13).

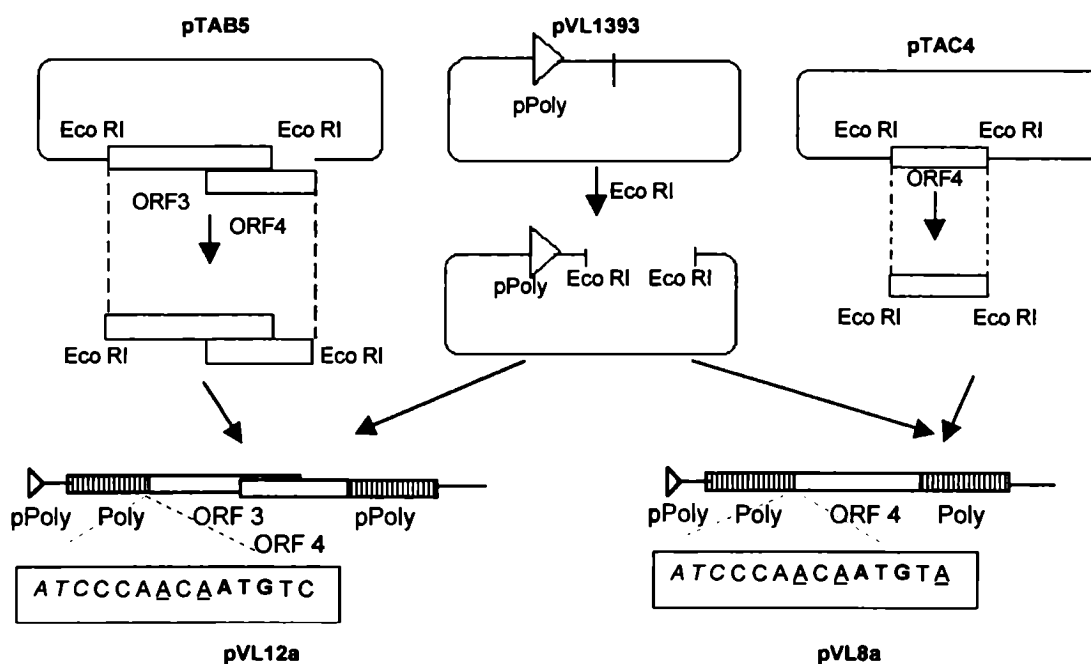


Fig. 13. Esquema de los pasos seguidos en la construcción de los clones pVL12a y pVL8a. La secuencia correspondiente a los ORFs 3 y 4 fue liberada a partir del clon pTAB5, mediante digestión con la enzima Eco RI y subclonada directamente en el vector pVL1393 previamente tratado con Eco RI. Para la obtención de pVL8a, la secuencia correspondiente al ORF4 fue liberada mediante digestión con la enzima Eco RI a partir del clon pTAC4 y subclonada en el vector pVL1393 tratado con la misma enzima. pPoly: promotor del gen de la polihedrina. Poly: secuencia del gen de la polihedrina. En los recuadros se muestran las secuencias correspondientes a las regiones 5' de ORFs 3 y 4 u ORF4, con el codón de iniciación marcado en negrita y las bases respetando el consenso traduccional subrayadas. El codón de iniciación modificado del gen de la polihedrina se indica con letras en *itálicas*.

Los clones pVL12a y pVL8a fueron secuenciados para confirmar la orientación de los insertos subclonados. Luego, los clones obtenidos se co-transfectaron junto con el

genoma del baculovirus mutante de acuerdo a las instrucciones especificadas en el *kit* comercial (ver Materiales y Métodos). Esta etapa del trabajo se realizó en el INTA-Castelar bajo la dirección técnica del Dr. Oscar Taboga.

3.3. Expresión de las proteínas p12 y p8 en células eucariotas sf9 mediante baculovirus recombinantes

Para detectar los baculovirus recombinantes producidos en la co-transfección, se realizaron los pasos detallados en la sección Materiales y Métodos. Brevemente, se realizaron diluciones seriadas de los sobrenadantes del medio de cultivo provenientes de las células co-transfectadas. Luego, se evaluaron la presencia de baculovirus recombinantes mediante ensayos de *dot blot*, en los cuales las membranas con extractos de células sf9 infectadas con las diluciones seriadas mencionadas fueron hibridadas con fragmentos de ORFs 3 y 4 u ORF4 marcados con P³² (ver Materiales y Métodos). Las muestras que dieron señales positivas con las sondas mencionadas sugerían la presencia de baculovirus recombinantes. Como era de esperar, se obtuvieron señales positivas en algunos de los pocillos infectados con diluciones de 10⁻⁶, por lo que se consideró que el inóculo inicial con el que se infectó estaba lo suficientemente diluido para permitir la entrada de a lo sumo 1 virión por pocillo. Para la obtención de clones individuales, se tomaron los baculovirus recombinantes de los pocillos A3 y H2 (Fig. 14).

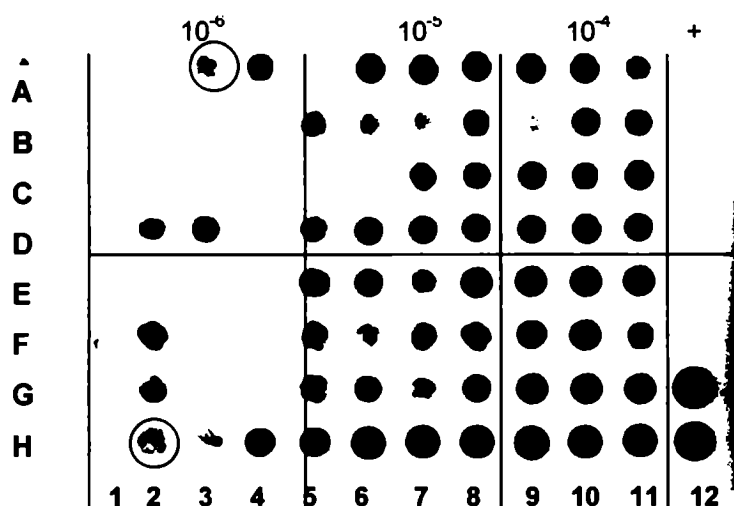


Fig. 14. Placa autorradiográfica de un *Dot-blot* correspondiente a una placa de 96 pocillos. Las diluciones de los inóculos están indicadas en la parte superior. Los clones seleccionados se encuentran marcados con círculos. El símbolo + indica los *dots* realizados con el plásmido pVL12a, como control positivo.

Posteriormente, se amplificó la población de baculovirus recombinantes mediante infecciones repetidas y sucesivas de cultivos celulares crecidos en botellas de cultivo hasta alcanzar títulos de 10^8 - 10^9 partículas infectivas/ml. Se infectaron luego las placas de cultivos celulares a multiplicidades de infección de entre 0,1 a 0,01.

Las muestras obtenidas a partir de las infecciones fueron analizadas en un SDS-PAGE (Fig. 15), en el que se indica la posición de la banda correspondiente a la proteína p12 expresada por el clon H2. A pesar de que la expresión de la proteína p12 pudo ser detectada, su nivel resultó ser demasiado bajo, dificultando los pasos posteriores de purificación de la misma. Además, en este caso particular, la banda correspondiente a la proteína p12 se superponía con una proteína celular/viral de tamaño similar

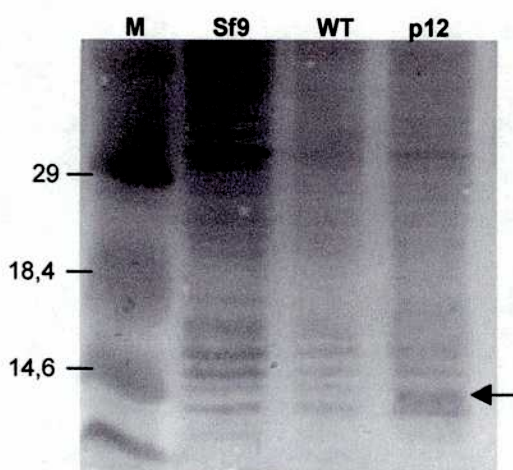


Fig. 15 Análisis de expresión de la proteína p12 en células sf9 en SDS-PAGE 18%. Las muestras corresponden a extractos proteicos obtenidos de células Sf9 no infectadas (Sf9), o infectadas con baculovirus *wild type* (WT) y baculovirus recombinante de p12 H2 (p12). La banda correspondiente a la proteína p12 esta indicada con una flecha. Los números a la izquierda indican las bandas del marcador de peso molecular (M) en kDa.

En ensayos paralelos, se analizaron las muestras obtenidas a partir de infecciones realizadas con el clon p8 en geles de SDS-Tricina, los cuales permiten analizar proteínas de bajo peso molecular. Como puede observarse en la Fig. 16., la banda correspondiente a la proteína p8 se ubica en una posición inferior a la banda de 6 kDa del marcador de peso molecular. Esta migración no esperada podría deberse a las propiedades fuertemente hidrofóbicas de la proteína recombinante. Alternativamente, el menor tamaño aparente de la proteína p8 podría deberse a degradación proteica.

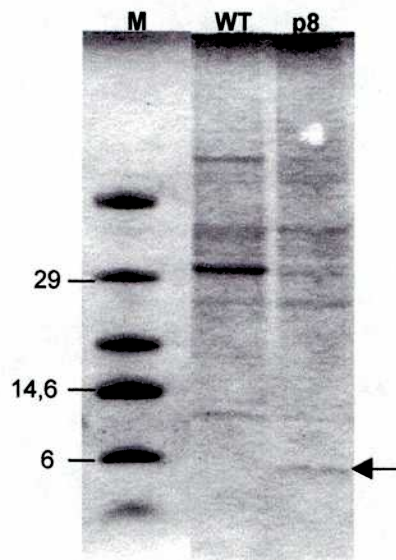


Fig. 16 Análisis de expresión de la proteína p8 en un gel de SDS-Tricina. Las muestras corresponden a extractos proteicos obtenidos de la línea celular infectada con el baculovirus *wild type* (WT), o con el baculovirus recombinante p8 A1 (p8). La banda correspondiente a la proteína p8 esta indicada con una flecha. Los números a la izquierda indican las bandas del marcador de peso molecular (M) en kDa.

3.4. Purificación e inoculación de las proteínas p12 y p8 para la obtención de antisueros

Las proteínas p12 y p8 fueron purificadas de extractos celulares infectadas con baculovirus a partir de geles preparativos de SDS-Tricina. Luego de identificar las bandas por tinción reversible, las mismas se extrajeron de los geles, y se liofilizaron para inocular ratones. Para ello, se empleó el macerado de gel triturado junto con adjuvante de Freund's. Previa verificación del grado de pureza y de la concentración aproximada de ambas proteínas mediante análisis en SDS-PAGE, se inocularon ratones con las proteínas semi-purificadas por vía intraperitoneal. Se siguió un esquema de inmunización típico (ver Materiales y Métodos). Se realizaron varios refuerzos de antígeno (o *boosters*) con alícuotas del inóculo. Se recolectó la sangre de los animales por punción cardíaca y se analizaron los sueros de los animales mediante ensayos de *Western blot*.

El antisuero anti-p8 fue capaz de reconocer a la proteína p8 en el extracto proveniente de células infectadas con baculovirus, revelando una banda de aproximadamente 6 kDa. En cambio, el antisuero anti-p12 fue capaz de reconocer una banda a la altura de

12 kDa en el extracto de células que fueron infectadas con baculovirus recombinante, pero también detectó una banda de proteína de aproximadamente el mismo tamaño en extractos de células infectadas con el baculovirus *wild type* (Fig. 17). Debido a ello, no se pudo confirmar la formación de anticuerpos específicos contra la proteína p12. En ninguno de los dos casos, los antisueros obtenidos en los ratones pudieron reconocer a las proteínas p12 o p8 en extractos provenientes de plantas transgénicas o de plantas infectadas con PVX. Por lo tanto, estos antisueros no resultaron apropiados para encarar los objetivos propuestos inicialmente.

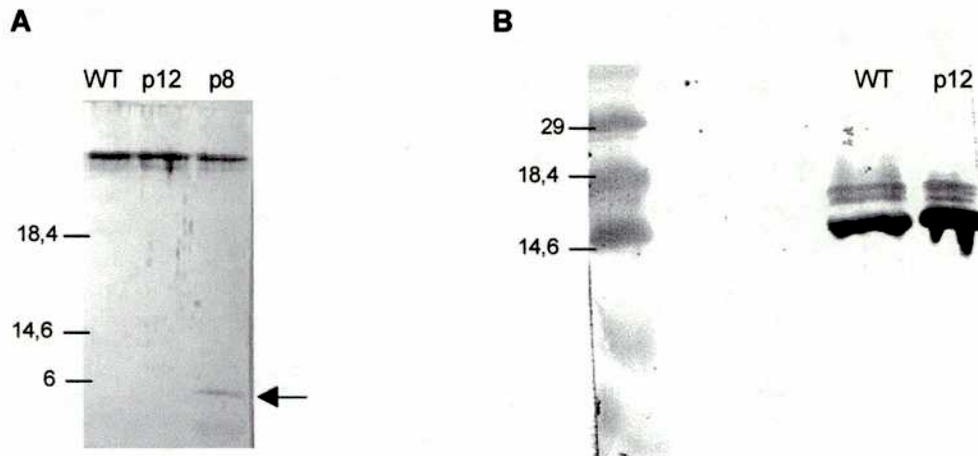


Fig. 17. Ensayo de *Western blot* revelado con antisueros producidos en ratones. A) anti-p8 (dilución 1:500). B) Anti-p12 (dilución 1:500). Se utilizaron geles de poliacrilamida de 15%. WT: extracto de células infectadas con baculovirus *wild type*. p12 y p8: células infectadas con baculovirus recombinantes p12 H2 y p8 A1, respectivamente. La flecha indica la banda correspondiente a la proteína p8. Los números a la izquierda indican las bandas del marcador de peso molecular en kDa.

3.5. Expresión de la proteína p12 en la cepa BL24 de *E. coli*

El fracaso del intento referido anteriormente podía adjudicarse a los bajos niveles de expresión de las proteínas recombinantes en las células de insecto y, en el caso de la proteína p12, la presencia de una proteína contaminante en los extractos que co-purificaba con la misma de geles preparativos.

En el año 1997, se reportó la obtención de un antisuero específico contra la proteína p8 de PVX a partir de un sistema de expresión bacteriano (Hefferon *et al.*, 1997). Por tal motivo, se decidió concentrar el esfuerzo en producir antisuero anti-p12. Como se explicó antes, los intentos en que se utilizaron los vectores pMALc y pKK233-3

fracasaron porque, probablemente no se logró una eficiente represión de la expresión basal de la proteína p12. Para evitar la muerte bacteriana por un posible efecto tóxico de la proteína p12, se decidió utilizar otro sistema de expresión que permitiera reprimir fuertemente la expresión basal de la proteína durante la etapa de crecimiento bacteriano. Se eligió el sistema de expresión basado en la cepa BL24 de *E. coli*, la cual porta el gen de la RNA polimerasa T7 bajo un promotor bacteriano termoinducible. De esta forma, se subclonó el gen ORF3 en el vector pRSETc que contiene el promotor T7, en fase con el marco de lectura abierto del vector obteniendo al clon pRSETp12 (Fig. 18).

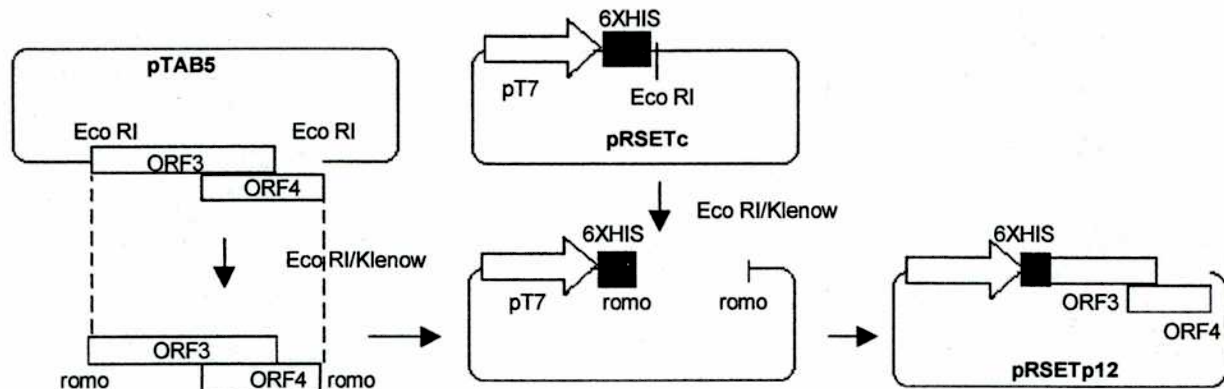


Fig. 18. Esquema de los pasos seguidos para la construcción del clon pRSETp12. La secuencia correspondiente a los ORFs 3 y 4 fue liberada a partir del clon pTAB5 mediante digestión con la enzima Eco RI más Klenow. El vector pRSETc fue previamente tratado con Eco RI más Klenow. El subclonado del inserto se realizó de manera tal de conformar un marco de lectura continuo con la secuencia que codifica las seis histidinas (6XHIS) en el vector. pT7: promotor T7.

A continuación, se transformaron células BL24 con el plásmido recombinante pRSETp12. Si bien el cultivo transformado con dicho vector creció a ritmo mucho más lento que las células transformadas con el vector original, se establecieron condiciones de incubación para mejorar el nivel de expresión de la proteína p12 (ver Materiales y Métodos). A pesar de la eficiente represión de la expresión basal en esta cepa, se detectó la expresión de la proteína p12 en condiciones de no inducción. Esto no impidió que el cultivo bacteriano creciera hasta alcanzar una densidad apropiada (DO_{600} de 0,3 a 0,5) para la inducción de la expresión. La proteína p12 expresada presentó un tamaño aparente de aproximadamente 16 kDa debido a la fusión con los 6 residuos de histidina provenientes del vector y formó cuerpos insolubles en las células bacterianas. Este hecho facilitó la purificación de la proteína, ya que se pudo enriquecer el extracto original a partir de la fracción insoluble de los lisados celulares.

(Fig. 19). Se procedió luego a purificar la proteína mediante geles preparativos, tal cual como se detalla en Materiales y Métodos. Finalmente, la proteína p12 purificada fue inoculada en conejos de laboratorio siguiendo un esquema de inmunización convencional.

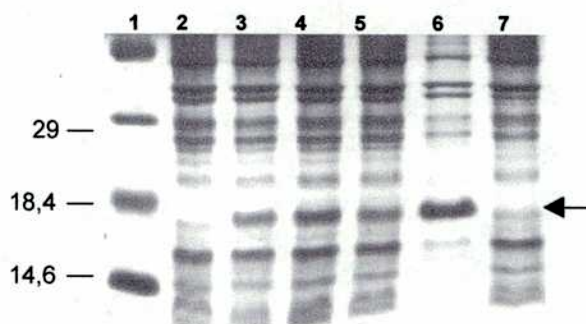


Fig. 19. Análisis de expresión de la proteína p12 expresada en células BL24 de *E. coli*. Calle 1: marcador de peso molecular en kDa. Calle 2: extracto de células de *E. coli* transformadas con pRSETc. Calle 3: extracto de células de *E. coli* transformadas con pRSETp12 sin inducir. Calles 4 y 5: extractos de células de *E. coli* transformadas con pRSEp12 e inducidas por calor. Calle 6: fracción de cuerpos insolubles purificados de extractos provenientes de células de *E. coli* transformadas con pRSETp12. Calle 7: fracción soluble de células de *E. coli* transformadas con pRSETp12. La flecha indica la banda correspondiente a la proteína p12 fusionada a 6 residuos de histidina.

Al cabo de 2 meses, se probaron los antisueros obtenidos en 2 animales para evaluar la respuesta inmune. Con tal fin, se realizaron ensayos de inmunodetección por *Western blot* con extractos provenientes de células BL24 que expresaban la proteína p12 y también con extractos de células de insecto sf9 infectadas con el baculovirus recombinante para la proteína p12. Los resultados indicaron que los antisueros de los 2 animales poseían propiedades muy parecidas. Por tal motivo, se eligió a uno de ellos, y se lo denominó anti-p12 C1. Como se muestra en la Fig. 20, el nivel de ruido de fondo y las señales inespecíficas contra proteínas bacterianas impidieron determinar si el antisuero anti-p12 C1 era capaz de detectar a la p12 expresada en bacterias. Por otro lado, el antisuero fue capaz de detectar en forma específica a la proteína p12 expresada por baculovirus. A pesar de este hecho, el anti-p12 C1 no fue capaz de detectar proteína p12 en extractos de plantas transgénicas p12 ni en plantas de tabaco infectadas con PVX. Probablemente, los niveles de expresión de proteína p12, tanto en las plantas transgénicas como en las infectadas, son bajos. A ello debe sumarse el hecho de que el anti-p12 C1 obtenido no tuviese un título alto ni una afinidad suficiente para detectar bajas concentraciones de p12 en ensayos de *Western*

blot. En un intento de superar estos posibles problemas, se realizaron fraccionamientos subcelulares de extractos provenientes de plantas tabaco transgénicas p12 o infectadas con PVX para separar las fracciones enriquecidas en membranas, en las que, debido a su naturaleza hidrofóbica, se esperaba que estuviese presente la mayor parte de la p12 expresada. Sin embargo, en ningún caso se pudo detectar la presencia de la proteína p12 con el anti-p12 C1.

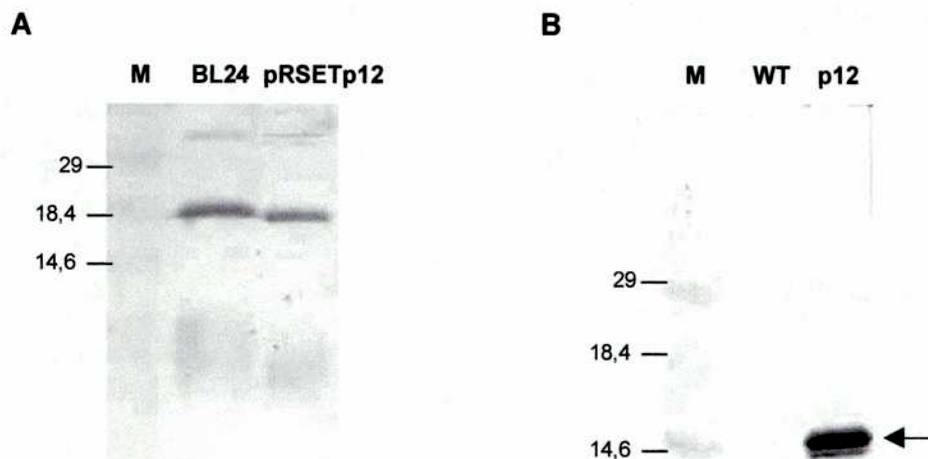


Fig. 20. A) Análisis de *Western blot* con anti-p12 C1. BL24: extracto de células de *E. coli* sin transformar. pRSETp12: extracto de células de *E. coli* transformadas con pRSETp12. B) Análisis de *Western blot* con extractos de células infectadas con baculovirus. WT: extracto de células sf9 infectadas con baculovirus *wild type*. p12: extracto de células sf9 infectadas con el baculovirus p12 H2. Ambas membranas fueron reveladas con el antisuero anti-p12 C1 (dilución 1:1000) y con anti-conejo unido a fosfatasa alcalina. La flecha indica la banda correspondiente a la proteína p12. Los números de la izquierda indican los tamaños de las bandas correspondientes al marcador de peso molecular (M) en kDa.

Paralelamente, se analizaron extractos provenientes de aquellas líneas transgénicas que expresaban niveles levemente más elevados de mRNA de ORF3, tales como las líneas p12-101 y p12-2. Tampoco se pudo detectar la proteína p12 en dichas muestras empleando el anti-p12 C1.

Se analizaron también dos tipos de protoplastos con el anti-p12 C1: 1) provenientes de plantas control infectadas con PVX y 2) obtenidos a partir de plantas transgénicas p12. Se prepararon extractos a partir de los mismos y se los analizó mediante ensayos de *Western blot*. A pesar de los reiterados intentos, no se obtuvo ningún resultado positivo.

3.6. Inmunización de ratones mediante inoculación de DNA

El método consistió en inyectar los plásmidos conteniendo el gen ORF3 bajo la regulación del promotor CMV (proveniente del genoma de citomegalovirus), de expresión constitutiva, en células animales. Según la bibliografía, a partir de los plásmidos inyectados en músculos de animales, se transcriben los mRNA del gen y se sintetizan las proteínas en el interior de las células. Luego, por la vía de presentación antigénica, se producen anticuerpos contra el antígeno expresados a partir de propia célula del animal (Gurunathan *et al.*, 2000). Con este fin, la secuencia correspondiente al gen ORF3 fue subclonada en el vector pcDNAIII, para su posterior inoculación y expresión en tejidos animales. Los plásmidos purificados fueron inyectados intratibialmente en ratones (ver Materiales y Métodos) y se obtuvieron muestras de sueros de los animales vacunados que fueron analizadas mediante ensayos de *Western blot*. Ninguno de los antisueros obtenidos fue capaz de reconocer a proteína p12 expresada en bacterias ni en plantas.

3.7. Expresión de la región hidrofílica de proteína p12 en células de *E. coli*

Alternativamente, se subclonó el fragmento de DNA que codifica a la región correspondiente al dominio hidrofílico de la proteína p12, de tal manera que quedara en fase con el marco de lectura abierto del gen de la MBP (*maltose binding protein*) en el vector comercial pMALc (Fig. 21). Mediante este enfoque, se especulaba con aumentar los niveles de expresión eliminando los dominios hidrofóbicos de la proteína p12, los que muy probablemente impedían una adecuada acumulación en bacterias debido a su toxicidad. Se logró expresar una proteína de fusión compuesta de la MBP y la región hidrofílica de la p12 en células de *E. coli*. Sin embargo, las inoculaciones realizadas en conejos con la proteína fusionada a la región hidrofílica de p12 no produjeron antisueros apropiados para la detección de la misma en extractos de bacterias, células sf9 infectadas con baculovirus, ni plantas transgénicas.

3.8. Oligobodies

Como una última opción, se intentó obtener una sonda de *oligobodies* (Bianchini, *et al.*, 2001) mediante la utilización de dos péptidos correspondientes a la secuencia hidrofílica de la p12. Los *oligobodies* son una colección de oligonucleótidos de simple cadena que actúan como si fueran anticuerpos, reconociendo a las proteínas contra las cuales fueron seleccionados. Estos trabajos se realizaron bajo la dirección del Dr.

Santa-Coloma y del Lic. Bianchini en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar. Lamentablemente, los *oligobodies* seleccionados a partir de los péptidos de p12 no pudieron detectar a la proteína p12 en los extractos de plantas transgénicas ni de plantas infectadas, a pesar de reconocer a la proteína p12 expresada en el sistema de baculovirus (Fig. 22)

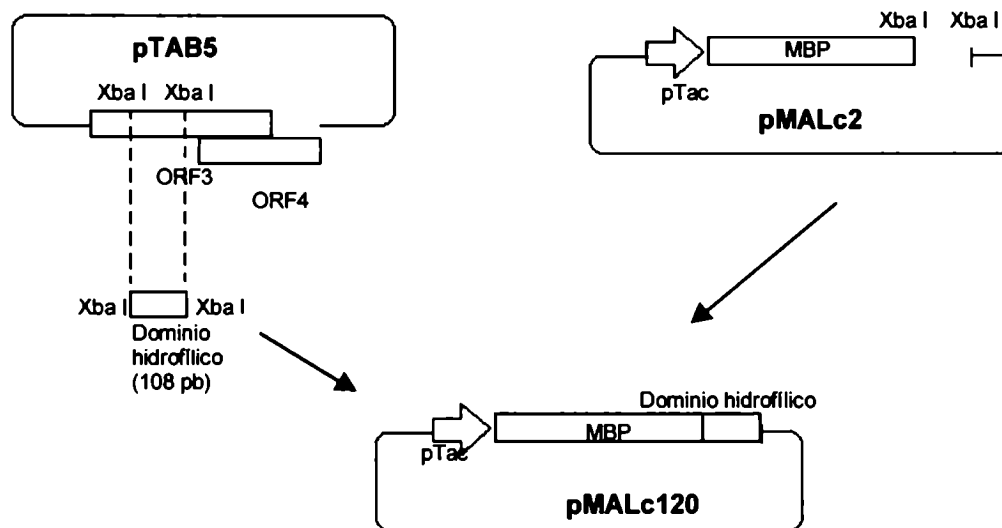


Fig. 21. Esquema de los pasos de construcción seguidos para obtener el clon pMALc120. Se liberó la secuencia comprendida entre los nucleótidos 5254 y 5363 (región interna del ORF3) del genoma viral a partir del clon pTAB5, mediante la digestión con la enzima Xba I y se subclonó la misma en el vector pMALc2 previamente tratado con dicha enzima de manera tal para conformar un marco de lectura continuo con la secuencia del gen MBP. pTac: promotor tac.

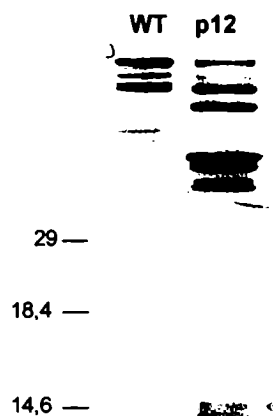


Fig. 22. Ensayo de *Western blot* revelado con *oligobodies*. WT: extracto de células infectadas con baculovirus *wild type*. p12: extracto de células infectadas con el baculovirus recombinante p12 H2. La flecha indica la banda correspondiente a la proteína p12. Los números a la izquierda indican las bandas del marcador de peso molecular en kDa.

4. Experimentos de trans-complementación

4.1. Construcción de una versión modificada de PVX mutada en el gen ORF3

Para poder demostrar la presencia de proteína p12 funcional en las plantas transgénicas, se realizó experimento de trans-complementación con un virus delecionado en el gen correspondiente. En el caso de ocurrir la trans-complementación, la proteína expresada en las células de plantas transgénicas aportaría en *trans* las funciones propias de la proteína p12, restaurando así la capacidad de movilización del virus mutante. Como hasta ese momento la única evidencia que se poseía sobre la expresión de la proteína p12 en las plantas transgénicas era la banda de mRNA del ORF3 en los análisis de *Northern*, resultaba del mayor interés demostrar la presencia de la proteína funcional para continuar el proyecto y avanzar en la caracterización de las plantas obtenidas.

Para la construcción del virus mutante, se partió de la copia completa del genoma de PVX obtenida en el nuestro laboratorio por la Dra. G. Calamante (Calamante, 1998). El clon de copia completa de PVX fue obtenido mediante ligaciones de fragmentos de cDNA del genoma de PVX, y fue denominado pPVX3. Dicha copia, que comprendía los nucleótidos 1-6432 del genoma viral y una cola de poli(A) de 24 residuos, fue ligada río abajo del promotor de la RNA polimerasa T7 dentro del plásmido pUC18. La mayor parte del clon pPVX3 fue secuenciado previamente y se demostró que era totalmente funcional en experimentos de infección en plantas de tabaco. Para la construcción de la versión mutada del vector viral, se utilizó el plásmido pPVX3Nhe I, el cual contenía un fragmento Nhe I/Nhe I correspondiente a las posiciones entre 4874 a 5792 del genoma de PVX en el vector comercial pBuescript SK+. Los sitios de reconocimiento para la enzima Nhe I en ambos extremos del inserto están conservados en la secuencia genómica. Al digerir con Xba I al plásmido pPVX3Nhe I, se delecionó el fragmento correspondiente a las posiciones 5254-5363 de 108 pb, y se re-ligaron los extremos. Luego, se liberó el inserto Nhe I/Nhe I conteniendo la deleción de 108 pb y se lo subclonó en el vector pPVX3 en reemplazo de la secuencia original. El clon resultante, denominado pPVX Δ p12, es una versión mutante del clon pPVX3 con una deleción de 108 pb correspondiente al ORF3 del genoma (Fig. 23). Posteriormente, en ensayos con protoplastos, se pudo confirmar que el virus mutante era capaz de replicar en las células vegetales.

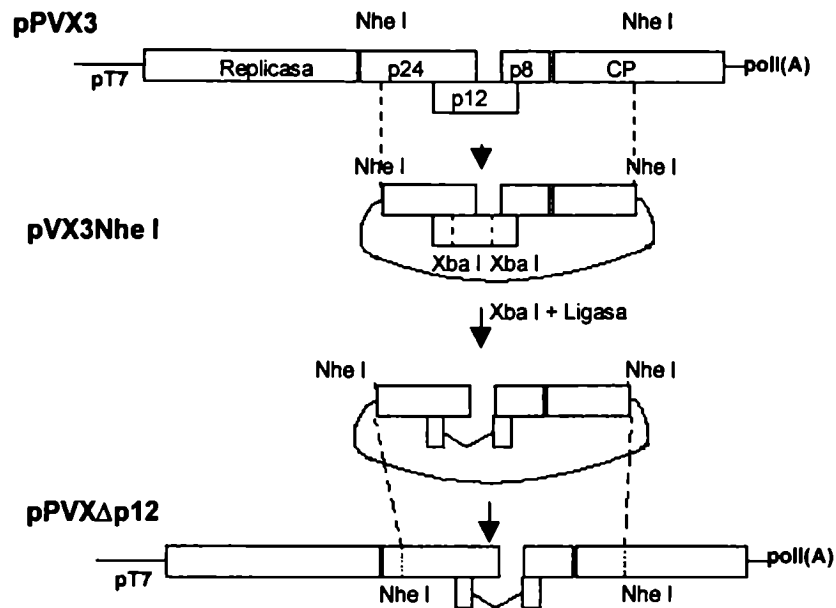


Fig. 23. Esquema de los pasos seguidos en la construcción del clon pPVXΔp12.

4.2. Ensayos de infección con pPVXΔp12 en plantas p12

Para infectar las plantas p12 con el virus mutante, se realizaron reacciones de transcripción *in vitro* utilizando como molde al plásmido pPVXΔp12. Como control se utilizó al clon pPVX3. Ambos plásmidos fueron previamente linealizados con la enzima Kpn I (ver Materiales y Métodos). Luego de confirmar la producción de los RNAs, se inocularon las hojas maduras de plantas control D8 y de plantas transgénicas p12-3 con los productos de las reacciones. La Fig. 24 muestra el resultado de la inmunodetección de PVX y de pPVXΔp12 revelados con antisueros anti-CP de PVX. El RNA de pPVXΔp12 fue capaz de infectar a la planta transgénica p12-3, pero no fue capaz de infectar a la planta control. La re-inoculación de la planta control con los extractos de hoja p12-3 infectada con el RNA del pPVXΔp12 no produjo infección de la misma, indicando que no existía una recombinación del virus mutante en la planta transgénica que regenerara al virus *wild type*. Ello confirmó que la infección provocada por el RNA del pPVXΔp12 en la línea p12-3 se debía a un fenómeno de trans-complementación. Sin embargo, el pPVXΔp12 fue incapaz de infectar a hojas sistémicas superiores de la planta transgénica, sugiriendo que la trans-complementación no aportaba todas las funciones necesarias para el desarrollo normal de la infección.

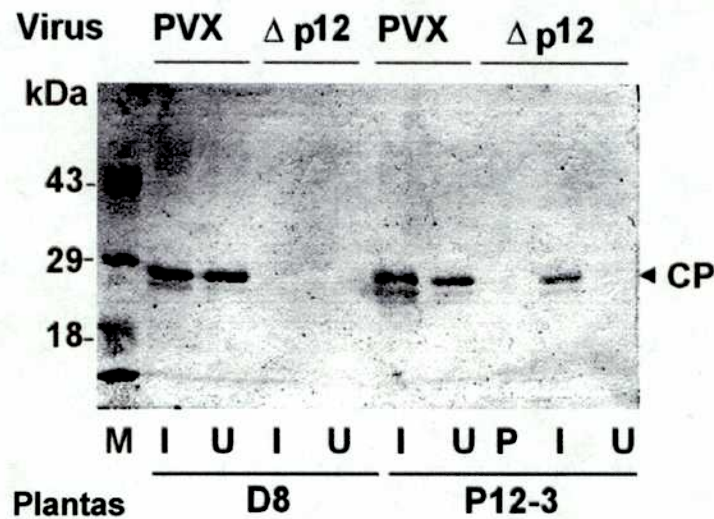


Fig. 24. Análisis de *Western blot* de ensayos de trans-complementación entre plantas p12 y pPVXΔp12. El ensayo fue revelado con anti-CP de PVX (dilución 1:1000). Las muestras analizadas provienen de plantas D8 y p12-3 inoculadas con los RNAs obtenidos a partir transcripciones *in vitro*. PVX: pPVX3. Δp12: pPVXΔp12. M: marcador de peso molecular. I: muestra de las hojas inoculadas. U: muestras de hojas superiores de las hojas inoculadas. P: hojas sin inocular. La banda correspondiente a la CP se indica con una flecha. Los números a la izquierda de las membranas indican las bandas correspondientes al marcador de peso molecular (M) en kDa

CAPITULO 1

RESULTADOS

Caracterización de la interacción plantas p12 y PVX

Caracterización de la interacción entre plantas transgénicas p12 y PVX

1. Alteraciones histológicas en plantas p12

Se cultivaron plantas p12 en el invernadero para evaluar su aspecto, tamaño y morfología. No se observaron anomalías respecto del tamaño, color y número de las hojas, tiempo de floración ni cantidad de semillas en comparación con las plantas control (resultados no presentados). Sin embargo, en algunas ocasiones se registraron retardos en el crecimiento, especialmente en las etapas tempranas del desarrollo.

Al examinar cortes histológicos transversales de hojas expandidas y maduras de plantas p12 con el microscopio óptico, se observaron algunas células rotas y amplios espacios intercelulares conteniendo restos de membranas y organelas en la zona del mesófilo esponjoso. En el mismo tejido se pudieron observar células con organelas colapsadas y paredes celulares muy adelgazadas, las que muy probablemente representaban estadios intermedios del proceso de degradación celular (Fig. 25). Llamativamente, estas alteraciones histológicas fueron observadas sólo en las hojas maduras completamente expandidas (Fig. 25 A y D) y no fueron detectadas en cortes de hojas jóvenes (Fig. 25 E), como así tampoco en tallos o raíces. Cuando se analizaron las plantas transgénicas p8, no se observaron diferencias con respecto a las plantas control (resultados no presentados).

2. Aparición de síntomas atípicos en plantas p12 infectadas con PVX

En condiciones ambientales controladas de luz, temperatura, y humedad, la infección de plantas *N. tabacum* Xhanti D8 NN por la cepa CP2 de PVX provoca un mosaico de color amarillo. Sin embargo, los cambios en condiciones ambientales y en el estado fisiológico de las plantas pueden modificar en mayor o menor grado la sintomatología viral.

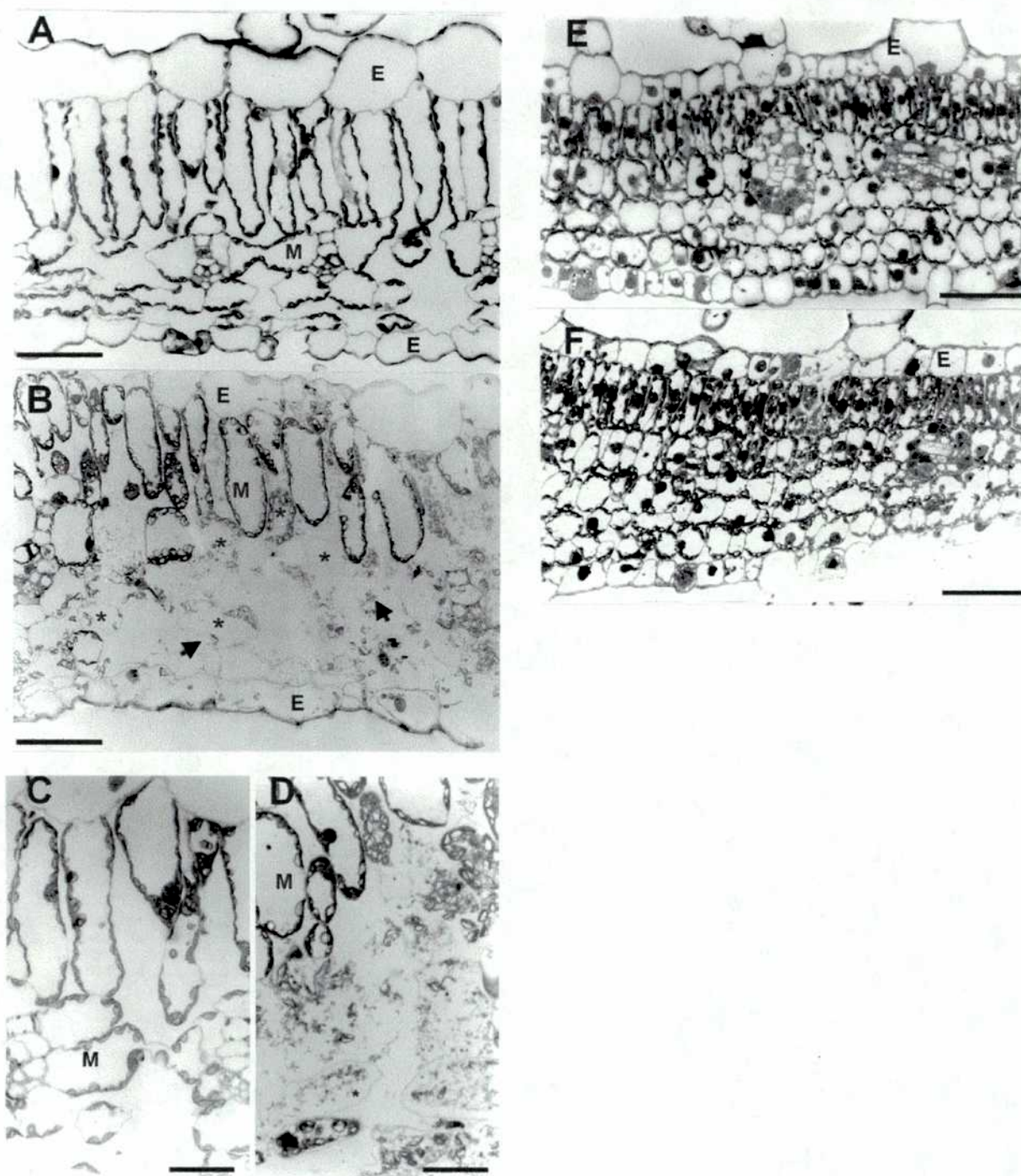


Fig. 25. Cortes histológicos correspondientes a secciones transversales de hojas de *N. tabacum* Xanthi D8 NN (A, C) y p12-3 (B, D). Las muestras se tomaron de la tercera hoja completamente expandida a las 13 semanas post-germinación. E) y F) muestran secciones correspondientes a la segunda hoja inmadura de plantas control D8 y p12-3, respectivamente. Las flechas indican las regiones con alteraciones histológicas. Barras = 100 μ m (A, B, E, F); 30 μ m (C, D). E: células epidermales; M: células del mesófilo; *: células en un avanzado grado de degradación.

Al infectar plantas transgénicas p12 con PVX, se observaron inicialmente puntos amarillos en las hojas infectadas que se fueron expandiendo luego para formar, en aproximadamente una semana, anillos amarillos que contenían en su centro tejido verde. Posteriormente, a medida que estos anillos se iban expandiendo, aparecían en el centro de los mismos nuevos puntos amarillos, conformando así anillos concéntricos. En una fase mucho más avanzada de la infección, los anillos externos se fusionaban unos con otros y eventualmente cesaba su expansión. Los síntomas finales consistían en lesiones comprendiendo 2 a 3 anillos concéntricos rodeadas de un borde fino con aspecto necrosado (Fig. 26). Los mismos tipos de anillos aparecían en forma paulatina en las hojas superiores no inoculadas, acompañando aparentemente la invasión sistémica del virus por la planta. Llamativamente, los anillos formados en las hojas superiores eran más pequeños y coincidían con el tipo de lesiones observadas en la etapa temprana de la formación de los síntomas; en algunos casos se observaban solamente puntos amarillos. A medida que la infección viral progresaba en la planta, el número de anillos o lesiones en las hojas superiores decrecía paulatinamente, hasta desaparecer por completo en las hojas más jóvenes.

Llamativamente, la inoculación con la versión mutada pPVX Δ p12 en plantas p12 produjo unas lesiones cloróticas tenues de 3 a 4 mm de diámetro. Cuando se analizaron los síntomas provocados por PVX en plantas transgénicas p8, no se observaron diferencias con respecto a las plantas control (resultados no informados).

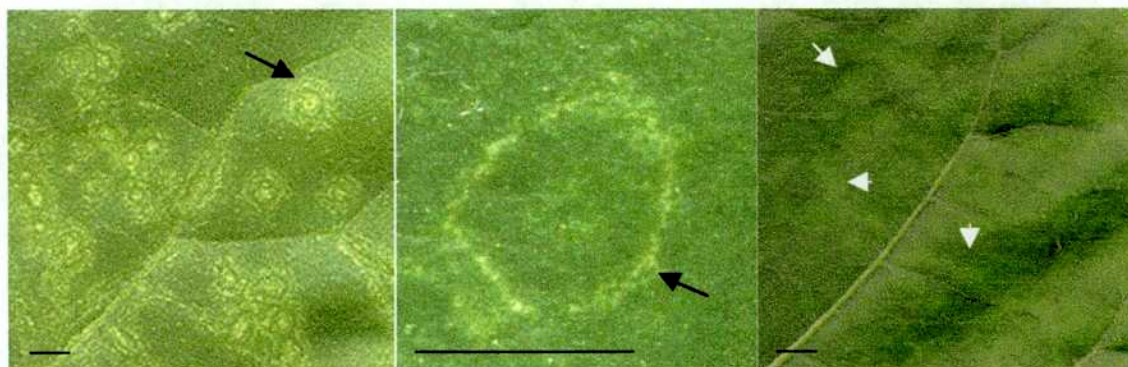


Fig. 26. Síntomas de la infección causada por PVX en plantas de *N. tabacum* transformadas con el gen p12. Fotos de la izquierda y del centro: lesiones en forma de anillos concéntricos (marcados con flechas). Foto de la derecha: Síntomas típicos de PVX (cepa CP2) en hojas de *N. tabacum* Xhanti D8 NN (indicadas con flechas blancas). Se observa un mosaico clorótico tenue. Barra = 0,5 cm.

Para estudiar si la aparición de los síntomas dependía de la presencia simultánea de la proteína p12 proveniente del transgen y de PVX, se realizó un experimento con

plantas que fueron injertadas recíprocamente (Fig. 27). Una de las plantas ensayadas poseía un pie de planta p12 y un injerto de planta control. La otra planta tenía un pie de planta control y un injerto de planta p12.

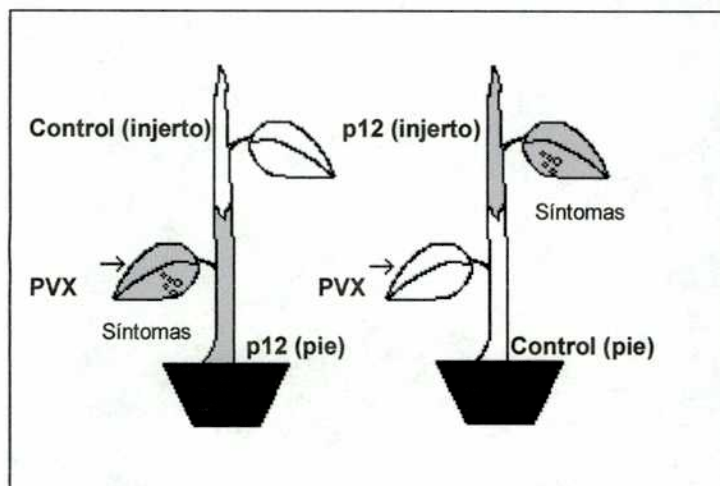


Fig. 27. Ensayo de infección de plantas con injertos recíprocos. Izquierda: esquema del ensayo. Foto de la derecha: una de las plantas ensayadas.

Cuando se inoculó con PVX a las hojas correspondientes a los pies de las plantas injertadas, aparecieron lesiones en el pie correspondiente a la planta p12, y no en el de la planta control. Luego de un tiempo, a medida que el virus invadía la parte superior correspondiente al injerto, se observaron lesiones únicamente en las hojas correspondientes a la planta p12, y no en las hojas no-transgénicas. Los tejidos no-transgénicos, tanto en el pie o como en el injerto, siempre desarrollaron el síntoma típico de PVX de mosaico clorótico suave.

3. Resistencia a PVX en plantas transgénicas p12

La aparición de los síntomas atípicos descritos más arriba, junto con la disminución del número de lesiones a medida que la infección progresaba, sugirió que en las plantas p12 infectadas con PVX operaba algún mecanismo de defensa. Para evaluar esta hipótesis, se estimó el curso temporal de la acumulación viral mediante ensayos de ELISA tanto en plantas transgénicas (línea p12-3) como en plantas control. Para ello, se tomaron muestras de las hojas inoculadas y de las hojas no inoculadas (tercera posición superior contando desde arriba; hojas expandidas con tamaños superiores a 5 cm de largo) a distintos tiempos del desarrollo de la infección. Como se muestra en

la Fig. 28, la acumulación de PVX en las hojas inoculadas de las plantas transgénicas y no transgénicas fue estadísticamente equivalente. En cambio, la acumulación viral en las hojas superiores de las plantas p12 fue considerablemente menor que el nivel presente en las plantas control al cabo de 2 semanas de infección. Estos resultados fueron congruentes con la disminución del número de lesiones observado en las hojas superiores de las plantas p12. También se obtuvieron resultados similares con las otras líneas transgénicas de p12 que mostraban diferentes niveles de expresión (Tabla I). Aunque no se pudo establecer una correlación entre el nivel de expresión de p12 y el grado de resistencia, estos resultados sugerían que la presencia de la proteína p12 transgénica es el factor responsable de inducir esta respuesta defensiva. El curso temporal de la infección de PVX en plantas transgénicas p8 fue similar al observado en las plantas control (resultados no informados).

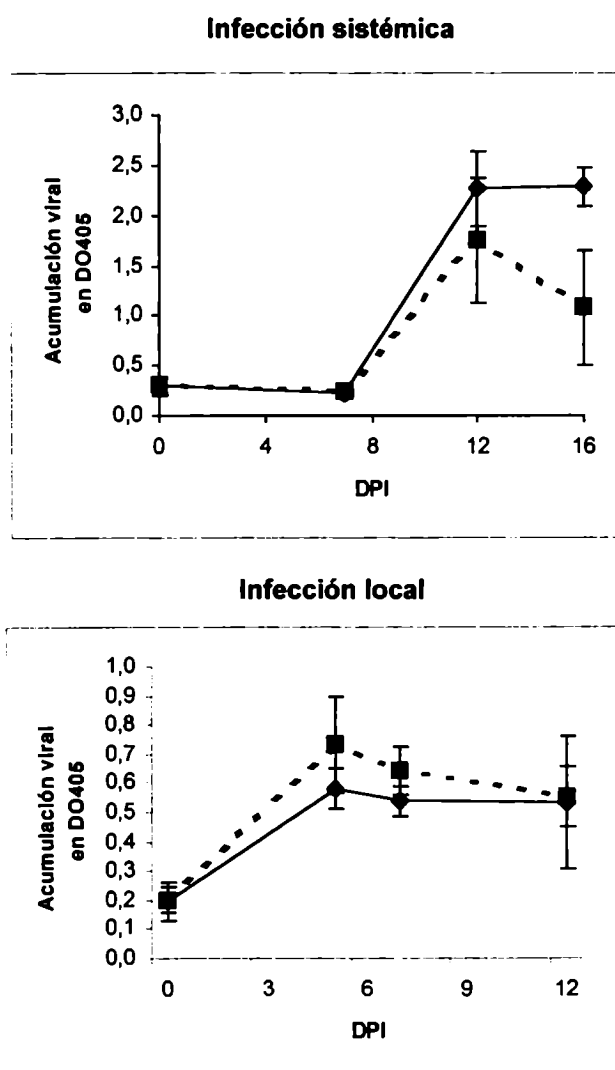


Fig. 28. Determinación del curso temporal de la acumulación viral en hojas de *N. tabacum* infectadas con PVX. Panel superior: acumulación viral en hojas sistémicas, correspondientes a la tercera hoja superior en cada tiempo de muestreo. Número de plantas analizadas: D8 = 8; p12 = 16. La figura corresponde a un experimento representativo. El experimento se repitió cuatro veces con diferentes números de plantas en cada ensayo, pero todos con resultados similares. Panel inferior: acumulación viral en hojas inoculadas. Número de plantas ensayadas: D8 = 3; p12 = 10. La figura corresponde a un experimento representativo. El experimento se repitió dos veces con diferentes números de plantas ensayadas pero ambos con resultados similares. Las barras verticales representan la desviación estándar. ♦: plantas de *N. tabacum* Xanthi D8 NN; ■: plantas transgénicas p12-3. DPI: días post-infección.

Tabla I. Resistencia a PVX de plantas transgénicas p12

DPI	0	7	13	16	21	27
Plantas	Acumulación de virus (DO ₄₀₅)					
D8						
1	0,155	0,201	0,199	1,131	1,186	1,201
2	0,148	0,202	0,201	1,131	1,197	1,221
3	0,158	0,240	0,203	1,231	1,183	1,169
p12-101						
1	0,156	0,169	0,181	0,200	0,207	0,154
2	0,155	0,178	0,160	0,221	0,199	0,159
3	0,150	0,181	0,163	0,151	0,191	0,171
4	0,151	0,199	0,164	0,153	0,218	0,163
5	0,153	0,193	0,163	0,150	0,166	0,184
6	0,156	0,222	0,174	0,162	0,194	0,206
7	0,150	0,246	0,187	0,180	0,170	0,192
8	0,166	0,219	0,206	0,170	0,181	0,169
p12-2						
1	0,155	0,168	0,155	0,220	0,220	0,145
2	0,173	0,169	0,152	0,217	0,229	0,151
3	0,154	0,189	0,712	0,152	0,350	0,154
4	0,162	0,187	1,097	0,941	1,034	0,158
5	0,160	0,212	0,192	0,180	0,998	0,181

El curso temporal de la acumulación viral fue determinado mediante ensayos de ELISA en muestras provenientes de plantas transgénicas F1 correspondientes a las plantas p12-101 y p12-2 no homocigotas. Los datos corresponden a valores de DO medidos a 405 nm.

4. Ensayos de replicación viral en protoplastos de plantas p12

Para explicar la resistencia contra PVX observada en las plantas p12, se plantearon dos hipótesis alternativas: 1) el virus no podía replicarse normalmente en las células de las plantas transgénicas p12; 2) el virus era incapaz de movilizarse normalmente dentro de las plantas p12. También existía la posibilidad de que ambas funciones virales, la replicación y la movilización, estuviesen simultáneamente afectadas durante la infección de las plantas p12.

Para evaluar la primera alternativa, se estimó la capacidad replicativa de PVX en células de plantas p12. Con tal fin, se obtuvieron protoplastos de plantas p12 y se trans-

fectaron con RNA viral obtenido mediante la transcripción *in vitro* del clon pPVX3. De este modo, se pudo estudiar la replicación viral independientemente del proceso de movilización. Como se muestra en la Fig. 29, la replicación viral en los protoplastos p12, evaluada a partir de la acumulación de CP viral, fue similar a la observada en protoplastos de plantas no transgénicas. Este resultado constituyó una fuerte indicación de que la replicación viral en las plantas transgénicas no estaba afectada. En consecuencia, se dedujo que la resistencia observada en las plantas p12 era atribuible a algún tipo de inhibición de la movilización viral.

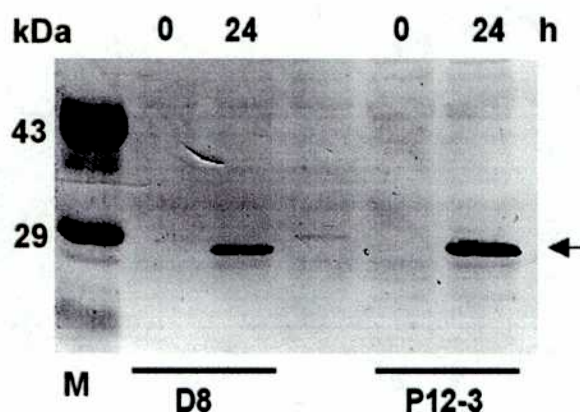


Fig. 29. Replicación de PVX en protoplastos de plantas p12 y control. La membrana de *Western blot* fue revelada con un antisuero contra la CP de PVX (dilución 1:1000). La flecha indica la banda correspondiente a la CP. D8: Extractos provenientes de protoplastos obtenidos a partir de hojas de plantas control transfectados con el transcripto infectivo pPVX3. p12-3: Extractos provenientes de protoplastos obtenidos a partir de hojas de plantas transgénicas p12 transfectados con el transcripto infectivo pPVX3. M: Marcador de peso molecular. 0 y 24 h indican los tiempos de cosecha de los protoplastos en horas luego transfectar con pPVX3. Los pesos moleculares en kDa están indicados a la izquierda.

5. Ensayos de infección con virus pertenecientes a otros grupos

Para evaluar las respuestas de las plantas p12 frente a virus pertenecientes a otros grupos, las líneas transgénicas p12-2, p12-3 y p12-101 fueron infectadas con TMV y PVY, pertenecientes a los géneros *Tobamovirus* y *Potyvirus*, respectivamente.

Para el caso de PVY, la cinética de la acumulación viral en muestras correspondientes a la tercera hoja superior se determinó mediante ensayos de ELISA. Se tomaron muestras de las hojas a lo largo del experimento, procediendo de la misma manera

que en el ensayo de infección con PVX. Como se muestra en la Fig. 30, no se observaron diferencias significativas con respecto a las plantas control. En ambos tipos de plantas, la inoculación de PVY provocó una infección sistémica. Estos resultados sugieren que la respuesta observada en las plantas p12 es una resistencia específica contra PVX.

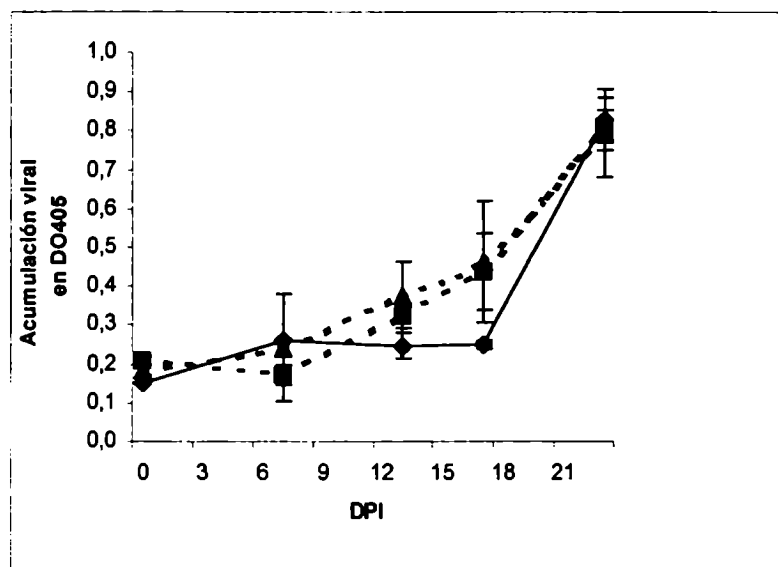


Fig. 30. Determinación del curso temporal de la acumulación viral en hojas de plantas p12 infectadas con PVY. La acumulación viral se determinó en hojas sistémicas (tercera hoja superior). Número de plantas ensayadas: D8 = 2; p12-2 = 3; p12-3: 3. La figura corresponde a un experimento representativo. El experimento se repitió dos veces con diferentes números de plantas ensayadas pero en ambos casos con resultados similares. Las barras verticales representan la desviación estándar. ♦: plantas de *N. tabacum* Xanthi NN D8; ▲: plantas transgénicas p12-2; ■: plantas transgénicas p12-3.

La infección de TMV en plantas de tabaco que poseen el gen de resistencia dominante N provoca una respuesta hipersensible (HR) con formación de lesiones necróticas muy marcadas en las hojas inoculadas. Se acepta generalmente que existe una correlación entre el tamaño de las lesiones y el grado de resistencia, siendo que cuanto más pequeñas son las lesiones, más resistentes son las plantas. Además, los factores externos y/o internos pueden influenciar la respuesta mediada por el gen N. Para determinar si la HR contra TMV estaba afectada en las plantas p12, se midieron el tamaño y el número de las lesiones necróticas formadas en las hojas inoculadas luego de 5 días post-infección. No se encontraron diferencias significativas con respecto al número ni al tamaño de las lesiones entre las plantas p12 y control (Fig. 31 y ver también la Tabla II).

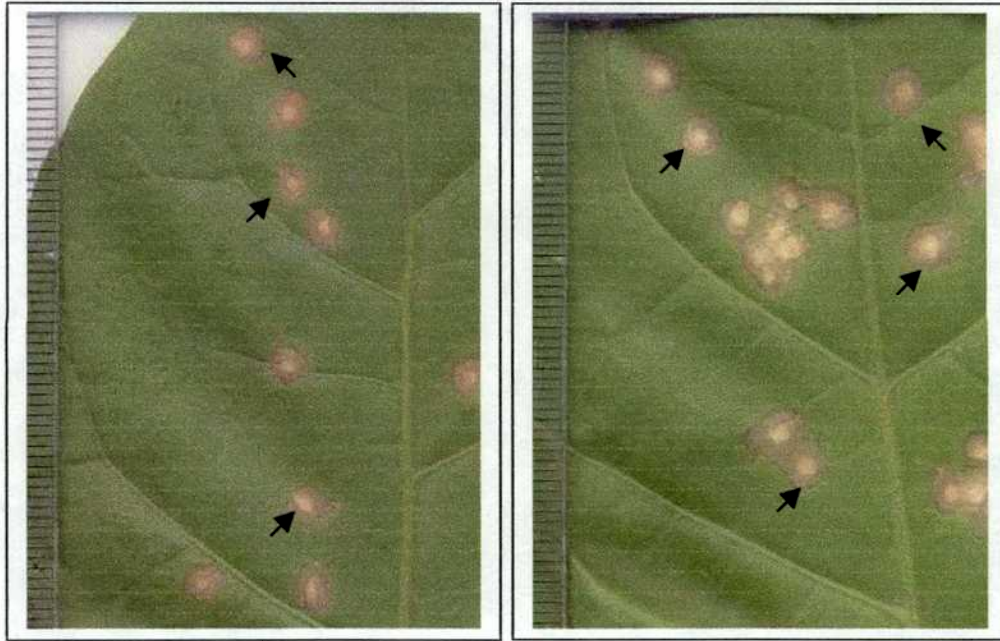


Fig. 31. Hojas de plantas transgénicas p12 y control inoculadas con TMV. La infección se evaluó según el número y el tamaño de las lesiones necróticas formadas. No se observaron diferencias con respecto a las plantas control hasta 12 DPI. Foto de la izquierda: hoja de planta control no transgénica inoculada con TMV. Foto de la derecha: hoja de planta p12-3 inoculada con TMV. Las flechas indican las lesiones necróticas HR provocadas por la infección de TMV.

6. Caracterización de la respuesta defensiva presente en las plantas p12

6.1. Determinación del nivel de transcripto transgénico en presencia del virus

Una de las respuestas defensivas más efectiva y específica contra virus que ha sido caracterizada en plantas está mediada por un mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS, según la sigla inglesa). En trabajos previos se demostró que la infección de plantas de tabaco por PVX induce una respuesta de PTGS, la que se detecta por la presencia de RNAs de 20 a 25 nucleótidos derivados del genoma de PVX en las células infectadas (Hamilton y Baulcombe, 1999). Sin embargo, se encontró que la proteína p24 codificada por el virus es capaz de suprimir el mecanismo de PTGS y de permitir el desarrollo de la infección (Voinnet *et al.*, 2000). La presencia de mRNAs con secuencias homólogas a las virales en una planta transgénica, aumenta la probabilidad de que se inicie el fenómeno de PTGS cuando las células son infectadas con el virus del que deriva el transgen (Kooter *et al.*, 1999).

Se evaluó la posible presencia de un mecanismo de degradación específica de RNA comparando la acumulación de mRNA correspondiente al transgén en muestras de plantas p12 sanas y previamente infectadas con PVX. Estas últimas mostraban los signos de resistencia descritos en la Fig. 28 y en la Tabla I. Como controles se tomaron muestras equivalentes de plantas p12 sanas y de plantas no transgénicas, sanas e infectadas con PVX. La presencia de mRNA del ORF3 era detectada en las plantas transgénicas antes de la infección (Fig. 9). Este hecho indicaba claramente que, de existir silenciamiento durante la respuesta defensiva, la misma sería desencadenada a partir de la replicación de PVX en las células p12. Consecuentemente, en el momento de iniciarse PTGS debería haber cuatro especies de RNAs conteniendo la secuencia del ORF3: el transgen, el gRNA viral y los sgRNA1 y sgRNA2 del virus. Durante la co-supresión, las cuatro especies serían blancos de degradación específica. El análisis de las intensidades de las bandas correspondientes al mRNA transgénico mediante densitometría de imagen indicó que los valores relativos eran similares en plantas p12 infectadas y sanas (Fig. 32). Para estimar la intensidad de la banda correspondiente al mRNA transgénico en la planta p12 infectada con PVX, se restó el valor de la señal de fondo proveniente del chorreado de RNA viral de la misma muestra (Fig. 32 C). Para demostrar que no existían bandas provenientes del virus que coincidiesen con la banda del mRNA del transgen se realizaron dos autoradiografías con diferentes tiempos de exposición. Los resultados, que se muestran en la Fig. 32, indicaron que no existía una degradación específica de los mRNAs que contenían la secuencia del ORF3, como debería esperarse en presencia de una respuesta basada en PTGS. Además, el tamaño de la banda observada en el ensayo de *Northern* indicó que provenía del mRNA del ORF3 y no del RNA viral o de sus derivados. Por otra parte, tanto en plantas p12 como en las controles infectadas con PVX se observó una prominente señal positiva proveniente de los RNAs virales. La cantidad de RNA viral en la planta p12 fue considerablemente menor en comparación con las plantas control, como era de esperarse debido a la presencia de una respuesta defensiva en las plantas transgénicas. Esta disminución de los RNAs virales coincidía con los resultados presentados en la Fig. 28.

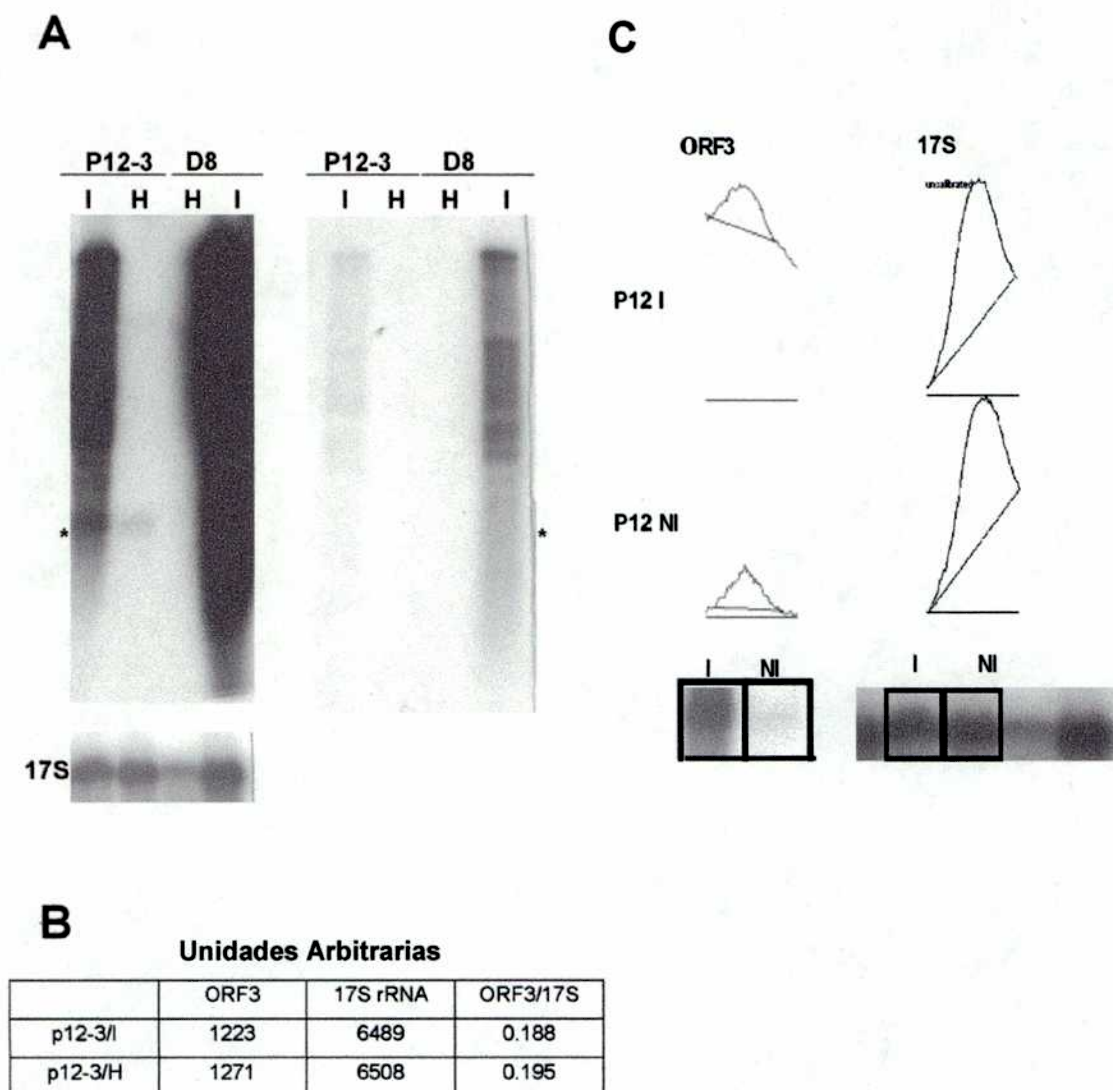


Fig. 32. Estimación semicuantitativa de las intensidades de las bandas correspondientes al transgen mediante análisis de *Northern*. A) las muestras de RNA total fueron obtenidas de plantas sanas (H) o infectadas (I) con PVX a los 14 DPI y corresponden a la tercera hoja superior sistémica de plantas control (D8) y p12-3 (p12-3). La membrana fue hibridada con la sonda radiactiva del fragmento ORF3 (ORF3), y luego re-hibridada con una sonda correspondiente a RNA ribosomal (17S). La placa autoradiográfica de la izquierda y de la derecha corresponden a 12 y 4 h de exposición, respectivamente B) Valores obtenidos mediante análisis de densitometría de imagen de las bandas correspondientes al ORF3 y a rRNA de 17S en plantas p12-3 sana e infectada. C) Análisis de las intensidades de las bandas mediante el Software NIH Scion Image. Las áreas delimitadas por las curvas en los gráficos corresponden a las intensidades de las bandas indicadas en la imagen del análisis de *Northern*.

6.2. Ensayo de co-infección PVY-PVX en plantas p12

Se ha reportado que las proteínas HC-Pro de los *Potyvirus* actúan como supresoras del establecimiento del PTGS (Anandalakshmi *et al.*, 1998). Si la resistencia hacia PVX observada en plantas p12 estuviera mediada por un mecanismo de silenciamiento génico, la co-infección de PVX y PVY en las plantas p12 revertiría la resistencia hacia PVX observada en las plantas p12.

Para evaluar esta posibilidad, se co-infectaron plantas p12 (línea p12-3) con PVX y PVY y se midió acumulación de PVX en muestras correspondientes a la tercera hoja superior mediante ensayos de ELISA. Como se muestra en la Fig. 33, la curva de acumulación de PVX en función del tiempo en plantas p12 co-infectadas fue similar a la presentada en la Fig. 28 y en la Tabla I. A pesar de mostrar severos síntomas provocados por PVY en las hojas superiores, estos resultados sugirieron que las plantas p12 seguían siendo resistentes a la infección de PVX. Probablemente, la mayor severidad de los síntomas provocados por la co-infección PVX-PVY originó un perfil de valores más disperso en las curvas del curso temporal de acumulación viral, tanto en plantas controles como transgénicas, en comparación con las curvas de infecciones individuales por PVX (Fig. 28). Por esta razón, se graficaron los datos correspondientes a plantas individuales de dos experimentos independientes. Estos resultados indican nuevamente que la respuesta defensiva de las plantas p12 hacia PVX no estaría mediada por un fenómeno de silenciamiento génico.

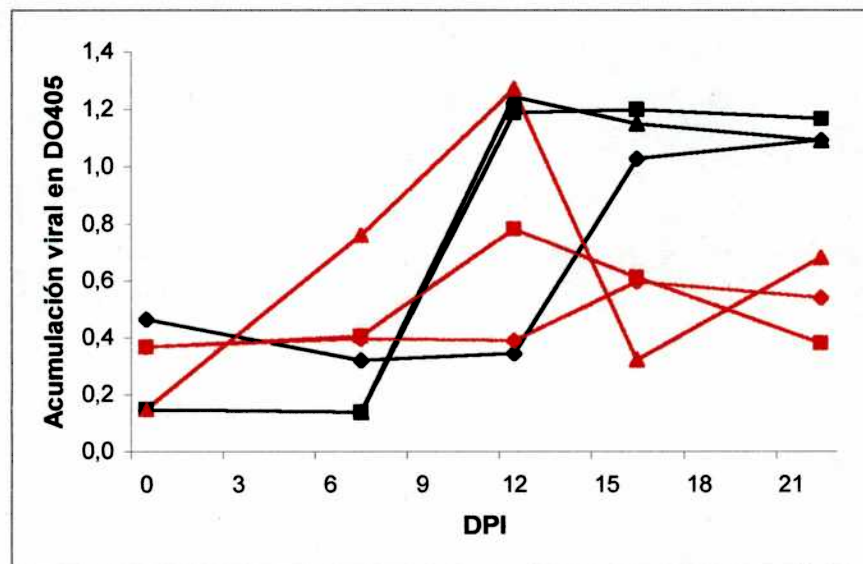


Fig. 33. Curso temporal de la acumulación viral en hojas de tabaco co-infectadas con PVX y PVY. Se determinó la acumulación viral en la tercera hoja superior mediante ensayos de ELISA a los tiempos indicados. Número de plantas ensayadas: D8 = 3; p12-3 = 3. Símbolos negros: plantas *N. tabacum* Xanthi D8 NN. Símbolos rojos: plantas p12-3. Cada símbolo representa una planta individual. Los datos corresponden a dos experimentos independientes y los valores fueron normalizados respecto del valor obtenido a los 22 DPI en plantas control.

6.3. Ensayo de re-inoculación con PVX

Si la resistencia a PVX hubiera sido mediada por un mecanismo de PTGS, se esperaba que por un determinado período de tiempo las plantas mostrasen signos de inmunidad o no-susceptibilidad a la infección por PVX a nivel sistémico. Para evaluar esta posibilidad, se inocularon hojas de plantas p12 previamente infectadas con PVX con el mismo virus. A los 14 DPI de la primera infección, las plantas transgénicas mostraban las lesiones asociadas con estado de resistencia, tanto en hojas inoculadas como en hojas superiores no inoculadas. En cambio las hojas jóvenes superiores no mostraban síntomas y no se detectó la presencia del virus mediante ensayos de *Western blot*. En este tiempo, se re-inocularon las hojas jóvenes asintomáticas. Las lesiones asociadas a la resistencia se desarrollaron a los 7 DPI, indicando la ausencia de un estado de resistencia local en estas hojas.

Paralelamente, se determinó el curso temporal de la acumulación viral en hojas re-inoculadas con PVX de plantas previamente infectadas. Como se muestra en la Fig. 34, el perfil de las curvas correspondientes a las plantas control y p12 fue similar. Tampoco hubo diferencias entre plantas previamente infectadas y plantas inoculadas por primera vez. Estos datos constituyeron una fuerte evidencia de que en el mecanismo de la resistencia observada no estaría involucrado un fenómeno de PTGS, como así tampoco una respuesta SAR (ver punto 9).

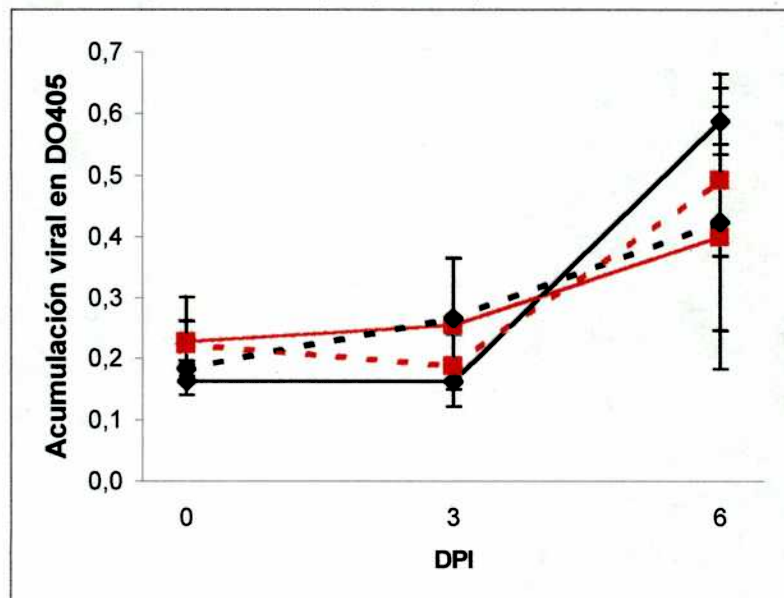


Fig. 34. Curso temporal de la acumulación viral en hojas de tabaco pre-infectadas con PVX. Se representan los valores obtenidos en ensayos de ELISA de muestras provenientes de las hojas re-inoculadas. Número de plantas ensayadas: D8 control = 2; p12-3 control = 2; D8 Pre-infectada = 5; p12-3 pre-infectada = 4. Los datos corresponden a un único experimento. ♦: Plantas *N. tabacum* Xanthi D8 NN; ■: plantas p12-3. Las líneas continuas corresponden a las plantas controles. Las líneas discontinuas corresponden a plantas pre-infectadas. Las barras indican la desviación estándar. Las plantas pre-infectadas fueron inoculadas a los 14 DPI.

7. Detección de marcadores bioquímicos asociados a la respuesta HR en plantas p12 infectadas por PVX

Para determinar si las lesiones necróticas observadas en las hojas de plantas p12 infectadas con PVX eran consecuencia de algún mecanismo asociado con la respuesta HR, se analizaron hojas de las mismas mediante tinción con colorantes específicos para callosa y lignina. La acumulación de estos compuestos es un marcador bioquímico asociado a las lesiones HR. Como se muestra en la Fig. 35 se observaron depósitos de callosa y de lignina en las paredes celulares de la zona de las lesiones. Dichas tinciones no se observaron en plantas no transgénicas sanas o infectadas con PVX, ni tampoco en plantas p12 sanas. Además, las observaciones de discos de hojas bajo luz UV mostraron la presencia de una intensa autofluorescencia en las lesiones provocadas por PVX, indicando la acumulación local de componentes fenólicos, como sucede normalmente en lesiones HR provocadas por la infección con TMV (resultados no presentados).

8. Inducción de genes PR en plantas p12 luego de la infección PVX

Las proteínas PR ácidas son marcadores clásicos de la respuesta HR (Brederode *et al.*, 1991). Con el fin de caracterizar la respuesta defensiva observada en plantas p12, se tomaron muestras de hojas infectadas con PVX para determinar los niveles de expresión de los genes PR. Como se muestra en el análisis de *Northern* de la Fig. 36, se observó inducción de los genes PR1a, PR2 y PR3 en hojas de plantas p12 infectadas con PVX. También se detectaron las bandas correspondientes a los mRNAs de los genes PR1a y PR2 en las hojas superiores de plantas infectadas que todavía no presentaban síntomas y en las cuales no se detectó la presencia de virus. No se observaron bandas correspondientes a genes PR en los controles de plantas no-transgénicas sanas o infectadas con PVX, como así tampoco en plantas p12 sanas. Como control positivo de la respuesta HR, se incluyeron muestras de plantas no-transgénicas infectadas con TMV.

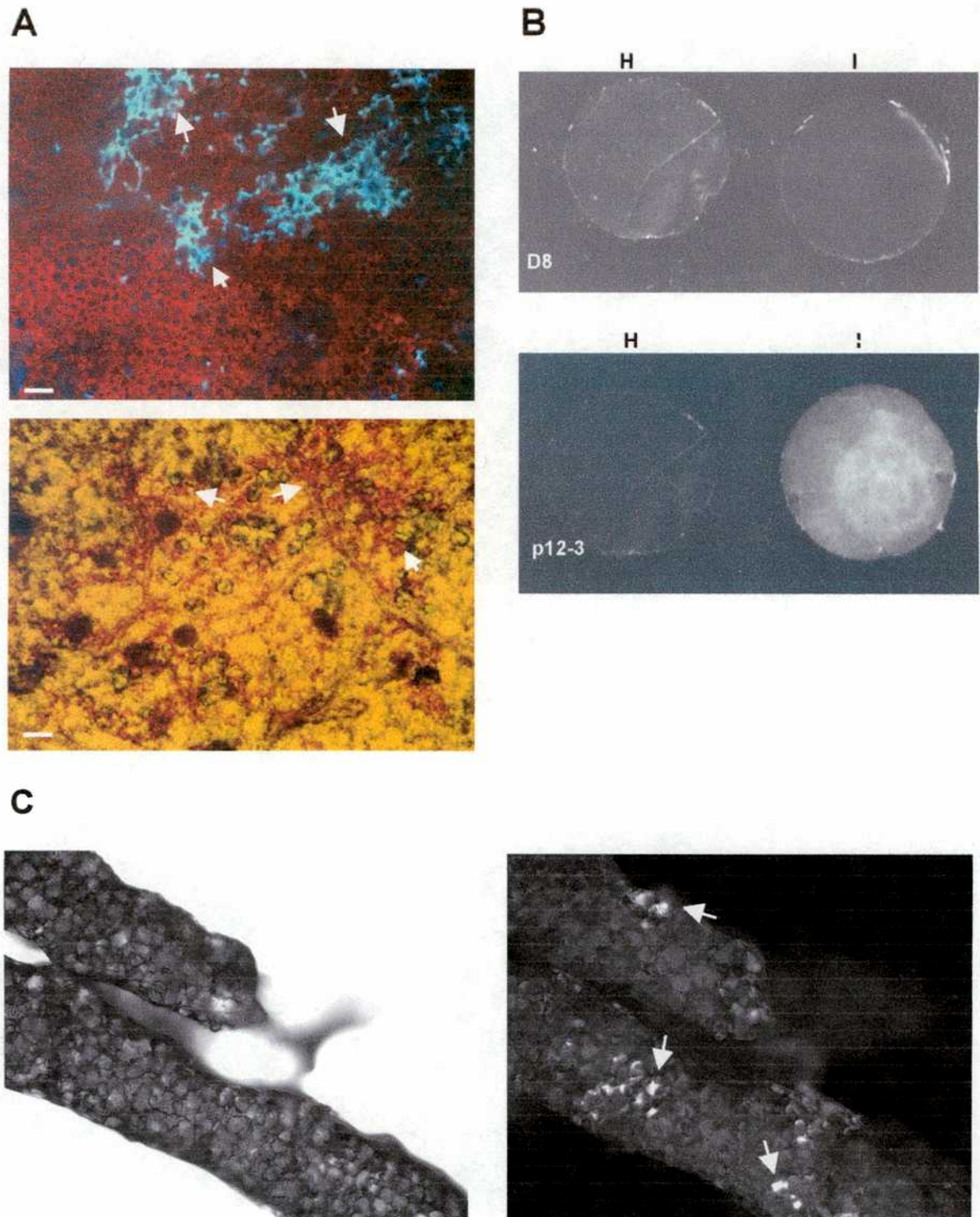


Fig. 35. Acumulación de callosa, lignina y componentes fenólicos en hojas de plantas p12 infectadas con PVX. A) Lesiones teñidas con 0,1 % de Aniline Blue (panel superior, color azul) o con 0,1 % de Safranina (panel inferior, color rojo) mostrando depósitos de callosa y de lignina (indicados con flechas) respectivamente. Barras = 70 μ m. B) Discos de hojas (diámetro = 1 cm) sanas (H) o infectadas con PVX (I) provenientes de plantas de *N. tabacum* Xanthi D8 NN (panel superior) o p12-3 (panel inferior). Los discos de hojas fueron iluminados con luz UV de 365 nm y fotografiados. La fluorescencia de los componentes fenólicos aparece como anillos concéntricos de color blanco. Las muestras se obtuvieron a 16 DPI. C) Cortes transversales de hojas p12 teñidos con 0,1 % de Aniline Blue. La sección conteniendo a los anillos concéntricos fue cortado transversalmente y observado bajo luz visible (izquierda) y luz UV (derecha), en microscopio de epifluorescencia. Nótese que la callosa se deposita en las regiones epidérmica y del mesófilo (indicadas con las flechas).

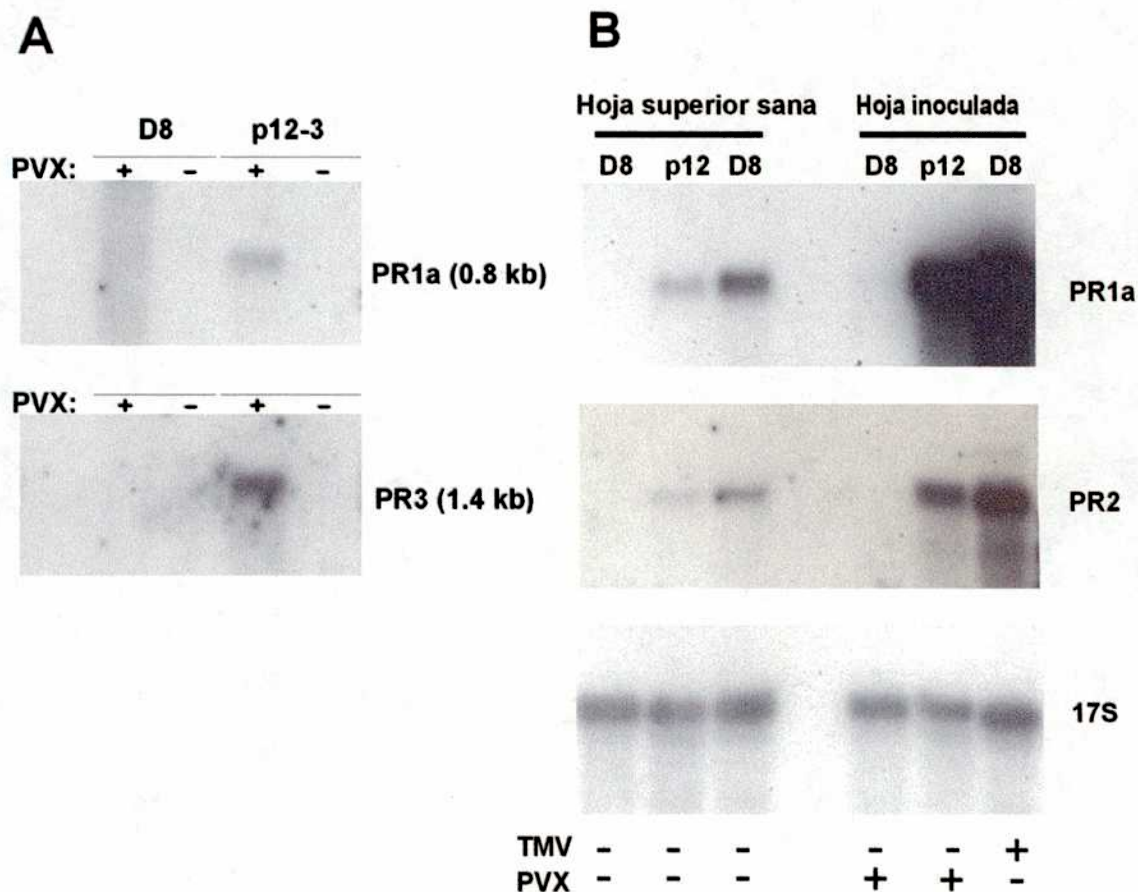


Fig. 36. Inducción de mRNAs de genes PR en plantas p12. A) Análisis de *Northern* usando como sondas fragmentos radioactivos de cDNA correspondientes a las secuencias de PR1a y PR3. Las muestras fueron purificadas de las hojas de plantas control (D8) y p12 (p12-3) infectadas con PVX. En el momento de la recolección de las hojas, las plantas control mostraban el síntoma típico de mosaico amarillo y las plantas p12-3 lesiones en forma de anillos concéntricos. B) Análisis de *Northern* correspondiente a muestras provenientes de hojas inoculadas y de hojas superiores libres de virus (no infectadas) a los 16 DPI. Se incluyeron como control de inducción de genes PR, muestras de hojas de plantas control inoculadas con TMV. La presencia o ausencia de los respectivos virus fue confirmada mediante ensayos de *Northern* o *Western blot* y se indica como (+) o (-), respectivamente. 17S: control interno de la cantidad de RNA sembrado en el gel, detectado con la sonda específica para RNA de 17S.

9. Ensayo de SAR en plantas p12

Como se mencionó en la Introducción, la respuesta HR precede generalmente al establecimiento de otra respuesta más general denominada SAR. Las lesiones de tipo HR en las hojas infectadas, la presencia de los marcadores asociados a HR como la callosa, lignina, y la expresión de genes PR, hizo suponer la presencia de la respuesta SAR en plantas p12 infectadas con PVX. Para evaluar esta posibilidad, se inocularon con PVX o TMV las hojas inferiores de plantas p12 y control (quinta hoja superior). A

los 10 días de la primera inoculación, las hojas superiores (tercera hoja superior) de las mismas plantas fueron re-inoculadas con TMV. En este momento ya se observaban síntomas asociados a HR en las hojas infectadas con TMV (tanto en las plantas control como en las p12) y lesiones de anillos concéntricos en las hojas de las plantas p12 infectadas con PVX. Para determinar la presencia de SAR, se midió el tamaño de las lesiones HR originadas por la re-infección con TMV en las hojas superiores. Como se muestra en la Tabla II, tanto en plantas control como en plantas p12 inicialmente infectadas con TMV, se observó una reducción en el tamaño promedio de las lesiones necróticas provocadas por TMV, lo que es indicativo de la presencia de SAR (Ross, 1961). En cambio, tanto en las plantas control como en las plantas p12 infectadas inicialmente con PVX, no hubo reducción del tamaño promedio de las lesiones provocadas por la segunda inoculación, sugiriendo la ausencia de SAR en estas plantas. Estos resultados concordaron con lo observado en el experimento de re-inoculación con PVX detallado en el punto 6-3, en el que se había observado que las plantas p12 pre-infectadas con PVX eran susceptibles a la re-infección por el mismo virus.

Tabla II. Respuestas sistémicas frente a la infección secundaria con TMV en plantas p12 y control

Plantas	D8			p12		
	Buffer	TMV	PVX	Buffer	TMV	PVX
Inoculación primaria						
Diámetro de las lesiones luego de la inoculación secundaria con TMV	4,6 (0,593)	2,7 (0,504)	4,1 (0,53)	4,6 (0,709)	3,2 (0,679)	4,3 (0,692)

Se inocularon plantas control (D8) y p12-3 (p12) en la quinta hoja con PVX, TMV o buffer fosfato. A los 10 días, se re-inoculó la tercera hoja superior con TMV. Luego de 5 días se midió el diámetro de las lesiones formadas en las hojas re-inoculadas (n=20). Los datos corresponden al promedio de dos experimentos independientes y los diámetros se expresan en mm. Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar. Las diferencias entre los valores de TMV y PVX, tanto para las plantas D8 como para las p12 resultaron significativas de acuerdo con el test de Student.

10. Determinación de la tasa de movilización viral célula-célula en plantas p 12 infectadas con PVX

10.1. Ensayo de inoculación localizada

En los ensayos realizados con protoplastos (ver Fig. 29) se había descartado la inhibición de la replicación viral como posible causa de la resistencia observada en las plantas p12. Por ende, quedaba por determinar si la tasa de movilización viral en las mismas no se encontraba afectada. Uno de los métodos usados para medir la tasa de movilización viral fue la técnica de *spot-inoculation* o inoculación localizada del virus (ver Materiales y Métodos). La técnica consiste en inocular al virus en una zona bien delimitada de la hoja utilizando la base de una pipeta Pasteur, de manera tal que la inoculación se restringe a las células en contacto con el borde de la base de la pipeta (Hooker y Bensen, 1960; Konte y Fritig, 1984; Wisniewski *et al.*, 1990). Luego, se tomaron muestras que se superponían al área de tejido inoculado (denominada "interna") y a la región del tejido circundante a la interna (denominada "externa") haciendo uso de sacabocados de diferentes tamaños (Fig. 37). De esta manera, por cada sitio de inoculación localizada se tomó un disco de tejido del tamaño de la base de la pipeta con que se inoculó y un anillo que rodeaba al mismo. Luego, se midieron los niveles de infección en ambas muestras mediante ensayos de ELISA. De existir una disminución de la tasa de movilización viral en la planta p12, se esperaba una menor acumulación viral en el área de tejido externa. Sin embargo, cuando se analizaron los resultados se comprobó que no existieron diferencias significativas en cuando a la acumulación viral en las muestras de tejido externo entre plantas control y p12. Considerando que a los 4 DPI todavía no se observaron lesiones de tipo HR, y que las muestras fueron recolectadas en este intervalo, cabía la posibilidad de que no se hubiera establecido aún el mecanismo de resistencia y que, por esta razón, no se hubiera detectado alteración alguna en la tasa de movilización. Por lo tanto, se repitieron los experimentos tomando las muestras a los 8 DPI. Llamativamente, tal vez debido a la menor cantidad de virus requerida para infectar con este método, a los 8 DPI no se observaban lesiones de tipo HR. Como en el caso anterior, el análisis de los datos indicó que no existían diferencias entre las plantas control y las p12. Estos datos concuerdan con los resultados que se muestran en la Fig. 28, en que se observa un curso temporal de acumulación viral similar en la infección local entre las plantas transgénicas y control.

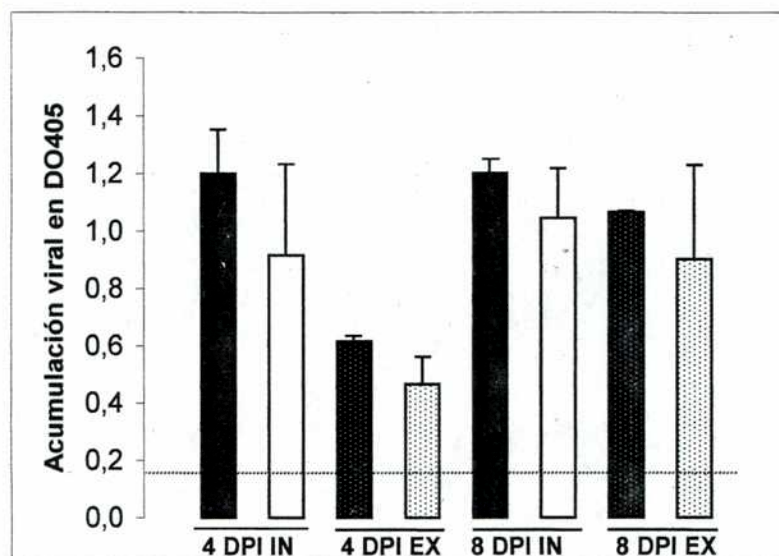


Fig. 37. Ensayo de inoculación localizada. Se indican los datos correspondientes para cada planta y cada región de la hoja. Cada barra corresponde al valor promedio obtenido de dos plantas. Se tomaron dos discos de hoja por planta. Las barras negras y barras negras con puntos corresponden a plantas controles D8. Las barras blancas, con o sin puntos negros corresponden a plantas transgénicas p12-3. IN: disco interno. EX: disco externo. Con la línea discontinua, se indica el valor promedio del control negativo. En cada barra se indica la desviación estándar.

CAPITULO 1

DISCUSION

DISCUSSION

La obtención de plantas transgénicas de tabaco transformadas con el gen ORF3 de PVX permitió cumplir con uno de los objetivos propuestos inicialmente. La expresión del transgen fue confirmada en diferentes líneas de plantas p12 mediante análisis de *Northern blot*, pero no se pudo obtener evidencia directa sobre la presencia de la proteína p12 en las mismas. Todos los intentos y estrategias empleadas para la producción de antisueros anti-p12 efectivos fracasaron. El antisuero obtenido a partir de inocular conejos con proteína p12 expresada en *E. coli* (anti-p12 C1) fue el único que logró detectar a la proteína p12 expresada en células sf9, pero no pudo determinarse con certeza su especificidad hacia el propio antígeno producida en bacterias. Además, el anti-p12 C1 no pudo detectar a la proteína p12 en extractos obtenidos de plantas transgénicas o de plantas infectadas con PVX.

Debido a la importancia que tenía determinar la localización subcelular de la proteína p12 para el estudio de sus funciones, se siguieron buscando formas alternativas para producir antisueros anti-p12 apropiados. Primeramente, se intentó emplear el método basado en la inoculación de DNA, y luego expresar e inocular una proteína fusión conteniendo la región más antigénica de la proteína p12. Tanto las inoculaciones realizadas con los plásmidos, como con la proteína MBP fusionada a la región hidrofílica de p12 no permitieron obtener antisueros apropiados para la detección de la proteína p12 en extractos de plantas transgénicas o de plantas infectadas. Estos anticuerpos tampoco fueron capaces de detectar a la proteína p12 expresada mediante el sistema de baculovirus.

Debido a la naturaleza hidrofóbica de la proteína p12, era posible que los métodos convencionales de extracción no fueren efectivos para permitir su detección mediante el ensayo de *Western blot*. En este sentido, era posible pensar que las paredes celulares interfirieran tanto en los pasos de purificación como de inmunodetección. Los resultados negativos obtenidos en ensayos realizados con protoplastos indicaron que la principal causa de la falta de detección de la proteína p12 no se debía tampoco a alguna interferencia durante el proceso de extracción sino, muy probablemente, a la pobre calidad del antisuero utilizado.

Coincidentemente con estos intentos fallidos, en ningún otro laboratorio se ha podido hasta el momento obtener antisueros con la capacidad de detectar a la proteína p12 (o

su equivalente de otros grupos virales), en plantas transgénicas o plantas infectadas. Se han esgrimido distintas explicaciones con respecto a estas dificultades. Una posibilidad es que la cantidad de la proteína p12 que se produce en las células vegetales sea muy escasa, dificultando su detección y exigiendo al mismo tiempo la utilización de anticuerpos de muy alta afinidad para lograr este propósito.

Teniendo en cuenta la alta conservación de las secuencias aminoacídicas de la región hidrofílica de las proteínas TGB2, y considerando que la mayoría de los anticuerpos reconocen epitopes presentes en dominios hidrofílicos del antígeno, es también posible que las proteínas TGB2 sufran modificaciones post-traduccionales en las células vegetales que cambien sus propiedades antigénicas. De ser así, los anticuerpos contra antígenos obtenidos en otros sistemas no reconocerían al antígeno expresado en la planta. Por otro lado, estas hipotéticas modificaciones deberían existir exclusivamente en las células vegetales, puesto que la proteína p12 expresada en células de insecto (que realizan todas las modificaciones post-traduccionales convencionales), puede ser reconocida por los antisueros producidos en el presente trabajo. Por el momento, no se conocen datos acerca de posibles modificaciones post-traduccionales en las proteínas TGB2.

A pesar de no disponerse de un antisuero anti-p12 apropiado para la detección de la proteína en plantas, se pudo concluir que el mRNA de ORF 3 expresado en plantas transgénicas es correctamente traducido en proteína p12 funcional. Esta conclusión se basa en los resultados de los ensayos de trans-complementación, en los que se demostró que las plantas transgénicas p12 pueden aportar en *trans* las funciones correspondientes a una versión de PVX delecionado en el ORF 3. Se han publicado reportes con resultados similares usando versiones mutantes de PVX o de otros potexvirus (Verchot *et al.*, 1998; Lough *et al.*, 2000; Tamai y Meshi, 2001).

A simple vista, los parámetros morfológicos y fisiológicos de las plantas p12 fueron comparables a los de las plantas control. Sin embargo, cuando se examinaron cortes histológicos de hojas maduras de plantas transgénicas p12, se observó una marcada alteración de los tejidos. Esta se caracterizaba por la presencia de amplios espacios intercelulares en la región donde se ubican las células del mesófilo esponjoso y por la aparición de restos celulares y de células parcialmente degradadas con paredes más delgadas y organelas desorganizadas. Sorprendentemente, cuando se examinaron hojas jóvenes de la misma planta, no se observó este tipo alteración histológica. Este

fenotipo fue encontrado en las hojas maduras de las dos líneas transgénicas analizadas (p12-3 y p12-2).

Las observaciones hechas en los cortes histológicos de hojas sugieren que las alteraciones se establecen en forma progresiva, acompañando el proceso de desarrollo de las mismas. Se podrían plantear al menos dos alternativas para explicar la causa de este fenotipo en las plantas p12. Una posibilidad es que la proteína p12 sea tóxica y que, debido a ello, las células del mesófilo sufran alteraciones que induzcan su muerte en forma progresiva, a medida que la proteína viral se acumula en las mismas. Esto podría explicar la aparición exclusiva de dichas alteraciones en las hojas maduras y totalmente expandidas. Sin embargo, no se pudo obtener ningún dato que indique que la acumulación de la proteína transgénica en las plantas p12 sea proporcional a la edad de las hojas. Además, en muchos casos el *turn-over* de proteínas expresadas determina en mayor medida su nivel de acumulación. Esta alternativa tampoco explicaría por qué no se observan alteraciones en otros órganos de la misma planta o en otros tipos celulares de la misma hoja, como las epidérmicas y las parenquimáticas.

Otra posibilidad sería que las alteraciones observadas en las hojas maduras se produzcan como consecuencia de una alteración en la permeabilidad de los plasmodesmos mediada por la proteína p12. Como se explicó en la Introducción General, las hojas sumidero jóvenes poseen mayores valores de MEL en sus plasmodesmos, y permiten el pasaje pasivo de proteína GFP (27 kDa) desde el floema hacia las células del mesófilo. En cambio, se observó que en las hojas fuente maduras la permeabilidad de los plasmodesmos se encuentra más restringida y no permite el pasaje de GFP (Itaya *et al.*, 1998; Oparka *et al.*, 1999). Si la proteína p12 expresada en las plantas transgénicas aumentara la permeabilidad de los plasmodesmos, este efecto tendría poca influencia en las células de las hojas sumidero, ya que los plasmodesmos de las mismas se encuentran naturalmente dilatados. En cambio, la desregulación de la comunicación célula a célula provocada por la dilatación de los plasmodesmos en las hojas maduras fuente podría causar un efecto desfavorable en las mismas ocasionando la muerte de algunas de ellas.

La inoculación de la cepa CP2 de PVX en las plantas de tabaco produce normalmente un síntoma caracterizado por la aparición de un mosaico clorótico suave. Sorpresivamente, la inoculación de la cepa CP2 en las plantas p12 produjo un nuevo síntoma consistente en la formación de anillos concéntricos amarillos bordeados de

una fina franja del tejido necrosado. Dichas lesiones aparecían también en las hojas sistémicas, en forma concomitante con el progreso de la infección viral. Sin embargo, las lesiones dejaban de aparecer en las hojas nuevas, al cabo de unas 4 semanas. Al inocular las plantas p12 con TMV o PVY, no se observó ningún tipo de alteraciones en el desarrollo de los síntomas, sugiriendo que las lesiones surgen específicamente como consecuencia de la inoculación con PVX.

Un estudio detallado de los nuevos síntomas reveló que las hojas infectadas acumulaban componentes normalmente asociados a la respuesta HR, tales como callosa, lignina y componentes fenólicos (Ponz *et al.*, 1986). También se detectó la inducción de los genes de las proteínas PR1a, PR2 y PR3 ácidas, tanto en la hoja inoculada como en hojas sistémicas. Sin embargo, a diferencia de una típica respuesta HR, la aparición de las lesiones asociadas a HR en las plantas p12 fue relativamente más lenta, ocurriendo entre los 7 y 9 días post-inoculación. Además, como se mencionó antes, estas lesiones aparecen también en las hojas sistémicas, pero con una frecuencia decreciente hasta desaparecer por completo.

Como era de esperar frente a una respuesta defensiva de tipo HR, las plantas p12 resultaron ser más resistentes a la infección por PVX. A pesar de que el virus era capaz de movilizarse sistémicamente en las plantas p12, se observó una marcada disminución de la acumulación viral en las hojas superiores a los 16 DPI. En cambio, el nivel de la acumulación viral en las plantas control se mantuvo elevado. El hecho de que las plantas p12 no fueran resistentes a las infecciones provocadas por TMV o PVY demuestra que esta resistencia se instala en forma específica frente a la infección de PVX.

Aunque la aparición de las alteraciones histológicas en las hojas de plantas p12 podría tener alguna relación con la aparición de los síntomas atípicos, no se observó aparición espontánea de lesiones en plantas sanas, indicando que la sola presencia de dichas alteraciones no basta para provocar los síntomas. Por otra parte, en las hojas jóvenes (en las que no se observa dicha alteración) también se observó la formación de lesiones de tipo HR durante el curso de la infección con PVX. El hecho de que las plantas p12 no presenten cambios con respecto de las control cuando son infectadas con TMV o PVY, sugiere también que las alteraciones histológicas presentes en las hojas tendrían poca o mínima participación en la formación de las lesiones provocadas por PVX.

Otra observación proviene del experimento realizado con las plantas de injertos recíprocos. Los resultados de dicho experimento indican que el desarrollo de las lesiones requiere la presencia simultánea de proteína p12 proveniente del transgen y de PVX. Una vez iniciada la respuesta defensiva en la hoja p12 inoculada, las lesiones necróticas no se propagaban desde el pie transgénico al injerto no transgénico, como sería el caso si la misma estuviese mediada por el pasaje de moléculas de señalización.

Según indican los resultados de la transfección de protoplastos de plantas p12, la tasa de replicación de PVX parecería no estar afectada en las células transgénicas. Por lo tanto, se consideró inicialmente que la resistencia observada en las plantas p12 podría deberse más probablemente a la inhibición de la movilización viral. Sin embargo, cuando se analizaron los datos obtenidos en los experimentos de inoculación localizada de virus, no se encontraron diferencias significativas entre las plantas transgénicas y control con respecto a la tasa de movilización viral. Tampoco se observó ningún tipo de disminución en la acumulación viral en las hojas inoculadas. Estos resultados indican que no existiría una disminución de la movilización viral en las hojas p12 y sugieren que la posible causa de la resistencia observada en las mismas se relacionaría con una inhibición en algún otro paso determinante de la patogénesis viral. Por ejemplo, el transporte viral de larga distancia podría encontrarse afectado en las plantas p12, lo cual podría atenuar progresivamente la infección de los tejidos sistémicos, hasta inhibir completamente en las hojas nuevas. Sin embargo, no se pudo reunir ninguna evidencia en este sentido en este Trabajo de Tesis.

Si bien no se pudo determinar la cantidad de la proteína p12 acumulada en las plantas transgénicas, es razonable considerar que la cantidad total de la misma en las plantas p12 infectadas con PVX sería mayor que en las plantas control infectadas. El hecho de que en las distintas líneas p12 no se encontrara ninguna correlación entre los niveles de mRNA del ORF3 y el grado de resistencia indicaría que el mecanismo de la respuesta defensiva es activado una vez que se alcanzada un nivel crítico en la acumulación de proteína p12.

Otro origen posible para esta respuesta específica podría ser la co-expresión atemporal de la proteína p12 transgénica respecto de las otras proteínas virales. A diferencia de lo que ocurre en una planta control, el nivel de expresión de la p12 en las plantas transgénicas infectadas por PVX no se encuentra bajo la regulación temporal y espacial que se requiere para el curso normal de una infección. Esto podría interferir

en las funciones que cumplen las otras proteínas virales, o incluso la propia proteína p12, expresadas por el virus.

Durante el transcurso de este trabajo, se obtuvieron evidencias que indican la ausencia de resistencia mediada por RNA (PTGS) en las plantas p12. En primer termino, no se observaron diferencias significativas en los niveles de mRNA del ORF3 entre muestras provenientes de plantas p12 sanas e infectadas. Tampoco se observó ninguna alteración en la respuesta defensiva inducida por PVX cuando se realizaron co-infecciones de PVX con PVY (el cual codifica la proteína Hc-Pro, supresora del PTGS). Finalmente, los experimentos de re-inoculación con PVX de plantas p12 previamente infectadas en las hojas inferiores indican que no habría una resistencia sistémica mediada por PTGS.

Una característica interesante de las plantas p12 es que la SAR no es activada luego de la infección por PVX. Generalmente, la respuesta SAR se establece a los pocos días de ocurrir una respuesta HR en las hojas inoculada. Este resultado indica nuevamente que la respuesta observada en las plantas p12 contra PVX difiere de una clásica respuesta HR. Sin embargo, se encontró que también había inducciones de los genes PR en las hojas sistémicas sanas de las plantas p12, aunque en mucho menor nivel de acumulación que el detectado en infecciones iniciadas por TMV. Por lo tanto, puede concluirse que la respuesta de las plantas p12 frente a la infección por PVX produce una forma de HR atenuada y con una cinética más lenta de inducción, lo que podría explicar porqué las plantas p12 no pueden inducir normalmente la respuesta SAR.

Curiosamente, no existen reportes previos en la bibliografía sobre fenómenos de resistencia asociados con plantas transformadas con los genes del ORF3 de PVX o de otros potexvirus. Existen por lo menos dos reportes en que se expresan proteínas TGB2 en plantas a partir de secuencias que codifican los ORFs 3 y 4, en una disposición similar a de los virus respectivos (Beck *et al.*, 1994; Lough *et al.*, 1998). En estos trabajos, las dos proteínas TGB2 y TGB3 fueron probablemente sintetizadas a partir de un mRNA bicistrónico en una relación estequiométrica constante, tanto en plantas transgénicas sanas como infectadas. A diferencia de estos reportes, las plantas p12 utilizadas en esta Tesis expresan solamente a la proteína TGB2. Sin embargo, existen otros dos trabajos en que el gen ORF3 fue expresado individualmente en plantas en forma constitutiva (Verchot *et al.*, 1998; Lough *et al.*, 1998). En dichos trabajos no se hace mención a cambios en la sintomatología,

alteraciones histológicas, ni a alguna forma de resistencia a la infección. Es posible que sus autores no hayan estudiado la estructura del tejido foliar ya que las hojas presentan a simple vista una morfología normal. Además, teniendo en cuenta que el tiempo que tarda en inducirse la respuesta tipo HR en las plantas p12 es largo, es probable que la aparición de una posible respuesta defensiva haya pasado desapercibida en ambos casos. Alternativamente, esta discrepancia podría fundamentarse en el hecho de que en esta Tesis se empleó un modelo experimental diferente. Así, los trabajos previos se realizaron con *N. benthamiana*, especie que responde en forma distinta que *N. tabacum* D8 NN frente a una infección de PVX. Además, en los dos reportes mencionados, se trabajó con la cepa UK3 de PVX que provoca síntomas más severos que PVX-CP2, incluyendo ocasionalmente la formación de lesiones necróticas o en forma de anillos. Como se discute en la segunda parte de esta Tesis, los síntomas pueden variar considerablemente dependiendo de factores tales como las cepas del virus y de la especie hospedadora. Sería interesante estudiar los síntomas provocados por distintas cepas de PVX u otros potexvirus en las plantas p12 utilizadas en el presente trabajo.

Bleykasten-Grosshan y sus colaboradores (1997), reportaron la aparición de lesiones atípicas en las hojas de *Chenopodium quinoa* infectadas con BNYVV al sobreexpresar la proteína TGB2 del mismo virus mediante un replicón viral. Además, al sobreexpresar la proteína TGB3 con el mismo enfoque, se bloqueó la formación de síntomas en otras dos especies de plantas. Por analogía con lo descrito en BNYVV, se podría postular que la resistencia contra PVX observada en las plantas p12 se origina en una alteración de la relación estequiométrica entre las proteínas p12 y p8. Ello sugiere nuevamente que el exceso de la proteína p12 libre en las plantas transgénicas infectadas sería el principal causante de la inducción de la respuesta tipo HR.

Una mejor comprensión de los fenómenos observados implica responder a las siguientes preguntas: ¿Por qué la organización de los genes TGB se encuentra tan conservada entre los diferentes grupos virales? ¿Por qué los niveles de expresión de las proteínas TGB2 y de TGB3 son tan bajos en la mayoría de los virus? ¿Cuál es la ventaja evolutiva que presentan el TGB y la estrategia de expresión basada en sgRNAs bicistrónicos? ¿Por qué es crítico mantener la relación estequiométrica de las proteínas p12 y p8 durante la infección?

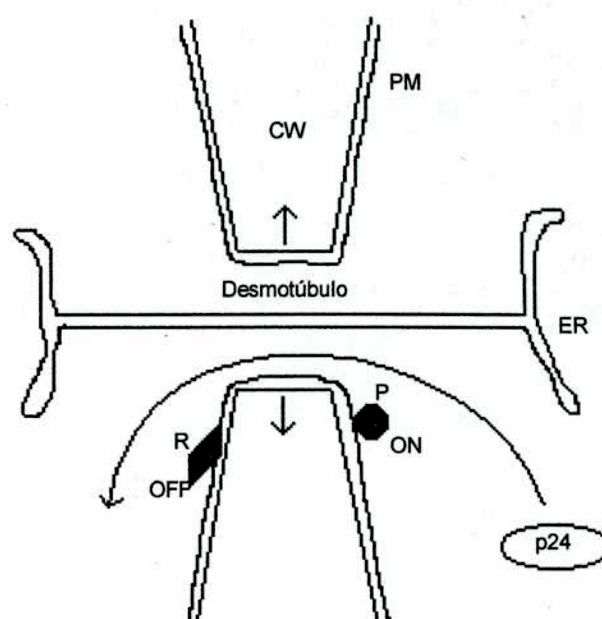
Para contestarlas, se hace imprescindible determinar las posibles funciones de las proteínas p12 y p8 y su localización subcelular e identificar a los factores celulares y virales que interactúan con las mismas. Los resultados reportados por Solovyev y sus colaboradores (2000) indican que la síntesis en forma regulada de estas dos proteínas sería importante para el proceso normal del transporte viral. La alta conservación de la secuencia hidrofílica y de la estructura de las proteínas TGB2, en distintos grupos virales, tiene probablemente un importante significado biológico. Esta conservación no se observa en las proteínas TGB1 ni TGB3, ya que las mismas se pueden clasificar en subgrupos según secuencias primarias (Morozov, *et al.*, 1991; Solovyev *et al.*, 1996; Morozov y Solovyev, 1999). Se destaca, además, que los niveles de expresión de las TGB2 y TGB3 son siempre muy bajos durante la infección. Parecería que los virus poseedores de TGB hubieran adoptado una estrategia que le permite co-expresar a estas dos proteínas hidrofóbicas en forma coordinada y en una relación estequiométrica establecida.

Según un trabajo reciente de Tamai y Meshi (2001), la proteína p8 de PVX no sería indispensable para la movilización del virus, y su ausencia puede compensarse mediante la sobreexpresión de la proteína p12. Los autores proponen que la proteína p8 tendría un papel facilitador de las funciones de otras proteínas virales, particularmente la de p12. Según estos autores, la p12 participaría directamente en la movilización, dilatando los poros de los plasmodesmos. Por otra parte, los potexvirus han evolucionado de tal manera que los niveles de ambas proteínas sean bajos y guarden una relación establecida. Si tomamos en cuenta esto dos hechos, se podría postular que la proteína p12 sería indispensable para la movilización viral, pero que al mismo tiempo sería potencialmente capaz de inducir respuestas defensivas en la planta jugando en este caso el papel de un factor de avirulencia. En un nivel más general, podría pensarse que los mecanismos evolutivos han seleccionado un sistema que permita expresar a estas proteínas en un nivel mínimo para no inducir respuestas desfavorables para el virus. En este contexto, la función de la proteína p8 sería aumentar la eficiencia de las funciones desempeñadas por la escasa cantidad de proteína p12 y contribuir a su localización subcelular durante la infección.

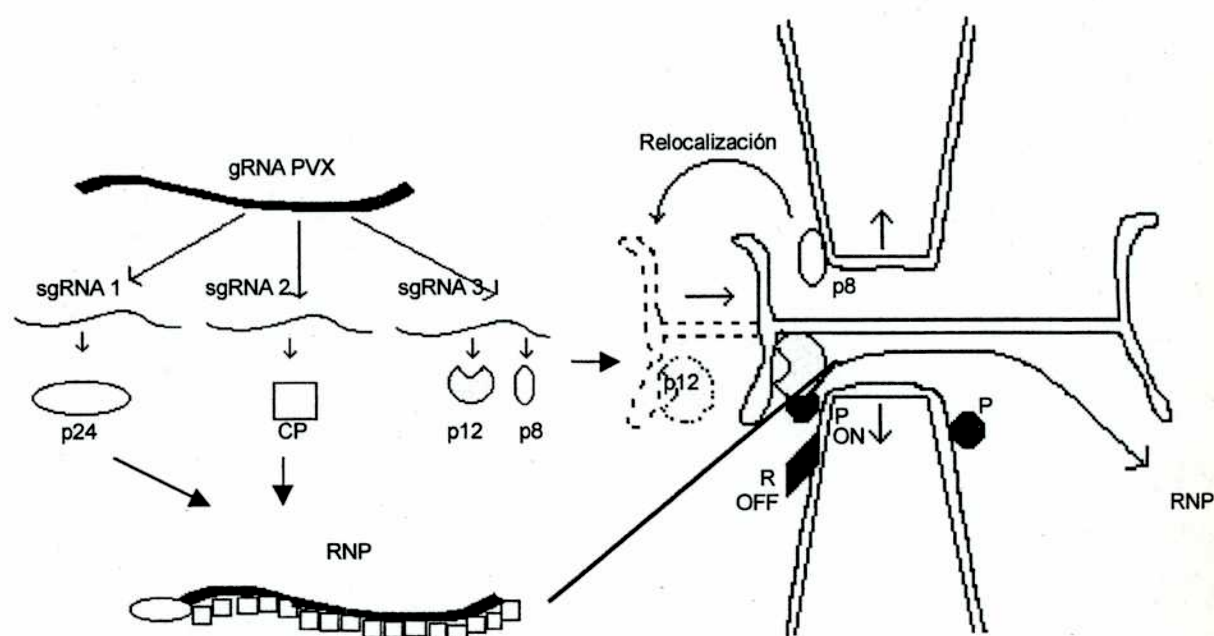
Considerando los puntos discutidos anteriormente, se ha intentado resumir los datos obtenidos en el siguiente modelo hipotético de transporte (Fig. 38). Normalmente los plasmodesmos de una planta control estarían "cerrados". El poro de los mismos es atravesado por el desmotúbulo, que es la continuación estructural del ER de las células adyacentes. El modelo postula la presencia de un posible receptor situado en

el plasmodesmo (P), que cumpliría la función de reconocer MPs y desencadena la dilatación del poro activándose al estado "ON" (Kragler *et al.*, 1999). Se incluye también la presencia de una proteína hipotética de tipo R. La activación de la proteína R desencadenaría la respuesta HR. Por conveniencia esta proteína se representa en una localización cercana a los plasmodesmos, y puede interactuar o no con la proteína receptor (P) de los plasmodesmos. Cuando se expresa la proteína p24 en una planta control (Fig. 38 A), la proteína es capaz de activar al receptor P ("ON") y dilatar el poro. Esta proteína sería capaz de moverse de una célula a la otra, sin activar a la proteína R. Una infección de PVX en una planta control, se expresa el conjunto de las proteínas virales (Fig. 38 B). Por un lado, se forma el complejo riboproteico de transporte conformado por la proteína p24, la CP y el gRNA (RNP). La proteína p12 se localizaría inicialmente en las membranas del ER (Solovyev *et al.*, 2000). La proteína p8 se localizaría en la membrana plasmática (PM) y en la pared celular (CW), en las cercanías del poro de plasmodesmo (Hefferon *et al.*, 1997). La presencia de la proteína p8 provocaría una re-localización subcelular de la proteína p12 hacia el poro, activando al receptor P para la dilatación del poro de plasmodesmo. De esa manera, el RNP se transportaría de una célula a la otra, mediante interacciones con las proteínas p12 y p8 (Yang *et al.*, 2000, Lawrence y Jackson 2001). La poca cantidad de la proteína p12 presente en el plasmodesmo no alcanzaría para activar a la proteína R. En una planta transgénica p12 sana (Fig. 38 C), habría una acumulación de proteína p12 en las membranas del ER. Algunas moléculas podrían activar al receptor P, dilatando al poro de plasmodesmo y eso podría ocasionar las alteraciones fisiológicas provocando la muerte de algunas células. En una planta transgénica p12 infectada por PVX (Fig. 38 D), la proteína p12 se acumularía en mayor cantidad que una planta transgénica p12 sana y, en presencia de la proteína p8, las moléculas de p12 se re-localizarían en las cercanías del plasmodesmo. Las moléculas de p12 no solamente activarían al receptor de P, sino también a la proteína R, desencadenando la respuesta HR. Con este modelo se intenta explicar también la especificidad de la respuesta defensiva observada en las plantas p12.

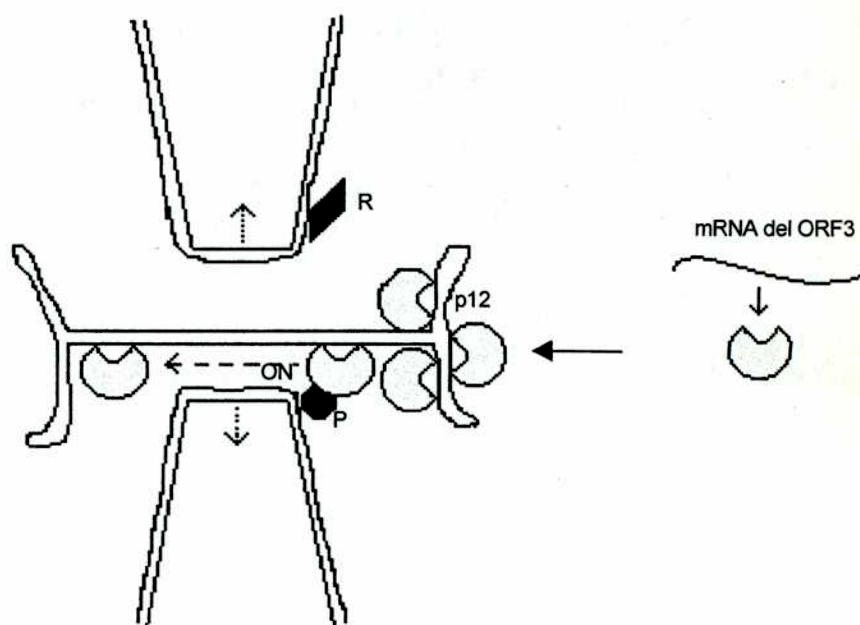
A. Plantas control transformada con la proteína p24



B. Plantas control infectadas con PVX



C. Plantas p12



D. Plantas p12 infectada con PVX

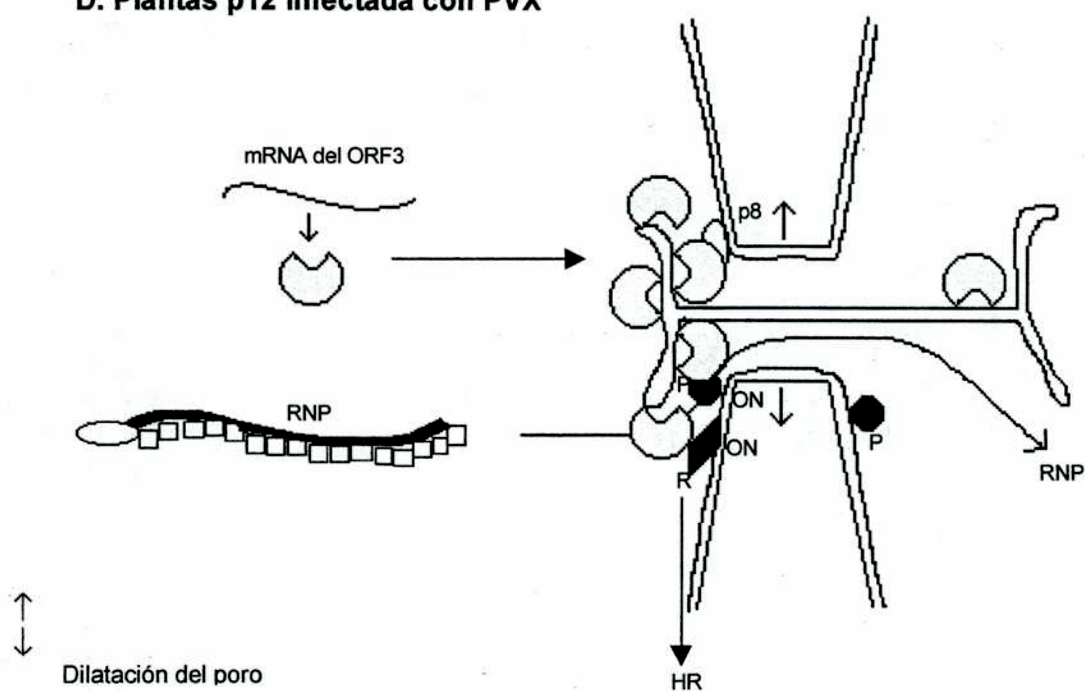


Fig. 38. Modelo hipotético del transporte de PVX en plantas *N. tabacum* Xhanti D8 NN y en plantas transgénicas p12. RNP: complejo RNA-Proteína. CW: pared celular. PM: membrana plasmática. P: receptor del plasmodesmo. R: gen de resistencia HR. Las flechas arriba y abajo indican la dilatación del poro de plasmodesmo. HR: respuesta hipersensible. ON: el mecanismo se encuentra activado (OFF es desactivado).

CAPITULO 2

CAPITULO 2

INTRODUCCION

INTRODUCCIÓN

1. La proteína p24 de PVX

La proteína p24 de PVX está codificada por el ORF2 del genoma viral y corresponde a la proteína TGB1. Se traduce a partir de un sgRNA de 2,1 kb y se acumula en altas concentraciones, tanto en células infectadas como en células transgénicas. Contiene, al igual que otras proteínas TGB1, un dominio de unión a nucleótidos (*NTP binding domain*) similar al de las helicasas de DNA celulares (Gorbalenya *et al.*, 1988, Habili *et al.*, 1989) y se ha demostrado que posee actividad ATPasa *in vitro* (Kalinina *et al.*, 1996). Se ha postulado que esta actividad enzimática estaría relacionada con un cambio conformacional rápido dependiente de energía que permitiría romper las interacciones entre el gRNA viral y las proteínas asociadas al mismo durante el pasaje a través de los plasmodesmos. Desde el punto estructural de la proteína p24, se ha propuesto que la hidrólisis de NTP, la unión a RNA y la localización subcelular de la proteína estaría gobernada por el dominio N terminal de la proteína, y que el dominio C terminal estaría involucrado en interacciones específicas con otras proteínas virales (Morozov *et al.*, 1999). La secuencia nucleotídica del gen de la proteína p24 de PVX y la traducción de su respectiva secuencia aminoácidica se muestran en la Fig. 39.

1	ATG	GAT	ATT	CTC	ATC	ATT	AGT	TTG	AAA	AGT	TTA	GGT	TAC	TCT	AGA
1	M	D	I	L	I	I	S	L	K	S	L	G	Y	S	R
	ACT	GCT	AGG	CCT	TTA	GAT	TCC	AGT	CCC	TTA	GTA	GTG	CAC	GCT	GTT
	T	A	R	P	L	D	S	S	P	L	V	V	H	A	V
	GCC	GGT	GCC	GGA	AAG	TCC	ACT	GCA	CTA	CGG	AAG	CTG	CTT	GCA	CGA
	A	G	A	G	K	S	T	A	L	R	K	L	L	A	R
	CAC	TCG	ACC	TTC	ACA	GTA	CAC	ACT	CTT	GGA	GTC	CCA	GAT	AAG	ATC
	H	S	T	F	T	V	H	T	L	G	V	P	D	K	I
	AGT	ATA	AGG	ACC	AGG	GGC	ATA	CAG	AAG	CCA	GGA	CCA	ATC	CCC	GAA
	S	I	R	T	R	G	I	Q	K	P	G	P	I	P	E
	GGC	AAT	TTT	GCC	ATC	CTG	GAC	GAG	TAC	ACG	CTG	GAC	GCA	ACC	ACA
	G	N	F	A	I	L	D	E	Y	T	L	D	A	T	T
	AGG	GAG	GCT	TAC	CAA	GCT	CTC	TTT	GCA	GAT	CCG	TAT	CAG	GCA	CCA
	R	E	A	Y	Q	A	L	F	A	D	P	Y	Q	A	P

GAA	CTC	AGT	CTC	GAG	CCC	CAC	TTC	TAC	TTG	GAA	ACC	TCC	TTC	AGG
E	L	S	L	E	P	H	F	Y	L	E	T	S	F	R
ACC	CCA	ACC	AAA	GCA	GCT	GCC	TTG	ATA	GCT	AGC	TGC	GGC	TTT	GAC
T	P	T	K	A	A	A	L	I	A	S	C	G	F	D
TTT	GAG	ACC	AAT	TCG	CAA	GAA	GAG	GGA	CAC	CTC	GAG	ATC	ACA	GGG
F	E	T	N	S	Q	E	E	G	H	L	E	I	T	G
ATA	TTC	AAG	GGA	CCC	TTG	CTA	GGA	AAG	GTG	ATT	GCC	ATA	GAC	TCA
I	F	K	G	P	L	L	G	K	V	I	A	I	D	S
GAG	GCT	GAA	ACG	ACT	TTG	TCT	AGG	CAC	GGA	GTT	GAA	TTT	GTT	AAG
E	A	E	T	T	L	S	R	H	G	V	E	F	V	K
CCG	TGC	CAA	GTC	ACG	GGT	CTG	GAA	TTC	CCG	GTA	GTC	ACC	ATC	GTG
P	C	Q	V	T	G	L	E	F	P	V	V	T	I	V
TCC	GCA	GCC	CCG	ATC	GAA	GAA	ATT	GGC	CAG	TCC	ACT	CTG	TTC	TAC
S	A	A	P	I	E	E	I	G	Q	S	T	L	F	Y
AAC	GCA	ATC	ACA	AGG	TCG	AAG	GGA	CTG	ACT	TAT	GTC	CGC	GCA	GGG
N	A	I	T	R	S	K	G	L	T	Y	V	R	A	G

GCA	TAG
A	*

680
226

Fig. 39. Secuencia nucleotídica del gen de la proteína p24 de PVX y traducción de la respectiva secuencia aminoacídica. Los residuos de arginina, que serían importantes para la unión a RNA, se indican con el color amarillo. La secuencia consenso de unión a nucleótidos se indica en color verde. Esta secuencia está muy conservada en helicasas, y es denominada dominio *P-loop*.

La proteína p24 expresada en las plantas incrementaría el MEL de los plasmodesmos, aunque actualmente ha surgido cierta discrepancia sobre este punto a partir de los resultados presentados por Tamai y Meshi (2001). Sin embargo, existe un consenso general acerca de que las proteínas TGB1 de PVX y de WCIMV son capaces de movilizarse por sí mismas de célula a célula y de formar complejos riboproteicos con los correspondientes CPs y gRNAs durante el proceso de transporte (Lough *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000). La proteína p24 pierde la capacidad de movilizarse a sí misma, cuando las proteínas p12 y p8 o la CP viral son expresadas en la misma célula. Significativamente, esto no sucede cuando se encuentran presentes las proteínas p12 o p8 en forma individual. Muy recientemente, se ha reportado que una función supresora de la propagación sistémica del PTGS está localizada en la proteína

p24 (Voinnet *et al.*, 2000). También se ha demostrado que la proteína p24 contiene el determinante de avirulencia reconocido por el producto del gen de resistencia Nb, presente en algunos cultivares de *Solanum tuberosum* (Malcuit *et al.*, 1999).

El genoma viral, no logra ser traducido a proteína en un sistema *in vitro* cuando se encuentra en su forma encapsidada. Sin embargo, en presencia de la proteína p24, el mismo se convierte a una forma traducible (Atabekov *et al.*, 2001). Se ha sugerido que ello resulta de una interacción directa entre la proteína p24 y uno de los extremos del virion. La actividad ATPasa de la proteína no participaría de este proceso.

2. Expresión de la proteína p24 en planta de tabaco

Durante la realización de su Tesis Doctoral, la Dra. Ares obtuvo en nuestro laboratorio varias líneas de plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* cv Xanthi D8 NN transformadas con el gen de la proteína p24 PVX. Estas plantas presentaban un fenotipo marcadamente diferente respecto de las plantas control, con clorosis acentuada en las hojas, entrenudos más cortos y resistencia a infecciones provocadas por *Tobamovirus* (Ares 1997; Ares, *et al.*, 1998). El fenotipo de estas plantas se correlacionaba con los niveles de expresión de la proteína p24. Se demostró que estas plantas son capaces de complementar a una versión de PVX deletada en el ORF2, indicando así que la proteína p24 producida en ellas era funcional y podía ser aportada en *trans*. Además, cuando estas plantas eran infectadas con PVX, desarrollaban síntomas más severos a los de una infección normal y exhibían anillos cloróticos que encerraban regiones de tejido verde. En conjunto, estas observaciones sugirieron que la proteína p24 tiene, además de las funciones ya descritas en la movilización de PVX, un papel importante en el desarrollo de los síntomas.

Cuando las plantas p24 se infectaron con TMV, el diámetro promedio de las lesiones necróticas fue menor en las plantas transgénicas que en las plantas control (Fig. 40). En concordancia con esto, al infectar las plantas con el virus OB, un *Tobamovirus* que no produce una reacción HR en plantas NN, no se observó infección a nivel sistémico. Se constató también que la multiplicación de TMV en protoplastos obtenidos de plantas p24 y control era comparable, lo que señalaba que el proceso de replicación no estaba afectado. A la inversa, se observó que la infección de plantas transgénicas que expresan el gen de la proteína p30 de TMV por el virus PVX exhibía un retardo al nivel de la infección sistémica. A partir de estos resultados, se sugirió que la

sobreexpresión de la proteína p24 interferiría con una de las funciones de la proteína p30 de TMV, lo que producía la inhibición del proceso de movilización. Otra posibilidad era que las proteínas p24 de PVX y p30 de TMV compitieran por algún paso o factor limitante para el proceso de transporte viral.

A



B

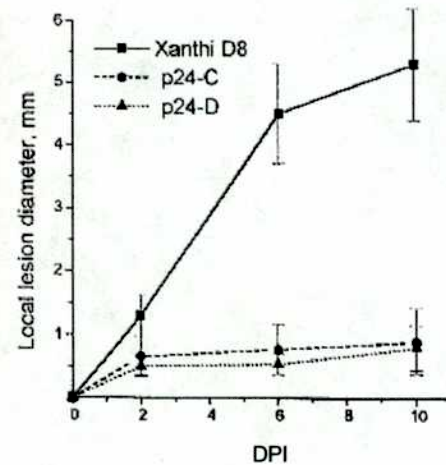


Fig. 40. A) Fenotipo de una planta p24-C de la generación F₂ (izquierda) y de una planta Xanthi D8 NN (derecha), a las 10 semanas de edad. B) Desarrollo de lesiones necróticas en hojas inoculadas de plantas p24 y Xanthi D8 NN. ■: plantas Xanthi D8 NN; ●: plantas p24-C; ▲: plantas p24-D. Se inocularon 10 plantas de cada línea con TMV-U1 (50 ng/ml). Cada valor representa el promedio de las mediciones de 100 lesiones individuales, tomadas de plantas diferentes de la misma línea. Las líneas verticales representan las desviaciones estándar (Ares *et al.*, 1998).

CAPITULO 2

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo principal de la segunda parte del trabajo de Tesis se concentró en la caracterización fenotípica y fisiológica de las plantas transgénicas p24 previamente obtenidas en el laboratorio. Con este fin, se estudiaron los siguientes parámetros fisiológicos:

- 1) Morfología, histología, y relación tallo/raíz.
- 2) Contenido de azúcares solubles e insolubles en hojas y raíces.
- 3) Fotosíntesis y respiración.
- 4) Contenido de nitrógeno en las hojas.
- 5) Expresión de los genes asociados a la fotosíntesis, a la asimilación de carbono y a la respuesta defensiva.

Esta etapa del proyecto fue realizada en colaboración con los Dres. C. Sarrobert y C. Robaglia del CEA, Francia. Los resultados obtenidos en el laboratorio francés se indican en la sección de Materiales y Métodos.

CAPITULO 2

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Caracterización de plantas transgénicas p24

Como se mencionó en la Introducción, en nuestro laboratorio se obtuvieron y se caracterizaron previamente plantas transgénicas p24 (Ares 1997; Ares *et al.*, 1998). Entre las plantas transgénicas caracterizadas, se seleccionaron las líneas C3 y E2 las que expresaban respectivamente, un nivel alto y medio de la proteína p24. Posteriormente, se realizaron análisis de *Southern*, *Northern* y *Western blot* de las plantas p24 (Fig. 41). De acuerdo con los resultados obtenidos, las líneas C3 y E2 contenían una única copia del transgen. Además, los niveles de expresión de la proteína p24 se correlacionaron con los niveles de mRNA del transgen y con el fenotipo (Tabla III).

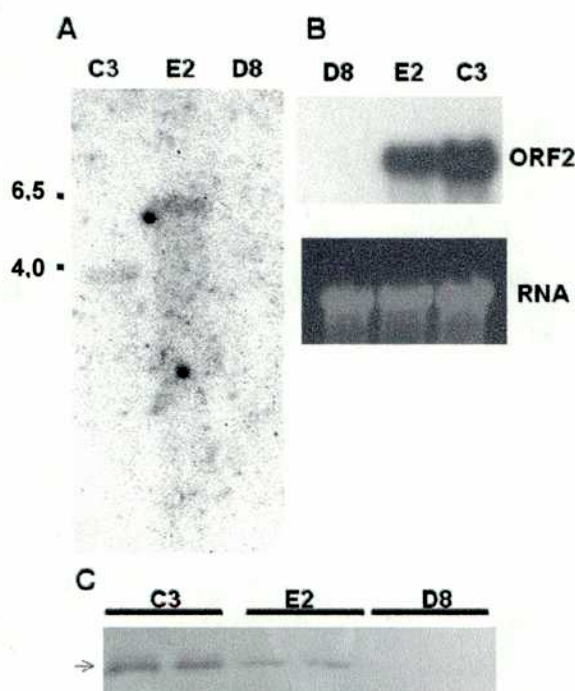


Fig. 41. Caracterización molecular de plantas transgénicas p24. A) *Southern blot* de las líneas C3 y E2. Se digirieron 10 μ g de DNA genómico obtenido de las plantas transgénicas y control *N. tabacum* Xhanti D8 NN (D8) con la enzima Bam HI y se los sometió a una corrida electroforética en gel de agarosa. La membrana con el DNA transferido fue hibridada con una sonda radiactiva de cDNA correspondiente al ORF2 de PVX. El tamaño estimado de las bandas está indicado a la izquierda. B) *Northern blot* de las líneas C3 y E2. El RNA total fue obtenido a partir de las plantas transgénicas y control a las 13 semanas post-germinación e hibridado con la misma sonda utilizada en el *Southern blot*. El control de siembra de RNAs corresponde al gel teñido con el bromuro de etidio. Se sembraron 5 μ g de RNA total en cada calle. C) *Western blot* de las líneas C3 y E2. Se analizaron muestras de proteína total de las plantas transgénicas y control (30 μ g por muestra) con un antisuero policlonal contra la proteína p24 de PVX. La flecha indica a la banda correspondiente a la proteína p24.

Las plantas p24 exhibieron un fenotipo característico consistente en menor altura, menor distancia internodal, hojas más pequeñas y color clorótico. Además, como se había reportado previamente, el fenotipo parecía correlacionarse con los niveles de expresión del transgen.

Como primer paso en la caracterización de plantas p24, se determinaron los pesos frescos de las distintas partes de las plantas. Se tomaron directamente las muestras de plantas crecidas en un ambiente controlado (ver Materiales y Métodos) y se pesaron las partes en una balanza. Como se puede observar en la Tabla III, las plantas p24 exhibieron menor número de hojas, menor distancia internodal, y menor peso de las raíces, confirmando así observaciones previas.

Plantas	Altura (cm)	Peso de las hojas (g PF)	Peso de las raíces (g PF)	Peso del tallo (g PF)	Peso total (g PF)	Relación tallo/raíz
D8	23 ± 3	21,9	10,7	8,0	40,6	2,79
E2	18,5 ± 4	16,2	7,7	5,6	29,5	2,83
C3	8,0 ± 1,5	11,1	5,3	3,5	19,9	2,75

Plantas	Número de hojas	Tamaño de las hojas (cm)	Distancias internodales* (cm)
D8	12 ± 1	(13,5 ± 0,8) x (8,0 ± 0,3)	11 ± 2
E2	12 ± 2	(10,5 ± 0,5) x (6,0 ± 0,3)	6 ± 1
C3	8 ± 1	(9,0 ± 0,5) x (5,0 ± 0,5)	4 ± 0,5

* Promedio de las distancias entre las cuatro hojas sucesivas.

Tabla III. Caracterización morfológica de las líneas transgénicas p24. Los datos corresponden a plantas de 11 semanas post-germinación.

A pesar de la disminución del tamaño de los órganos, la relación tallo/raíz en las plantas transgénicas fue similar al valor correspondiente de las plantas control. Esto indicaba que, en contraste con lo reportado en trabajos previos para plantas transgénicas p30 de TMV o p17 de PLRV, la partición de los fotoasimilados en las plantas p24 no estaba afectada en forma significativa.

Curiosamente, la disminución de tamaño de los órganos no sólo fue observada en la etapa adulta de las plantas, sino también a lo largo de todas las etapas del desarrollo de las mismas. El análisis de plántulas p24 de 5 días de edad reveló que el tamaño de los meristemas era menor que el de los controles desde una etapa temprana del crecimiento y del desarrollo (Fig. 42). Haciendo un cálculo aproximado (ver leyenda de la figura), se determinó que a los 5 días de edad, las plantas C3 poseían meristemas radiculares de un volumen promedio 37% menor que los meristemas de las plantas control. Además, el análisis de los callos obtenidos a partir de hojas transgénicas y control reveló que el peso promedio de los callos transgénicos correspondía a un 20-25 % de los callos control (Fig. 42C).

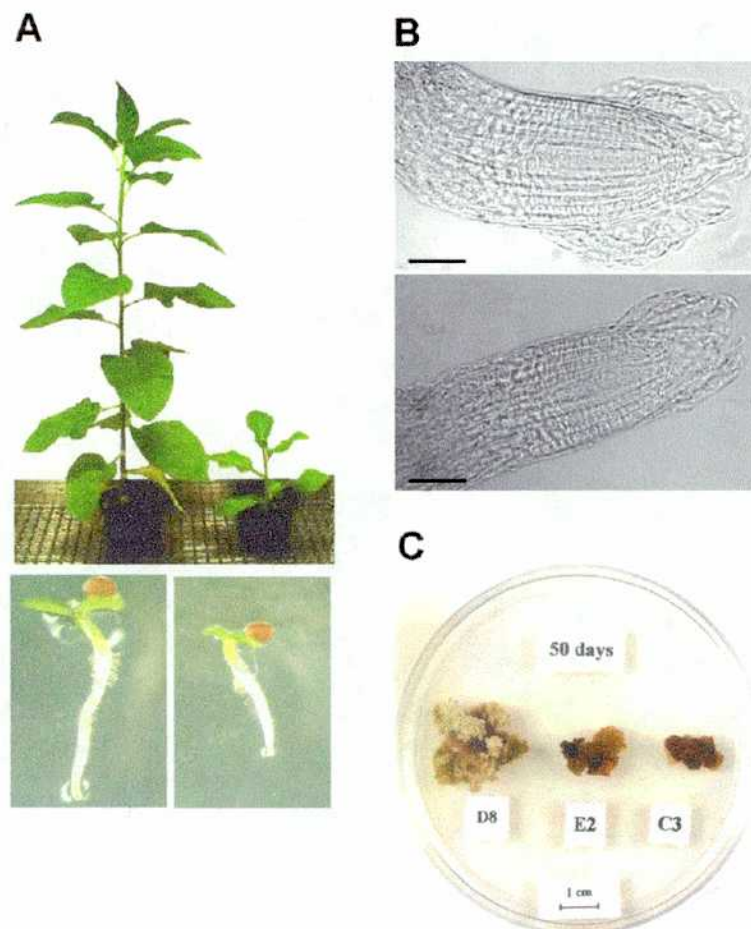
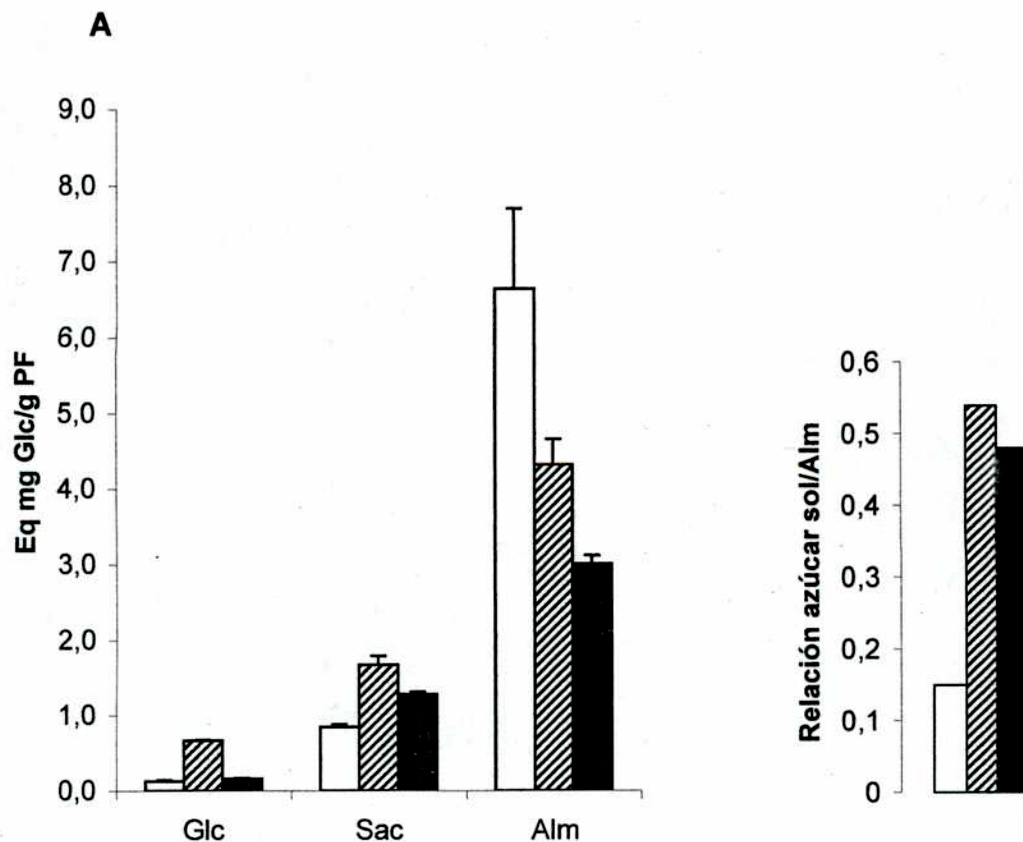


Fig. 42. Fenotipo de plantas p24. A) Panel superior: plantas transgénicas C3 (derecha) y plantas control D8 (izquierda) a las 11 semanas post-germinación. Panel inferior: plántulas correspondientes a 5 días post-germinación de las mismas líneas. B) Fotografías representativas de la zona meristemática de las raíces primarias correspondientes a la planta control (arriba) y C3 (abajo), a los 5 días post-germinación. El volumen promedio ($n=6$) de las zonas meristemáticas de plántulas control y C3 fueron: $0,143 \pm 0,017$ y $0,091 \pm 0,008 \text{ mm}^3$, respectivamente. El volumen fue calculado considerando al meristema como un cilindro. Barra = $200 \mu\text{m}$. C) Callos provenientes de plantas C3, E2 y *N. tabacum* Xanthi D8 NN luego de 50 días. Peso promedio ($n=25$) para cada tipo de callos fueron: C3: $0,215 \text{ g}$; E2: $0,265 \text{ g}$; planta control: $1,045 \text{ g}$ (resultados obtenido por la Lic. Mercedes Rivero).

2. Acumulación de azúcares en plantas p24

Se determinó el contenido de azúcares en las hojas de las líneas transgénicas C3 y E2. Para ello, se tomaron muestras de hojas y de raíces a las 11 semanas post-germinación. Como se muestra en la Fig. 43, el contenido de almidón es menor en todas las muestras provenientes de plantas transgénicas. En las hojas, se observó una disminución del contenido de almidón y un leve aumento del contenido de azúcares solubles, lo que determinó una relación azúcares soluble/insoluble tres veces superior a la de las plantas control. En forma similar, en las raíces se observó una disminución más marcada del contenido de almidón acompañado de una leve disminución del contenido de azúcares solubles. Como consecuencia, la relación azúcares soluble/insoluble fue de 3 a 5 veces mayor que en las plantas control. Si comparamos el contenido total de azúcares, las plantas p24 acumulan menor cantidad que las plantas control, y esta disminución parecería correlacionarse con los niveles de expresión de la p24 de cada línea transgénica.



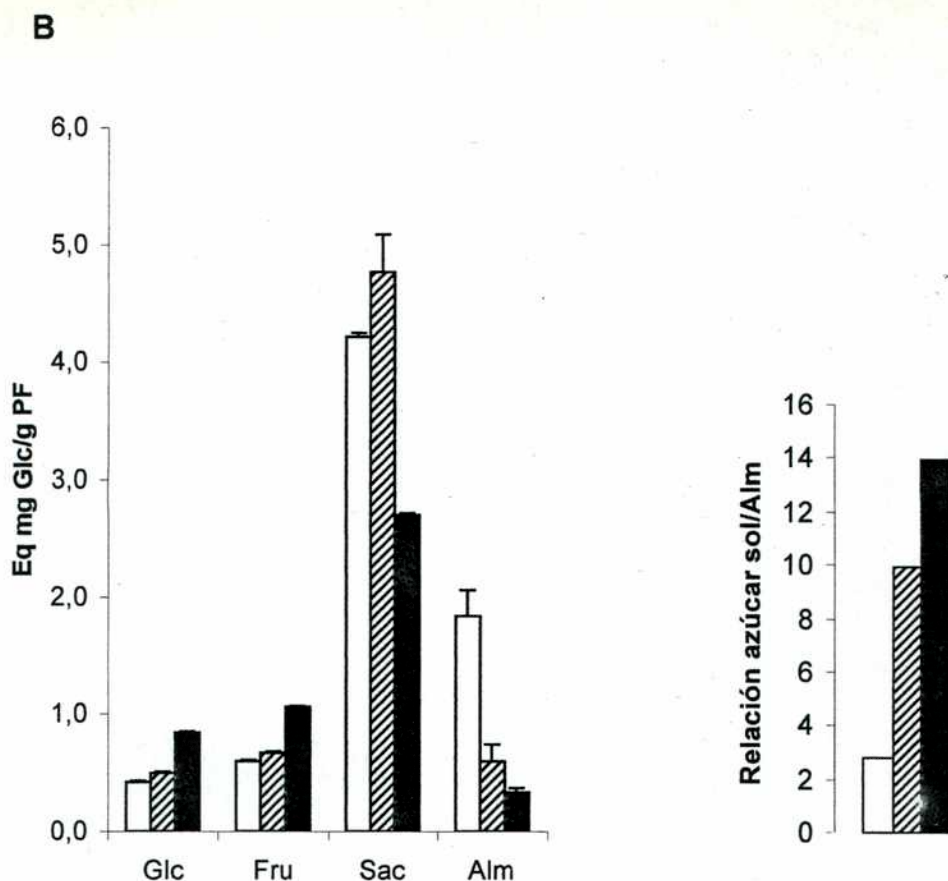


Fig. 43. Niveles de acumulación de azúcares luego de un período de 7 h de período de luz en hojas (A) y en raíces (B) de plantas transgénicas y control a las 11 semanas post-germinación. Barras vacías: Plantas control. Barras rayadas: Plantas E2. Barras negras: Plantas C3. En cada barra se indican las desviaciones estándar. Glc: glucosa, Fru: fructosa, Sac: sacarosa, Alm: almidón, Azúcar sol: azúcar soluble

3. Fotosíntesis en plantas p24

Con el objetivo de determinar la posible causa de la disminución del contenido de azúcares en plantas p24, se estimó la tasa fotosintética mediante la medición del intercambio carbónico neto (INC). Para ello, se transfirieron plantas adultas de 6 a 7 semanas a una cámara de medición de intercambio de CO_2 durante 3 días. La tasa fotosintética fue calculada como la cantidad de CO_2 fijada por unidad de superficie de hoja, durante el período de luz. La respiración fue calculada como la cantidad de CO_2 liberada durante el período de oscuridad. Como se puede observar en la Tabla IV, mientras la tasa fotosintética se halla reducida en las plantas p24, la respiración no estaba afectada en forma significativa. Como consecuencia de esto, la relación R/P (respiración/fotosíntesis) fue superior en las plantas p24 que en las plantas control.

Paralelamente, con el fin de determinar el funcionamiento fotoquímico de los cloroplastos, se midieron las emisiones de fluorescencia de la clorofila en plantas p24. Como se explica en Materiales y Métodos, la emisión de fluorescencia de la clorofila puede ser analizada y evaluada cuantitativamente y permite estimar la tasa de transporte de electrones, el rendimiento cuántico y la existencia o no de fotoinhibición en los complejos fotosintéticos.

Como se muestra en la Tabla V, los valores correspondientes al rendimiento cuántico máximo del fotosistema 2 (PS2) fueron similares en las plantas transgénicas y en las plantas control. Este resultado indicaba que no había daños en PS2 de las plantas transgénicas. En cambio, al analizar los valores correspondientes al rendimiento cuántico efectivo, se observó una leve disminución de los valores calculados para las plantas p24, lo que sugería que la eficiencia del transporte de electrones en las plantas p24 estaría disminuida muy probablemente en algún paso del complejo PS1 o del ciclo de Calvin.

Plantas	Fotosíntesis ($\mu\text{l.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$)	Respiración ($\mu\text{l.h}^{-1}.\text{cm}^{-2}$)	Relación R/P en un periodo de 24 hs
D8	31 $\pm$ 2	12 $\pm$ 1,5	0,28
E2	16,5 $\pm$ 1,5	12 $\pm$ 1,5	0,52
C3	14,5 $\pm$ 1,5	11 $\pm$ 1	0,54

$\pm$ Indican la desviación estándar.

Tabla IV. Tasa de fotosíntesis y de respiración en plantas p24 y control. El INC fue medido como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son expresados como el valor promedio obtenido de 4 plantas individuales para cada línea. Las mediciones se repitieron 3 veces.

Plantas	Rendimiento cuántico máximo calculado como $F_v / F_{\max}$	Rendimiento cuántico efectivo bajo una determinada intensidad luminica	
		255 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	600 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
D8	0,820 $\pm$ 0,005	0,645 $\pm$ 0,030	0,430 $\pm$ 0,015
E2	0,795 $\pm$ 0,014	0,597 $\pm$ 0,045	0,370 $\pm$ 0,030
C3	0,790 $\pm$ 0,008	0,491 $\pm$ 0,020	0,353 $\pm$ 0,017

$\pm$ Indican la desviación estándar.

Tabla V. Emisión de fluorescencia de la clorofila. F_v : indica la emisión de fluorescencia variable que equivale a la diferencia entre F_0 (emisión de fluorescencia inicial mínimo) y $F_{\max}$ (emisión de fluorescencia máxima obtenida al irradiar con una luz blanca muy intensa).

Es razonable pensar que si existe una menor asimilación de productos fotosintéticos en plantas p24, la formación de azúcares solubles en las mismas debe encontrarse favorecida a expensas de la síntesis de almidón, que es la forma que tienen las plantas de acumular los excesos de productos asimilados. Para aclarar este punto, se determinó el contenido de almidón en muestras de hojas tomadas al principio y al final del periodo de luz. Inesperadamente, cuando se calculó la cantidad de almidón acumulada durante el período de luz en las plantas p24, se observó que las mismas tenían una cantidad similar a la de las plantas control. Es decir, a pesar que la cantidad de almidón correspondiente de las plantas transgénicas a cada tiempo del muestreo era menor, la acumulación calculada como la diferencia entre las cantidades de azúcares correspondientes a cada tiempo de muestreo fue similar a las de plantas control. Si bien no se tienen datos acerca de la tasa de exportación de azúcar en las plantas analizadas, en primer instancia parecería que a pesar de la baja tasa fotosintética existe una síntesis de almidón normal en las plantas p24, y que éste sería rápidamente convertido en azúcares solubles para compensar la baja concentración de los mismos.

	<i>Azúcares solubles</i>			<i>Almidón ^a</i>		
	8 AM	10 PM	Acumulación	8 AM	10 PM	Acumulación
D8	0,95	1,15	0,20	4,97	6,54	1,57
E2	1,62	1,94	0,32	2,06	3,30	1,24
C3	1,08	1,56	0,48	0,55	2,04	1,49

Los valores están indicados como mg/g PF

^a Equivalente en glucosa

Tabla VI. Acumulación de carbohidratos durante el periodo de luz en plantas p24 y control.

5. Contenido de nitratos en plantas p24

El metabolismo de nitrógeno está estrechamente relacionado con el metabolismo de carbono y con la fotosíntesis (Scheible *et al.*, 1997). Teniendo esto en cuenta, se evaluaron las posibles consecuencias de las alteraciones detectadas en el nivel de carbohidratos sobre el metabolismo del nitrógeno. Para ello, se tomaron muestras

correspondientes a la tercera y la quinta hoja de las plantas transgénicas y control y se determinaron los niveles de nitratos de las mismas.

Plantas	3ª hoja	5ª hoja
	(mg NO ₃ / g.PF)	(mg NO ₃ / g.PF)
D8	0,45	0,41
E2	3,32 ± 0,68	1,28 ± 0,13
C3	5,14 ± 0,36	2,99 ± 0,33

± Indica la desviación estándar.

Tabla VII. Contenido de nitratos en las hojas de plantas transgénicas p24

Como se puede apreciar en la Tabla VII, se encontró una alta acumulación de nitratos en las hojas provenientes de las plantas transgénicas. Además, el nivel de acumulación de nitratos se correlacionaba con los niveles de expresión del transgen.

6. Análisis microscópico de los cloroplastos de plantas p24

Los resultados referidos a la tasa fotosintética, y a la acumulación de azúcares y nitratos eran indicativos de posibles alteraciones en los cloroplastos de plantas p24. Para obtener más información sobre este aspecto, se observó en el microscopio confocal y electrónico, el aspecto general de las células y de las organelas. Desde el punto de vista histológico, la forma, el tamaño y la distribución de las células eran similares a las de las plantas control aunque, con baja frecuencia, se observaron células con un aspecto similar al de las célula infectadas por PVX (resultados no presentados). Una observación más detallada reveló la presencia de grupos de células cloróticas o muertas en las hojas de las plantas p24.

Como se muestra en la Fig. 44, las células de la línea C3 tienen los cloroplastos más redondos, y la vacuola desplazada. Por el contrario, en las plantas control, los cloroplastos eran más aplastados y se distribuyen en la periferia de la célula.

Coincidiendo con los resultados reportados por Davis *et al.*, (1993), la localización de la proteína p24 en las plantas transgénicas fue similar a la hallada en células infectadas por PVX, observándose la típica formación de cuerpos laminados compuestos por proteína p24. Sin embargo, no se pudo determinar la presencia de

proteína p24 en los cloroplastos. Por otra parte, cuando los cloroplastos fueron examinados con el microscopio electrónico, se encontraron alteraciones a nivel ultraestructural. En las líneas C3 y E2, se observaron frecuentemente depósitos globulares electrodensos en el estroma de los cloroplastos (Fig. 45). Según la bibliografía, estos cuerpos se asemejan a los llamados platoglobuli, que son depósitos de compuestos lipofílicos (posiblemente quinonas y carotenos esterificados) que participan en el mantenimiento, reciclaje y degradación de las estructuras membranosas de la organela. Según algunos reportes previos, su número se incrementa en las células senescentes (Kessler *et al.*, 1999). Paralelamente la microscopía permitió confirmar que en los cloroplastos de las plantas p24 había menor contenido de almidón.

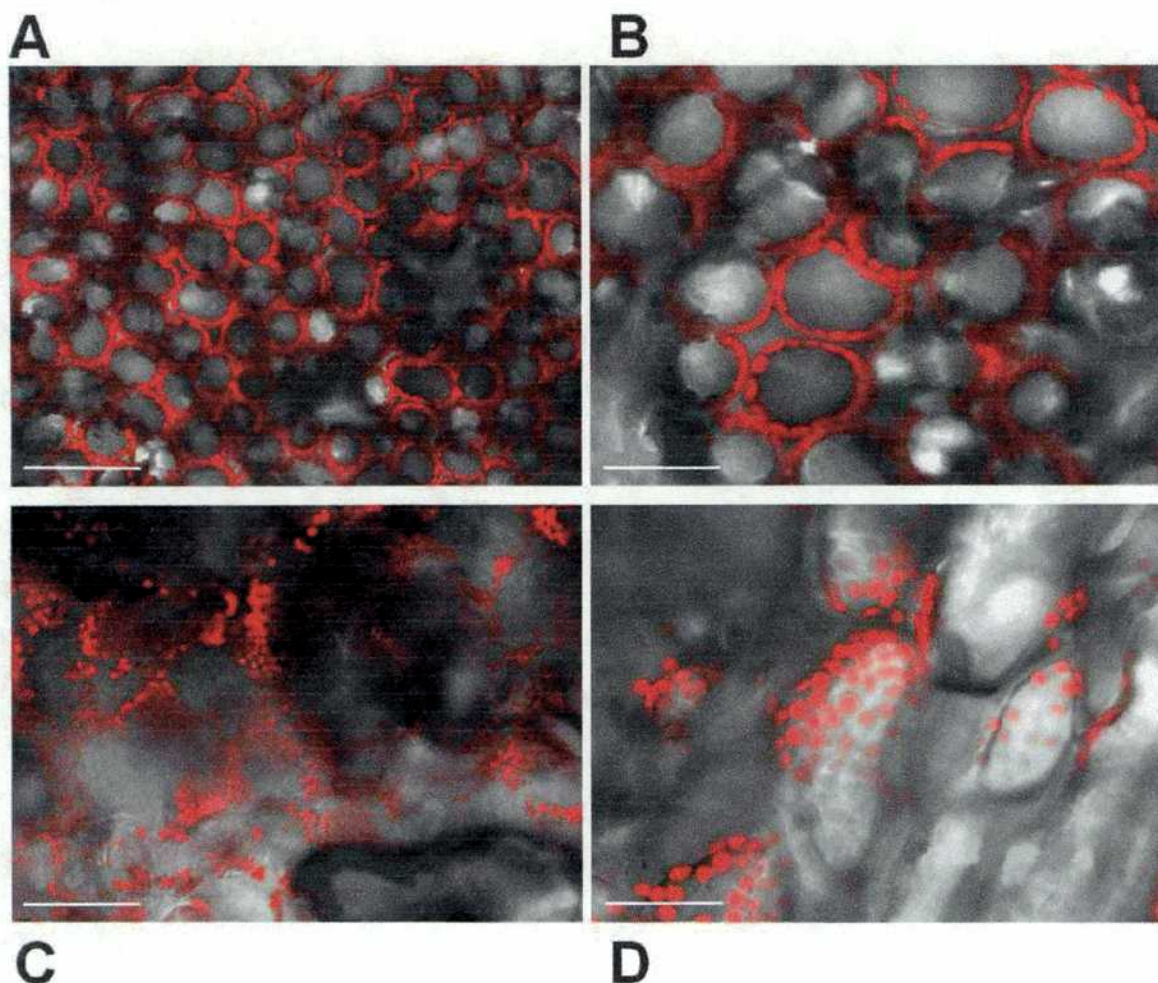


Fig. 44. Observación por microscopía confocal de hojas de plantas p24 y control bajo luz UV. Las observaciones fueron realizadas en 6 hojas de plantas control (A y B), y de la línea C3 de plantas p24 (C y D). Se muestran fotos tomadas con dos aumentos distintos. Los cloroplastos (de color rojo) se distribuyen periféricamente y presentan un aspecto normal en las células control. La vacuola central está desplazada del centro, y los cloroplastos son más redondos en las células transgénicas. Barras = 200 μm (A); 100 μm (B and C) y 50 μm (D).

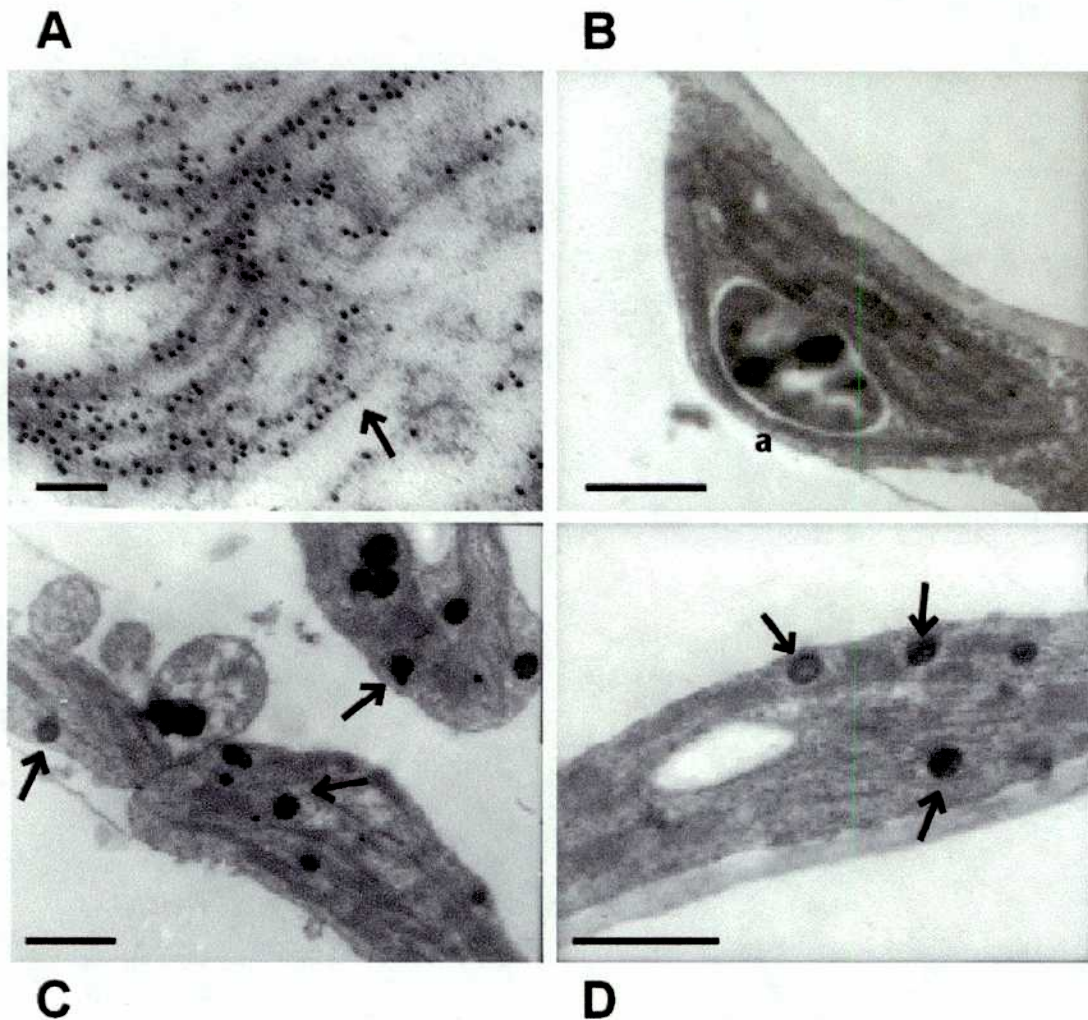


Fig. 45. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de cloroplastos de plantas p24 y control. (A) Inclusiones citoplasmáticas laminadas compuestas por proteína p24 en células de plantas C3. La proteína p24 fue marcada con un antisuero anti-p24 seguido de un segundo anticuerpo anti-conejo conjugado a oro coloidal de 10 nm. (B) Depósitos de almidón (a) en cloroplastos de plantas control. (C y D) cloroplastos de E2 y C3, respectivamente. Los depósitos de almidón no se hallan presentes o lo están en muy baja cantidad. Se observan frecuentemente plastoglobuli (indicados con las flechas). Barras = 150nm (A); 1 μ m (B, C, D).

7. Análisis de expresión de los genes fotosintéticos y defensivos en plantas p24

Uno de los mecanismos implicados en la inhibición de la fotosíntesis es la retroalimentación negativa de los genes fotosintéticos (Krapp *et al.*, 1993; Krapp y Stitt, 1995). Los azúcares solubles, en especial la glucosa, actúan como una señal para inhibir la expresión de genes relacionadas a la fotosíntesis (Sheen *et al.*, 1999). Si bien, el nivel total de azúcares en las plantas p24 fue menor, la relación entre el contenido de azúcares solubles e insolubles fue consideradamente superior al de las

plantas control. Para evaluar si esta alteración inducía algún cambio en la expresión de RUBISCO, se realizó un análisis de *Northern* utilizando como sonda a la secuencia que codifica la subunidad menor de la misma (Fig. 46A). Como se puede apreciar, el nivel de mRNA RUBISCO disminuía en relación directa con el nivel de expresión de la proteína p24 y coincidentemente con el grado de inhibición de la tasa fotosintética correspondiente a cada línea transgénica.

En trabajos previos con plantas transgénicas que acumulan azúcares en las hojas, tales como plantas que expresaban la invertasa de levadura, la pirofosfatasa de *E. coli*, o la MP de PRLV (Herbers *et al.*, 1996 y 1997), se observó una fuerte inducción de genes PR. Esta inducción se encontró también en otras plantas transgénicas que presentaban alteraciones metabólicas (Takahashi *et al.*, 1989; Becker *et al.*, 1993; Mittler *et al.*, 1995). Basándose en estos antecedentes, se analizó la inducción de los genes PR1a y PR3 en las hojas de las plantas transgénicas. Como puede apreciarse en la Fig. 46B, ambos genes estaban inducidos en las plantas p24. Para evaluar si la expresión de los genes PR dependía de la edad de las hojas analizadas, las terceras y octavas hojas de las plantas transgénicas fueron analizadas por *Northern blot*. Los genes PR1a, PR2 y PR3 se encuentran inducidos en las terceras hojas de las dos líneas, y en la octava hoja de la línea E2 (datos no presentados). No se detectó la inducción de los genes PR en las plantas control.

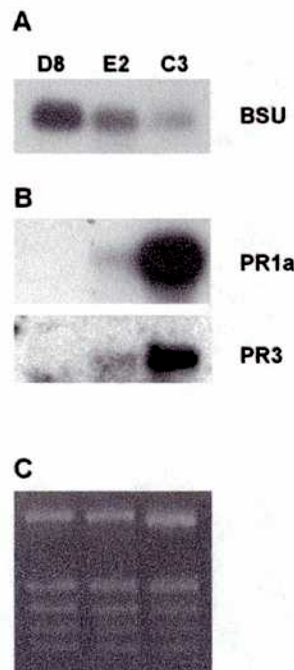


Fig. 46. Expresión de la subunidad pequeña de RUBISCO y de genes PR en plantas p24. El RNA total de plantas transgénicas (C3 y E2) y control (D8) fue purificado a las 13 semanas post-germinación. La membrana fue hibridada con sondas radiactivas de cDNA que correspondían a la secuencia de la subunidad pequeña de RUBISCO (BSU) o a las secuencias de los genes PR1a y PR3 (A y B, respectivamente). C) El mismo gel teñido con bromuro de etidio (control de siembra de RNA).

CAPITULO 2

DISCUSION

DISCUSION

En esta parte del trabajo de Tesis, se analizaron los parámetros fisiológicos de las plantas transgénicas p24 que fueron obtenidas y caracterizadas parcialmente durante la Tesis Doctoral de la Dra. Ares. Básicamente, estas plantas presentaban una alteración fenotípica consistente en un pronunciado enanismo y clorosis en las hojas. Posteriormente, se determinó que estas plantas eran resistentes contra las infecciones de *Tobamovirus*.

Primeramente, se verificó que las dos líneas seleccionadas en este estudio expresaban efectivamente niveles diferentes de p24 y que existía una correlación entre estos y las alteraciones fenotípicas en las plantas transgénicas. También se confirmó que las dos líneas transgénicas eran homocigotas e independientes. Por lo tanto, se descartó que el fenotipo observado en las plantas p24 estuviesen vinculado a algún efecto posicional del sitio de inserción del transgen en el genoma.

Las determinaciones de los contenidos de carbohidratos y de nitrato indicaron que las plantas p24 presentaban una marcada alteración de sus niveles de acumulación. Las plantas p24 acumulaban menos carbohidratos y, en particular, las cantidades de almidón en hojas y raíces estaban significativamente reducidas. Por el contrario, los niveles de nitrato se hallaban elevados y guardaban correlación con los niveles de expresión de la p24.

Al evaluar la capacidad fotosintética de las plantas p24, se observó una inhibición de la misma. En correlación con esta, se encontró una reducción de la expresión del gen fotosintético (la subunidad pequeña de RUBISCO). En trabajos previos se ha descrito la inhibición de la fotosíntesis por la retroalimentación negativa ocasionada por la acumulación de azúcares solubles en las células (Herbers, *et al.*, 1997). En el caso de las plantas p24, los niveles de azúcares solubles se hallaban próximos a los de las plantas control. En cambio, la relación entre los azúcares solubles e insoluble era llamativamente superior. Sería interesante determinar si existe en las plantas algún otro mecanismo capaz de iniciar la represión de los genes fotosintéticos, independientemente del que opera través del nivel de azúcares en las células. Una posibilidad es que la planta sea capaz de detectar el balance entre los niveles de estas dos formas de carbohidratos, e inicie así la represión de los genes fotosintéticos. De hecho, la partición entre los azúcares solubles e insoluble se encuentra muy regulada. En apoyo de esta idea, existe un reporte sobre mutantes de *Arabidopsis* que acumulan

menos almidón y que presentan una disminución en la fotosíntesis (Sun *et al.*, 2001). Ello sugiere que, la relación entre estas dos formas de azúcares podría influenciar la tasa fotosintética en la planta.

Los estudios de emisión de la fluorescencia de la clorofila sugieren que no existiría una fotoinhibición en el PS2. Sin embargo, la tasa del transporte de electrones parecería estar disminuida en los cloroplastos de las plantas p24, indicando indirectamente que habría una alteración en algún paso del PS1 o del Ciclo de Calvin. Por otro lado, se encontró una correlación entre la baja tasa fotosintética y las alteraciones estructurales halladas en los cloroplastos de las líneas transgénicas. Los mismos mostraban un aspecto más redondo, con menor contenido de almidón, y presentaban con frecuencia plastoglobuli en sus estromas. Estos resultados indican que la disminución de la tasa fotosintética presente en las plantas p24 podrían deberse principalmente a alteraciones en los cloroplastos y a la disminución de la expresión de los genes fotosintéticos. Todos estos eventos se asemejan a procesos que ocurren durante la senescencia celular. El hecho de no encontrar proteína p24 asociada a las organelas de las plantas transgénicas, hace suponer que este evento sería una consecuencia indirecta de la expresión de la misma.

Se pueden plantear varias hipótesis respecto de la acumulación de nitrato. Es razonable pensar que suceda un incremento del contenido de nitratos cuando las funciones de los cloroplastos se encuentran alteradas, porque éstos son las organelas responsables de la asimilación de nitrógeno. Una posibilidad es que la baja tasa fotosintética encontrada en las plantas p24 disminuya el nivel de factores reductores, como NADPH y ferredoxina reducida, necesarias para la conversión de nitrito a amonio catalizada por la nitrito reductasa, en el interior de la organela. A su vez, la acumulación de nitrito en la organela, además de ser tóxica, inhibe la actividad de la nitrato reductasa, la que cataliza la reacción de nitrato a nitrito. Alternativamente, la baja cantidad de carbohidratos provenientes de la baja asimilación de CO₂, provocaría una menor disponibilidad de esqueletos carbonados para la asimilación de amonio y la posterior formación de aminoácidos, aumentando así el contenido de nitrato en las células. Coincidentemente con estos razonamientos, se observa una aparente correlación entre los niveles de acumulación de nitrato en hojas y el grado de inhibición de la fotosíntesis de las dos líneas transgénicas analizadas.

La represión de genes fotosintéticos ha sido ya asociada a la inducción de genes PR en varios trabajos previos. Por ejemplo, en plantas sometidas a una luz excesiva, que

favorece la aparición de fotoinhibición, se detectó la expresión de genes PR y la inhibición de genes fotosintéticos (Karpinski *et al.*, 1999). También se observó la acumulación de azúcar en las hojas y la expresión de genes PR en plantas que expresaban la invertasa de levadura (Sonnewald *et al.*, 1991), en plantas crecidas con el agregado exógeno de azúcares (Herbers *et al.*, 1996) y en plantas que expresaban la MP de PRLV, (Herbers *et al.*, 1997). La alta concentración de azúcares en las células fotosintéticas es el denominador común en estos últimos casos.

El hecho de que durante la infección provocada por PVX en plantas de tabaco no se induzcan los genes PR (ver Resultados – Capítulo 1) sugiere que la inducción de los genes PR observada en las plantas p24 sería una consecuencia de un desbalance metabólico provocada por alteraciones de las funciones de los cloroplastos (Dietrich *et al.*, 1994). Si bien, durante la infección viral se observan cloroplastos alterados, la continua exposición a la p24 desde etapas tempranas del crecimiento podría incrementar sus efectos perturbadores sobre las vías metabólicas. Además, como se mencionó más arriba, hay algunos puntos comunes entre el proceso de senescencia y las alteraciones de los cloroplastos encontradas en las plantas p24. Coincidentemente, los genes PR también se inducen durante el proceso de senescencia (Quirino *et al.*, 2000).

Los resultados obtenidos por la Dr. C. Sarrobert en Francia, en plantas de *Arabidopsis thaliana* p24, y los obtenidos por la Lic. Rivero en nuestro laboratorio en plantas de *S. tuberosum* transgénicas p24, apoyan también la idea de que las alteraciones metabólicas provocadas por la proteína p24 no estarían directamente vinculadas con las alteraciones fenotípicas.

Como se puede apreciar en las fotografías de la Fig. 47, las plantas transgénicas de *A. thaliana* muestran un fenotipo enano similar al de plantas p24 de tabaco. Como sucede en estas últimas, el grado del enanismo se correlaciona con los niveles de acumulación de la p24. Sin embargo, a diferencia de las plantas de tabaco p24, estas plantas no mostraron clorosis en las hojas, alteraciones en los niveles de carbohidratos, ni inhibición de la tasa fotosintética. Tampoco se detectó la expresión de los genes PR. Tal vez, esta diferencia se deba a que *A. thaliana* no es un hospedador de PVX. En cambio, en las plantas de papa p24 se pudo observar no sólo un severo enanismo desde la etapa temprana del crecimiento, sino también severas alteraciones morfológicas de las hojas. El escaso desarrollo de estas plantas no permitió obtener material suficiente para desarrollar otros estudios más extensos.

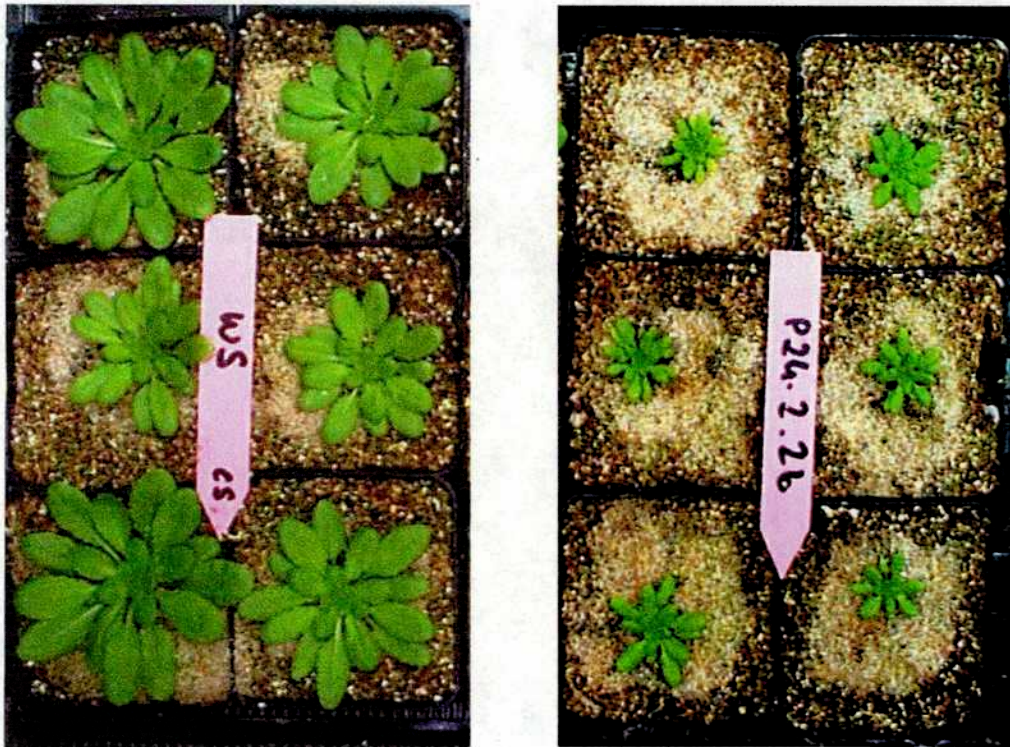


Fig. 47. Plantas de *A. thaliana*, ecotipo WS (izquierda), y plantas transgénicas p24 de *A. thaliana*, línea p24.2.2b (derecha). Las plantas transgénicas fueron obtenidas por la Dra. C. Sarrobert, CEA, Francia.

Una de las posibles causas del fenotipo enano de las plantas de tabaco era la baja tasa fotosintética de las plantas transgénicas. Para evaluar este punto, se crecieron plantas control en un ambiente con un nivel de luz reducido equivalente al requerido para obtener una tasa fotosintética al 50% de la normal. Como era de esperar estas plantas crecieron a un ritmo menor y alcanzaron un menor tamaño que las plantas crecidas en condiciones normales. Sin embargo, la disminución del tamaño no fue tan pronunciado como de las plantas transgénicas crecidas en condiciones normales de luz (datos no presentados). Por otra parte, el enanismo de las plantas transgénicas se evidencia ya en etapas muy tempranas del desarrollo, cuando todavía no está funcionando completamente el aparato fotosintético. Esto también sugiere que el enanismo observado en las plantas p24 respondería a un mecanismo independiente del que produce la disminución de la tasa fotosintética.

De acuerdo con los resultados presentados en esta etapa de la Tesis, la expresión de la proteína p24 induciría dos tipos de alteraciones bien definidas en las plantas de tabaco transgénicas. En primer término, la proteína p24 causa perturbaciones que

afectan las funciones de los cloroplastos, provocando clorosis e inducción de genes defensivos, fenómenos generalmente asociados a una infección viral. En segundo lugar, la expresión de la proteína p24 determina el desarrollo de un fenotipo enano que parecería ser independiente de las otras alteraciones metabólicas y de los parámetros fotosintéticos observados. El hecho de que no se observan cambios en la relación tallo/raíz, implicaría que tanto al meristema apical como radicular estén igualmente afectadas en las plantas p24.

También puede concluirse que el determinante del desarrollo de los síntomas patogénicos provocados por PVX en plantas susceptibles se encuentra estrechamente relacionado con el primer tipo de efectos provocados por la proteína p24. Por ejemplo, las plantas control severamente infectadas con PVX no mostraron el fenotipo enano de las plantas p24. Además, en plantas no-susceptibles a PVX no se observaron las alteraciones metabólicas asociadas a la infección viral, como la reducción de la fotosíntesis y la aparición de clorosis en hojas. Apoyando esta conclusión, se habían observado síntomas más severos durante la infección de PVX en plantas p24 de tabaco (Ares *et al.*, 1998). Hasta el presente, se han reportado al menos tres funciones de la proteína p24. La función mejor caracterizada de esta proteína es promover la movilización viral, actuando como una auténtica MP (Angell *et al.*, 1996; Lough *et al.*, 1998). Una segunda función adjudicada a la proteína p24 es la de suprimir la propagación del PTGS a nivel sistémico (Voinnet *et al.*, 2000). En tercer lugar, la proteína p24 juega el papel de gen *avr* de los genes de resistencia Nb en *S. tuberosum* (Malcuit *et al.*, 1999). Faltaría determinar si alguna de estas funciones, o alternativamente, alguna otra función aún desconocida de esta proteína es responsable del fenotipo descrito en las plantas p24.

En relación con esto pueden plantearse al menos tres mecanismos posibles para explicar este fenotipo.

- 1) La alteración de las comunicaciones intercelulares provocada por la proteína p24 a través de su efecto sobre los plasmodesmos podría estar desregulando los mecanismos que controlan normalmente el desarrollo de la planta a través del intercambio de macromoléculas y de hormonas.
- 2) La inhibición de la propagación del PTGS causada por la proteína p24 podría estar interfiriendo con el desarrollo normal de la planta, al afectar un número indeterminado de genes endógenos regulados por este mecanismo post-transcripcional.

3) La interacción directa entre la proteína p24 con algún componente celular, ya sea proteínas involucradas en los procesos del ciclo celular, o proteínas que mantienen la homeostasis metabólica y del redox intracelular, podría estar provocando alteraciones de sus funciones, independientemente del papel que cumple la proteína p24 durante la patogénesis viral.

Para abordar el punto 3), durante el transcurso del trabajo de Tesis se realizó un *screening* para identificar aquellas proteínas con capacidad de interactuar con la proteína p24. Se empleó la técnica del doble híbrido utilizando la proteína p24 como carnada (*bait*) y una biblioteca de cDNA de tabaco. A pesar de los reiterados intentos, no se encontró interacción alguna entre las proteínas expresadas en la biblioteca y la proteína p24.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

CAPITULO 1

Se obtuvieron varias líneas de plantas transgénicas de tabaco transformadas con el gen de la proteína p12 de PVX. Indirectamente, se dedujo que las mismas expresan proteína p12 funcional ya que una versión de PVX deletionada en el OR3 es capaz de movilizarse en las mismas en ensayos de trans-complementación.

Se observó la aparición de dos nuevas características en plantas p12: 1) alteraciones histológicas en las hojas maduras, consistentes en la degradación de células del mesófilo y 2) aparición de una respuesta defensiva contra la infección por PVX, que se manifestó como lesiones con forma de anillos necróticos en las hojas infectadas.

Respecto del punto 2) se realizaron las siguientes observaciones:

- a) La respuesta defensiva reúne algunas características de la respuesta HR, pero difiere de la respuesta clásica en algunos aspectos. Así, produce una respuesta más atenuada y con una cinética de inducción de la respuesta más lenta. Esto es posiblemente, causa por las que la plantas p12 no producen una respuesta SAR, como sucede normalmente en una respuesta clásica.
- b) Esta resistencia se observó sólo en el caso de PVX y es muy probablemente consecuencia del desarrollo de la respuesta tipo HR.
- c) Para el desarrollo de las lesiones se necesita la presencia simultánea de la proteína p12 proveniente del transgen y de PVX.
- d) El mecanismo de la respuesta defensiva se activaría una vez alcanzado un nivel crítico de la acumulación de p12.
- e) No intervendría un mecanismo de resistencia mediada por PTGS.

Tomando en cuenta estas conclusiones y los datos reportados en la bibliografía, se postularon las siguientes hipótesis sobre la movilización viral y los mecanismos de patogenicidad de PVX:

- a) La síntesis en forma estrictamente regulada de las proteínas p12 y p8 sería importante para el proceso normal del transporte viral. Por tal motivo, la traducción de las proteínas TGB2 y TGB3 a partir de un sgRNA bicistrónico habría sido seleccionada como un mecanismo que garantiza una relación estequiométrica constante entre ellas durante la infección.

b) La proteína p12, además de ser indispensable para la movilización viral, sería capaz de inducir una respuesta defensiva en el hospedador cuando se acumula en exceso respecto de la proteína p8. Así, durante una infección normal, el virus utilizaría un mecanismo que le permite mantener un bajo nivel de expresión de la proteína p12, lo que impediría la inducción de una respuesta defensiva contra el mismo.

CAPITULO 2

Se efectuó un estudio de algunos parámetros fisiológicos en plantas transgénicas p24 que había sido obtenidas previamente. Se estudiaron parámetros relacionados al metabolismo del carbono y del nitrógeno, a la tasa fotosintética, a la estructura de los cloroplastos y a la morfología y desarrollo de las plantas.

La expresión de la proteína p24 indujo dos tipos de alteraciones bien definidas en las plantas de tabaco transgénicas: a) perturbaciones de las funciones de los cloroplastos, que originaron clorosis e inducción de genes defensivos; b) un fenotipo de enanismo que, en principio, parecería ser independiente de las alteraciones metabólicas y de los parámetros fotosintéticos. Las plantas p24, al no tener alterada la relación tallo/raíz estarían igualmente, afectadas a nivel de los meristemas apical y radicular.

En base a estos resultados y a otros publicados anteriormente, se postuló que la proteína p24 sería el principal determinante patogénico de PVX, o sea el componente preponderante de los síntomas causados por la infección. En apoyo de esta idea, la expresión de las otras proteínas virales en tabaco no se manifestó en ningún caso en forma de alteraciones fisiológicas como las descritas en las plantas p24.

CONCLUSION FINAL

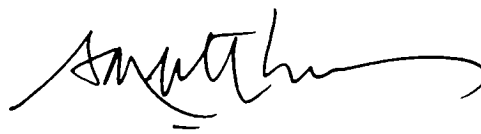
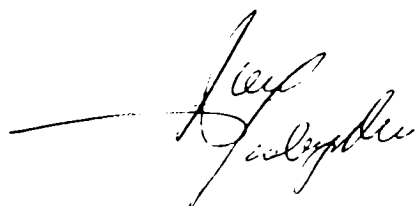
En la virología vegetal, aún no se ha podido identificar los factores determinantes que inducen la aparición de síntomas en las plantas susceptibles. Por el contrario, se cuenta con más información en el caso de interacciones planta-virus en las que se desarrollan respuestas defensivas y sobre los posibles mecanismos involucrados en las mismas.

En el presente trabajo, se evaluaron aspectos relacionados con la interacción entre plantas de tabaco *N. tabacum* Xhanti D8 NN y PVX. En particular, se exploraron los

efectos producidos por dos de las tres proteínas involucradas en la movilización viral en la inducción de síntomas y de alteraciones metabólicas, y en la generación de respuestas defensivas. Con este fin, se generaron y se estudiaron dos tipos de plantas transgénicas.

Las proteínas p12 y p24 están codificadas por genes del TGB, y junto con la proteína p8 y la CP, intervienen en el transporte del genoma viral de una célula a la otra. Estas proteínas no sólo cumplen roles diferentes durante la patogenia viral, sino que indujeron diferentes respuestas en las plantas transgénicas. En el caso de la proteína p12, su expresión produjo cambios en el tejido de las hojas maduras e indujo respuestas defensivas, que convirtieron a las plantas p12 en resistentes a este virus, pero no a virus pertenecientes a otros grupos. La caracterización de las plantas p24 indicó que esta proteína podría tener un papel importante en el desarrollo de las alteraciones fisiológicas que acompañan a la infección y en la formación de síntomas durante la misma. Además, varias líneas de evidencia sugieren que tendría la capacidad de modificar la tasa de división celular en meristemas de plantas hospedadores y no hospedadores de PVX.

Los resultados obtenidos en esta Tesis indican que los enfoques basados en la expresión de proteínas virales en plantas transgénicas son útiles para: a) descubrir nuevas propiedades y funciones de las proteínas virales durante la patogenia; b) profundizar los conocimientos acerca de las complicadas interacciones que existen entre la planta y el virus; c) utilizar a las proteínas virales, en especial las MPs, como una herramienta alternativa para el estudio de aspectos vinculados a la fisiología y al desarrollo vegetal.



MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

1. Líneas de plantas

Xanthi D8 NN: *N. tabacum* cv. Xanthi D8 NN. Es homocigota para el gen de resistencia N, por lo que desarrolla lesiones necróticas en las hojas inoculadas con TMV. Gentilmente cedida por el Dr. Yves Chupeau (INRA, Francia).

Líneas p24-C y p24-E: *N. tabacum* cv. Xanthi D8 NN transgénicas para la proteína p24 de PVX, homocigotas para el gen de resistencia N (Ares, Tesis Doctoral 1998). Ambas líneas son homocigotas para el gen de la proteína p24.

Líneas p12-3, p12-2 y p12-101: *N. tabacum* cv. Xanthi D8 NN transgénicas para la proteína p12 de PVX, homocigotas para el gen de resistencia N. La línea p12-3 es homocigota para el gen de la proteína p12.

Línea P8-12: *N. tabacum* cv. Xanthi D8 NN transgénicas para la proteína p8 de PVX. Esta línea es homocigota para los genes N y p8.

2. Virus

La cepa CP2 del virus X (PVX-CP2) de papa fue aislada en el Centro Internacional de la Papa (Lima, Perú). El clonado y la secuenciación completa del genoma viral fueron reportados previamente (GeneBank Accession N° X55802; Orman *et al.*, 1990). El inoculo se preparó a partir de una planta *N. tabacum* Xanthi D8 NN infectada con PVX de 20 DPI de la que se cosecharon hojas para su posterior liofilización. Se homogeneizó 0,1 g de hojas liofilizadas con 10 ml de *buffer* fosfato 0,1 M, pH 7, y se utilizaron 100 µl por hoja de este extracto para cada infección.

El inóculo de PVY cepa N se obtuvo del laboratorio del Dr. Christophe Robaglia (CEA, Francia), y se preparó de la misma forma que el inóculo de PVX.

La cepa TMV-U1 (común) de TMV se obtuvo del laboratorio del Dr. Roger Beachy (Donald Danford Plant Institute, USA). El virus fue purificado como se detalla más adelante. Se diluyó la suspensión viral concentrada resultante de la purificación entre 1:5000 y 1:10000. Se utilizaron 50 µl de dilución por hoja para cada infección.

La copia completa de cDNA del genoma de PVX se obtuvo mediante ensamblaje de los fragmentos apropiados de cDNA (Calamante, 1998). El clon resultante fue denominado pPVX3 y contiene los nucleótidos correspondientes a las posiciones 1 a 6432 del genoma viral más una cola de poly(A) de 24 residuos. La secuencia completa del virus fue clonada río abajo del promotor T7 en el vector comercial para *E.coli* pUC18.

La versión mutante de PVX defectiva en la movilización (pPVX Δ p12), que posee una delección interna de 108 nucleótidos correspondientes al ORF3, se obtuvo a partir de modificaciones realizadas en el clon pPVX3. En primer lugar, se obtuvo un fragmento comprendido entre las posiciones 4875 y 5792 del genoma viral mediante digestión con la enzima Nhe I y el mismo se subclonó en el vector comercial pBluescript SK+, conservando los sitios de reconocimiento para dicha enzima (ver Calamante 1998). Luego, el clon fue digerido con la enzima Xba I para eliminar la región comprendida entre las posiciones 5254 y 5363 correspondientes a la secuencia interna del gen de la proteína p12. Luego de re-ligar los extremos Xba I, se liberó el fragmento Nhe I/Nhe I del vector pBluescript SK+ y se lo utilizó para reemplazar la secuencia original correspondiente en el clon pPVX3.

3. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

E. coli: Se utilizaron las cepas DH5 α y BL24. Todos los cultivos fueron hechos en medio LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L). En el caso de medios sólidos, se agregó agar hasta una concentración final de 1,5 %. Los suplementos utilizados fueron los siguientes: ampicilina (100 μ g/ml), kanamicina (100 μ g/ml), IPTG (0,5 %) y X-Gal (100 μ M). Se partió siempre de una colonia crecida en medio mínimo M9 (Na₂HPO₄ 5 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, NaCl 0,5 g/L, NH₄Cl 1 g/L, MgSO₄ 2 mM, glucosa 0,2 %, CaCl₂ 0,1 mM), suplementado con tiamina 0,5 μ g/ml. Todos los crecimientos bacterianos fueron llevados a cabo en Erlenmeyers conteniendo un volumen de medio de cultivo equivalente a aproximadamente el 25 % de su capacidad total. La temperatura de crecimiento fue de 37 °C para la cepa DH5 α y de 30 °C para la cepa BL24 y la agitación fue de alrededor de 200 rpm en ambos casos. La cepa BL24 fue gentilmente cedido por el Dr. Lázaro Hernández (Centro de Biotecnología, Cuba).

A. tumefaciens: Se utilizó la cepa LBA4404 que porta el plásmido pAL4404 el que contiene genes que confieren resistencia a los antibióticos rifampicina y streptomycin. La temperatura de crecimiento fue de 28 °C en medio LB.

4. Métodos de ingeniería genética

Las técnicas de DNA recombinante se efectuaron de acuerdo con protocolos estándar (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1984). Las enzimas empleadas fueron obtenidas de New England Biolabs (USA), BRL-Life Technology (USA), Promega (USA) y Amersham-Pharmacia (USA) y se usaron según las especificaciones del fabricante.

5. Plásmidos comerciales e iniciadores

Los plásmidos comerciales utilizados fueron: pBluescript SK+ (Stratagen, USA), pTA (Invitrogen, USA), pRSETc (Stratagen, USA), pMALc2 (New England Biolabs, USA), pBI121 (Clontech, USA), pGEM-T (Promega, USA) y pKK223-3 (Stratagen, USA).

Los iniciadores que se utilizaron para amplificar los fragmentos correspondientes al gen de la proteína p12 (ORF3), al de la proteína p8 (ORF4) y a los genes de las proteínas p12 y p8 (ORFs 3 y 4) fueron las siguientes:

Iniciador a: 5' **GGAATTCGATATC**CCAACAATGTCGCGCAGGGGCAT 3'

Iniciador b: 5' **TGAATTCGATATC**GCTAATGACTGCTATGATT 3'

Iniciador c: 5' **GGAATTCGATATC**CCAACAATGGAAGCAGGTGCTTAT 3'

Iniciador d: 5' **GAATTCGATATC**TTATCACTGGAACTTAAC 3'

Las bases correspondientes al codón de iniciación están indicadas con letras en negrita. Los sitios para las enzimas Eco RI y Eco RV están indicados en color amarillo y verde, respectivamente. La secuencia *enhancer* de la traducción (secuencia consenso de Kozac) está indicada en letras en itálica. Las bases correspondientes al anti codón *stop* están subrayadas. Los iniciadores a y b tienen secuencias complementarias al gen de la proteína p12, y los iniciadores c y d al gen de la proteína p8.

Para los experimentos de transformación se utilizó *N. tabacum* cv. Xanthi D8 NN. Se tomaron hojas jóvenes y se esterilizaron en hipoclorito de sodio durante 20 min. Se lavaron con H₂O estéril y se cortaron en cuadrados de 1 cm de lado. Los explantos se colocaron en placas de Petri con medio líquido MS (Murashigue y Skoog, 1962), se agregaron 100 µl de un cultivo fresco de *A. tumefaciens* conteniendo el T-DNA a transferir a la planta y se incubó por 2 días a 27 °C en cámara de cría. Luego, los explantos se transfirieron a medio MS sólido suplementado con benciladenina (BA) 1 mg/L, ácido naftalenacético (ANA) 0,1 mg/L, kanamicina 100 mg/L y cefotaxime 500 mg/L. Dos a tres semanas más tarde regeneraron callos a partir de explantos. Al alcanzar los mismos 1 cm de largo, se colocaron en medio MS sólido suplementado con las mismas hormonas, más kanamicina y cefotaxime en concentraciones similares a las anteriores. Se transfirió un callo por cada explanto de hoja. Luego de 2 a 3 semanas, se transfirieron nuevamente los callos al medio MS sólido suplementado con las mismas hormonas, para promover el desarrollo de plántulas.

7. Rusticación de plantas

Antes del pasaje al cuarto de crecimiento, las plántulas crecidas *in vitro* se lavaron en H₂O corriente y se transplantaron a una mezcla de volúmenes iguales de tierra fértil y turba, suplementada con fertilizantes ricos en fosfato y nitrógeno. La temperatura del cuarto fue controlada mediante un sistema de aire acondicionado entre los 15 °C y 25 °C. Durante los primeros 2-3 días, las plantas se mantuvieron cubiertas con un frasco de vidrio o una bolsa de polietileno para evitar la deshidratación. Luego, se mantuvieron descubiertas por 1-2 h diarias, incrementando este período gradualmente. Las plantas se mantuvieron en un cuarto de crecimiento bajo luz artificial (14 h luz/10 h oscuridad) a 25-30 °C.

En el laboratorio del CEA (Francia), las plantas de tabaco fueron cultivadas en macetas individuales con vermiculita, y mantenidas en una cámara de cría con un régimen de 14 h día/10 h oscuridad (25 °C día/21 °C noche). La intensidad de la luz fue estrictamente controlada a 200 µE.m⁻².s⁻¹. Las plantas fueron fertilizadas automáticamente mediante inmersión en el medio mineral Coïc-Lesaint (Coïc y Lesaint 1971) durante 20 min todos los días. De esta manera se trató de disminuir la influencia de los factores ambientales sobre los parámetros fisiológicos.

Se crecieron los callos a partir de explantos de hojas de 1 cm² de superficie y 0,02 g de peso promedio. Para eso, se tomaron en total, 25 explantos a partir de la tercera hoja superior de cada planta, y se esterilizaron superficialmente mediante incubaciones en una solución de etanol 70 % durante 1 min, y posteriormente, en una solución de hipoclorito de sodio al 20 % durante 20 min. Luego, se lavaron los explantos con H₂O destilada estéril y se colocaron en un medio MS suplementado con 3 % de sacarosa, 1,5 mg/ml de 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxidoacético) y 0,7% de agar. Se cultivaron los explantos en un ambiente controlado con un régimen de 16 h día/8 h oscuridad (25 °C día / 21 °C noche). Se repicaron los callos generados a partir de los explantos a los 25 días. Al cabo de 50 días, se pesaron los callos obtenidos y se obtuvieron el peso promedio para cada planta. Las experiencias fueron realizadas en colaboración con la Lic. Mercedes Rivero (INGEBI-Conicet).

9. Ensayo de actividad de NPT II

La neomicina fosfotransferasa-II (NPT II) es una enzima de origen bacteriano que cataliza la fosforilación de antibióticos aminoglicósidos (neomicina, kanamicina y G-418). La reacción catalizada por esta enzima involucra la transferencia de un grupo fosfato del ATP al antibiótico. La molécula así fosforilada es incapaz de unirse al ribosoma e interferir con la síntesis de proteínas. Utilizando $\delta[^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ es posible detectar la actividad de la enzima por la incorporación de radioactividad al antibiótico.

Se trató una membrana de fosfocelulosa P81 (Whatmann, USA) con una solución de ATP 30 mM y pirofosfato de sodio 50 mM, durante 10 min con agitación y luego se la dejó secar a temperatura ambiente. Se homogenizaron aproximadamente 50 mg de hojas en presencia de 50 μl de *buffer* de extracción (glicerol 20 %, Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, β -mercaptoetanol 10 %, SDS 0,2 %), utilizando un tubo Eppendorf y un vástago de plástico. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min a 4 °C, se tomaron 15 μl del sobrenadante y se agregaron a 15 μl de una solución conteniendo Tris-HCl 65 mM, MgCl₂ 40 mM, NH₄Cl 0,4 M (titulado a pH 7,1 con ácido maleico 1 M), ATP 0,05 mM, $\delta[^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ 100 $\mu\text{Ci/ml}$, neomicina 175 $\mu\text{g/ml}$ y NaF 50 mM. Se incubó durante 1 h a 37 °C y se centrifugó durante 5 min a 12.000 rpm. Se sembraron 20 μl del sobrenadante sobre la membrana de fosfocelulosa. Luego de secar las muestras, las membranas se lavaron con *buffer* fosfato 10 mM, pH 7,4, previamente calentado a 80 °C, durante 10 min con agitación suave (el *buffer* se va enfriando a temperatura

ambiente durante los lavados). Este lavado se repitió 4 veces. Finalmente se realizaron autorradiografías en placas Kodak X-OMAT.

10. Análisis de segregación mendeliana del gen *npt II*

Se tomaron aproximadamente 100 semillas de cada línea transgénica F0, y se esterilizaron en lavandina comercial diluida al 20 % durante 5 min. Se lavaron con varios volúmenes de H₂O bidestilada estéril, se sembraron en medio de cultivo MS sólido suplementado con 100 µg/ml de kanamicina y se incubaron en cámara de cría. Dos semanas después de la germinación, se contó el número de plantas resistentes y sensibles para cada línea. Se seleccionaron las líneas que presentaron una relación plantas resistentes:sensibles igual a 3:1. Se autopolinizaron 5 plantas resistentes a kanamicina y con una relación 3:1, y se obtuvieron semillas F1 (1ª generación). Se repitieron los pasos anteriores con semillas F2 obtenidas de estas plantas F1 y se contó el número de plantas resistentes y sensibles germinadas en medio selectivo. Se consideró como una línea homocigota a las plantas F2 obtenidas de plantas madres F1 que dieron el 100 % de sus descendientes resistentes a kanamicina.

11. Northern blot

Transferencia de RNA a membranas de Nylon

Los RNAs fueron separados electroforéticamente en geles conteniendo formaldehído, tal como se describe en el punto 14. Una vez terminada la separación, se lavó y se equilibró el gel en solución SSC 10x (NaCl 1,5 M, citrato de sodio 0,15 M, pH 7) durante 30 min. El gel se transfirió por capilaridad a una membrana de Nylon (Nytran, Schleicher & Schuell, USA) equilibrada en la misma solución, como se describe en Ausubel *et al.*, (1994). Luego, la membrana de Nylon se lavó 1 vez utilizando solución SSC 10x, se secó a temperatura ambiente y se fijó durante 2 min exponiéndola a radiación UV. La membrana se guardó a temperatura ambiente hasta la hibridación.

Hibridación

La hibridación se realizó en hornos de hibridación rotatorios. Las membranas de Nylon de 10 x 16 cm se prehibridaron con 10 ml de solución Church *buffer* (SDS 7 %, BSA 1 %, NaHPO₄ 0,5 % pH 7,2, EDTA 1 mM, pH 8) durante 1 h a 65 °C. Luego, la sonda marcada con [³²P] se desnaturalizó y se agregó en el mismo tubo en que se realizó la prehibridación. Se incubó en el horno durante 16-18 h, a 65 °C (en el caso de las sondas 100 % homólogas a la secuencia blanco). Luego, se lavó una vez con SSC 2x,

SDS 0,1 % durante 15 min a temperatura ambiente, y 2 veces más con SSC 2x, SDS 0,1 % y SSC 0,2x, SDS 0,1 % durante 15 min a la temperatura de hibridación. Las autorradiografías se realizaron con película Kodak X-O-Mat y pantalla intensificadora a -70°C por períodos de tiempo variables. Cuando la membrana de Nylon fue re-hibridada con una sonda diferente, se eliminó la primer sonda unida (*stripp-off*). Para ello, se precalentó una solución de SDS 0,1 % a 100 °C y se sumergió allí la membrana, y se incubó hasta que la solución alcanzó la temperatura ambiente.

cDNAs utilizadas como sondas

Los fragmentos de cDNA para estudiar la expresión de los genes PR1a, PR2 y PR3 fueron facilitados por el Dr. Eric Lam (Rutgers University, USA). El fragmento de cDNA correspondiente a RNA ribosomal 17S de arroz fue obtenido del Dr. Jorge Muschetti (INGEBI-Conicet). El fragmento de cDNA correspondiente a la subunidad pequeña de RUBISCO fue cedido por el Dr. Christophe Robaglia (CEA, Francia).

12. Southern blot

El DNA total para análisis de *Southern blot* fue obtenido a partir de muestras de hojas de plantas crecidas en macetas, usando el *kit* comercial *DNA Easy Plant prep* (Qiagen, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante. Luego de digerir con las enzimas de restricción apropiadas, se analizaron muestras de 10 µg de DNA genómico digerido en un gel de agarosa 0,8 %. Posteriormente, el gel se trató con soluciones de HCl 0,4 N durante 30 min, con una solución de desnaturalización (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M) durante 30 min, y con una solución de renaturalización (NaCl 0,5 M, Tris-HCl 0,5 M, pH 7,4) durante 15 min, para despurinar, desnaturalizar y neutralizar el DNA, respectivamente. Finalmente, se transfirió a una membrana de Nylon Z-Probe (BioRad, USA), utilizando un sistema de transferencia capilar durante toda la noche. Después de la transferencia, la membrana se fijó por irradiación con luz UV, utilizando el aparato comercial *uv cross-linker* (Pharmacia, USA).

13. Marcación de sondas por iniciación al azar de la polimerización

Se realizó utilizando el *kit* comercial *RadPrime DNA Labelling System* (GIBCO-BRL, USA), y se siguieron las instrucciones descriptas por el fabricante. En general, la muestra de DNA fue obtenida a partir de clones previamente caracterizados donde el fragmento a utilizar como sonda se liberó por restricción con las enzimas adecuadas y

se purificó a partir de geles de agarosa. Se agregaron entre 20 y 40 ng de DNA en un volumen de 2 μ l, se desnaturalizó el mismo por calentamiento a 100 °C durante 2 min, y se lo mantuvo en hielo por 2 min. La mezcla de reacción se preparó siguiendo las instrucciones del *kit* y utilizando las soluciones provistas. En general se utilizaron 2 μ l de [32 P]-dCTP y 2 μ l del fragmento Klenow de la DNA polimerasa (1U/ μ l). La reacción se incubó durante 30 min a 37 °C y se detuvo agregando 5 μ l de EDTA 0,5 M. Para eliminar los nucleótidos no incorporados se agregó H₂O a la mezcla de reacción hasta un volumen final de 200 μ l. Se agregaron 1 μ g de DNA de esperma de salmón (sonicado) como *carrier*, 1/2 vol. de acetato de amonio 7,5 M y 3 vol. de etanol 100 %. Se centrifugó 15 min a 12.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 100 μ l de H₂O (utilizando Vortex y calor para despegarlo del fondo del tubo). Antes de hibridar, se desnaturalizó la sonda a 100 °C por 10 min y se colocó en hielo por 2 min.

14. Electroforesis

Geles de agarosa nativos

Se utilizaron geles de agarosa de entre 0,7 y 1,5 %. El *buffer* utilizado fue TAE (Tris-acetato 40 mM, pH 8,5; EDTA 2 mM). Los geles contenían 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio. En general, las corridas electroforéticas se realizaron a 5-10 V/cm y a temperatura ambiente. La composición del *buffer* de siembra 10X utilizado fue: glicerol 50 %, Azul de bromofenol (BPB) 1 %. Los geles fueron fotografiados utilizando luz UV de 365 nm en un *Image Master trans-illuminator* (Amershan Pharmacia, USA).

Geles de agarosa con formaldehído

Se fundió la agarosa en un volumen adecuado de H₂O deionizada, se dejó enfriar a 55-60 °C y se agregaron formaldehído hasta una concentración de 6 % y *buffer* MOPS 10X (MOPS 0,2 M, acetato de sodio 50 mM y EDTA 10 mM, pH 7) hasta alcanzar una concentración final de 1X. La muestra a sembrar se resuspendió en 50 % de formamida conteniendo 6 % de formaldehído y *buffer* MOPS 1X. Se calentó a 65 °C durante 10-15 min, se enfrió 2 min en hielo, se agregaron 1,5 μ l bromuro de etidio 0,1 % y 2 μ l *buffer* de siembra (BPB 1 %, glicerol 50 %). Las corridas electroforéticas se efectuaron a 100 V.

Electroforesis de proteínas

Se realizaron geles planos de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) según Laemli (1970) de 10x10 cm y 0,75 ó 1,5 mm de espesor, utilizando el sistema Mini-Protean II™ (Hoeffer, USA). Antes de sembrar las muestras se calentaron a 100 °C durante 3 min en *buffer* de siembra para proteínas (Tris-HCl 250 mM, pH 6,8, SDS 0,5 %, glicerol 5 %, β-mercaptoetanol 1 % V/V, BPB 0,05 mg/ml). Luego de la corrida electroforética, los geles se tiñeron con Coomasie Blue o se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para realizar ensayos de *Western blot*. En los casos en que se tiñó, el procedimiento fue el siguiente: se sumergió el gel en una solución de Coomasie Blue R250 0,05 %, metanol 40 %, ácido acético 10 % durante 2 h a temperatura ambiente con agitación moderada. Se lavó con metanol 45 %, ácido acético 10 %, hasta eliminar la tinción no específica, se secó sobre papel Whatman 3 MM y se fotografió. Para la tinción reversible, se utilizó una solución de Coomasie Blue R250 0,05 % en H₂O. Las bandas de proteína visualizadas por este método fueron extraídas del gel para su posterior inoculación en animales.

La composición de los geles y soluciones utilizadas fue la siguiente:

Gel separador 12 % (10 ml)

Acilamida-bisacrilamida 30 % (30:1)	4 ml
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	2,5 ml
H ₂ O destilada	3,3 ml
SDS 10 %	100 µl
Persulfato de amonio 10 %	100 µl
N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina	5 µl

Gel concentrador 5 % (5 ml)

Acilamida/bisacrilamida 30 % (30:1)	0,83 ml
Tris-HCl 1 M, pH 6,8	0,63 ml
H ₂ O destilada	3,4 ml
SDS 10 %	50 µl
Persulfato de amonio 10 %	25 µl
N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina	5 µl

Buffer de corrida:

<i>Buffer</i> Tris-HCl, pH 8,8	25 mM
--------------------------------	-------

glicina	190 mM
SDS	0,1 %

Los geles de Tricina-SDS se utilizaron para resolver proteínas pequeñas, y se prepararon según el protocolo detallado en Ausubel *et al.*, (1984). La composición de los geles y soluciones utilizadas fue la siguiente:

Gel separador 16,5% (10 ml)

Acrilamida/bisacrilamida 30% (30:1)	5,5 ml
Tris-HCl-SDS, pH 8,45	3,3 ml
H ₂ O destilada	0,1 ml
Glicerol 100 %	1,05 ml
Persulfato de amonio 10 %	100 µl
N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina	4 µl

Gel concentrador 5 %

Acrilamida/bisacrilamida 30 % (30:1)	0,54 ml
Tris-HCl-SDS pH 8,45	1,03 ml
H ₂ O destilada	2,60 ml
Persulfato de amonio 10 %	50 µl
N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina	5 µl

Buffer de corrida de ánodo (5 L):

Tris base	121,1 g
-----------	---------

Después de disolver en 500 ml de H₂O, llevar a pH 8,9. Después diluir hasta 5 L.

Buffer de corrida de cátodo (1 L):

Tris base	12,11 g
Tricina	17,92 g
SDS	1 g

Electroforesis para secuenciación

La composición del gel y soluciones utilizadas fue la siguiente:

Acrilamida-bisacrilamida 40 % (40:2)	50 ml
TBE 10x	10 ml

H ₂ O destilada	c.p.s. 100 ml
Urea	21 g
Persulfato de amonio 10 %	500 µl
N,N,N',N'-tetrametiletildiamina	50 µl

15. Western blot

Se utilizó el sistema Mini Trans-Blot™ (BioRad, USA). Luego de la corrida electroforética, el gel se sumergió en *buffer* de electrotransferencia (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, glicina 196 mM, metanol 20 %). Se cortó un trozo de nitrocelulosa (BA 85 0,45 µm, Schleicher & Schuell, USA) del tamaño del gel y se lo dejó hidratar unos minutos en el *buffer*. Se colocaron, ordenadamente y evitando la formación de burbujas, 1 esponja tipo *Scotch Brite* (BioRad, USA), 2 hojas de papel filtro Whatman 3MM, el gel, la membrana de nitrocelulosa, otras 2 hojas de papel de filtro Whatman 3MM y otra esponja tipo *Scotch Brite* (BioRad, USA). Todo esto se ensambló en el cartucho de transferencia y se colocó dentro de la cuba de electrotransferencia (BioRad, USA), que luego se llenó de *buffer*. La transferencia se llevó a cabo a 60 V (voltaje constante) durante 1 h, siempre en frío. Una vez transferida, la membrana se secó a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron en solución de bloqueo (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05-0,1 %; leche descremada en polvo 3 %, glicina 2 %) durante 60 min a temperatura ambiente, y se lavaron con TBST [Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM (TBS), Tween 20 0,05-0,1 %] dos veces de 5 min cada una. Se incubó con el anticuerpo a la dilución adecuada, en solución de bloqueo, durante 60 min a temperatura ambiente con agitación. Se lavó 3 veces durante 5 min con TBST. Se incubó con un segundo anticuerpo anti-conejo conjugado a fosfatasa alcalina (BioRad, USA) preparado en solución de bloqueo 60 min. Se lavó 3 veces con TBS durante 5 min cada vez, a temperatura ambiente. Se lavó una vez con *buffer* fosfatasa (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM), durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente se reveló utilizando la solución de revelado de BCIP-NBT, preparada de la siguiente manera: 33 µl de BCIP (bromo-cloro-indoil-fosfato 60 mg/ml en dimetil formamida 100 %), 66 µl de NBT (nitro-blue-tetrazolium 50 mg/ml en dimetil formamida 70 %) y *buffer* fosfatasa hasta 10 ml.

Antisueros utilizados

El antisuero anti-CP de PVX, gentilmente cedido por la Dra. Vilma Conci, IFFIVE-INTA, Córdoba.

El antisuero anti-p24 de PVX, gentilmente cedido por la Dra. Ximena Ares, INGEBI.

El antisuero anti-CP de TMV, gentilmente cedido por el Dr. Roger Beachy, Donald Danford Plant Institute, USA.

El antisuero anti-p12 C1, obtenido durante el presente proyecto.

16. Extracción de proteínas

Método rápido

Se tomaron 4 discos de hojas utilizando la tapa de un tubo Eppendorf a modo de sacabocado. Las muestras se homogenizaron inmediatamente en 100 µl de *buffer* de siembra para proteínas. Se calentaron a 100 °C durante 5 min y se sembraron inmediatamente en un gel de poliacrilamida de proteínas, o se guardaron a -20 °C hasta su utilización.

Método para determinar la concentración de proteínas totales

Se tomaron 10-15 discos de hojas (150-200 mg) en un tubo de microcentrífuga, se congelaron en nitrógeno líquido, se agregaron 200 µl de Solución I (Tris-HCl 0,1 M, pH 6,8, EDTA 10 mM, SDS 1 %), y se homogenizaron durante 1 min. Cada muestra se hirvió por 5 min, se agitó en Vortex y se centrifugó a 4 °C durante 15 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo en hielo, y se agregaron 4 vol. de acetona fría. Se mezcló en Vortex y se incubó en hielo 2 min. Se centrifugó a 4 °C durante 5 min, se descartó el sobrenadante y el *pellet* se dejó en hielo. Se agregaron 100 µl de Solución I al *pellet* y se resuspendió. Se centrifugó como se indicó anteriormente y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo que se guardó a -70 °C hasta su utilización. Para la medición de proteínas se utilizó el ensayo de BCA (Smith *et al.*, 1985) llevado a escala para placa de 96 pocillos (*wells*): se colocaron 30 µl de la muestra en cada pocillo y se agregaron 200 µl del reactivo. Se incubó a 37 °C durante 30 min y se leyó en un lector de ELISA la absorbancia a 570 nm.

17. Transcripción in vitro utilizando la RNA polimerasa T7

Se trabajó con materiales y soluciones libres de RNAsas. El templado de DNA utilizado fue purificado utilizando el *kit* de purificación Qiagen para DNA plasmídicos (*Qiagen Plamid Midi kit, Suecia*), según lo indicado por el fabricante. Luego, el DNA fue linealizado mediante digestión con la enzima Kpn I y trató con fenol/cloroformo (25:24:1 v/v) para eliminar las enzimas y RNAsas. Finalmente, el DNA fue

resuspendido en H₂O libre de RNAsas a una concentración final de 1 µg/µl. La reacción de la transcripción se realizó de acuerdo a las siguientes condiciones:

Buffer de transcripción T7 5x	4 µl
DNA (1 a 2 µg total)	2 µl (para pPVX3 1µg/µl)
Fragmento Klenow de la DNA polimerasa (1U/µl)	1 µl

Incubar durante 15 min a temperatura ambiente.

Luego, en el mismo tubo se agregaron los siguientes reactivos, respetando el orden de los mismos:

Mezcla de rNTP (ver más abajo)	5 µl
Análogo de CAP 10 mM (New England Biolabs, USA)	1,2 µl
DMSO concentrada	2 µl
Mezcla de enzimas RNA polimerasa T7 y pirofosfatasa, más inhibidor de RNAsas (del <i>kit</i>)	2 µl

Incubar durante 1 h a 37 °C .

Se analizó 1µl de la reacción en un gel nativo de agarosa 1 %

Finalmente, se agregaron los siguientes reactivos:

GTP 100 mM	1 µl
------------	------

Mezcla de enzimas RNA polimerasa T7 y pirofosfatasa, más inhibidor de RNAsas (del *kit*)

	1 µl
--	------

Incubar 1 h a 37 °C.

La mezcla de rNTP se preparó agregando ¼ del vol. final de ATP, CTP y UTP 100 mM, para obtener una concentración final de 25 mM cada nucleótido. Luego se agregó ¼ vol. de GTP 10 mM para obtener una concentración final de 2,5 mM de GTP. La concentración final del análogo del CAP fue de 0,6 mM. La relación análogo de CAP:GTP fue 1:1.

18. Cultivo y electroporación de protoplastos

Se utilizaron protoplastos obtenidos de la línea celular de tabaco BY-2 (Watanabe *et al.*, 1987). Para tal fin, se utilizó un cultivo células BY-2 de 100 ml crecido en el medio BY-2 (sacarosa 3 %, sales MS 4,3 g/L, tiamina-HCl 1 mg/ml, ácido 2,4-D 0,2 mg/L, inositol 100 mg/ml, pH 5,7, manitol 0,2 M) en un Erlenmeyer a una temperatura de 25°C con una agitación de 200 rpm. Para la preparación de protoplastos, se sembraron 10 ml de un cultivo de protoplastos BY-2 en 100 ml de medio fresco BY-2 y se incubó durante 48 h en las mismas condiciones. Se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml y se dejó reposar durante 10 min. Se retiró el sobrenadante, dejando las células en un volumen de aproximadamente 5 ml de medio BY-2. Se agregó el *buffer* PIM (manitol 250 mM, acetato de sodio, 12 mM, pH 5,8; CaCl₂ 50 mM) hasta un volumen de 35 ml. Se dejó reposar a temperatura ambiente o a 30 °C durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 25 ml de una solución enzimática (celulasa (Onozuka-Yakult, Japón), 10 mg/ml, pectoliasa Y23 (Seishin Pharmaceutical, Japón), 1 mg/ml). Se transfirió a una placa de Petri y se incubó durante 30 min a 30 °C. Los agregados celulares que se formaron durante la incubación fueron disgregados mediante succión y expulsión a través de una pipeta. Se incubó 3 ó 4 h adicionales, repitiendo ocasionalmente el procedimiento durante la incubación. Se centrifugaron los protoplastos a 100 g por 10 min y se eliminó el sobrenadante de solución enzimática. Se lavaron las células tres veces seguidas con 10 ml de *buffer* PIM. Luego, se las resuspendió en el *buffer* de electroporación (manitol 200 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, HEPES 10 mM, pH 7,2) y se las contó en cámara de Neubauer. Se llevó la solución a una densidad celular de 1×10^6 células/ml y se alicuotó 1 ml por tubo Falcon de 15 ml. Se mezcló con la reacción de transcripción (transcriptos virales infectivos) y se transfirió inmediatamente a una cubeta de electroporación de 0,4 cm (BioRad, USA). Se aplicó un pulso eléctrico de 250 μ FD y 150 V en el electroporador comercial Gene Pulser II (BioRad, USA), se transfirió al tubo Falcon original y se dejó recuperando en hielo durante 10 min. Finalmente, los protoplastos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 min y se les agregó 10 ml de medio de cultivo BY-2. Las células se mantuvieron en un incubador a 25 °C durante 24-48 h.

Alternativamente, se prepararon protoplastos a partir de hojas de plantas de tabaco crecidas *in vitro*. Para ello, se incubó 1 g de tejido durante toda la noche a temperatura ambiente con una solución de manitol 0,6 M conteniendo 0,015 g/ml celulasa R10 y 0,002 g/ml macerasa R10 (Onozuka-Yakult, Japón), 0,1 % ácido 2-(N-morpholino) etanosulfónico, pH 5,8. Luego, se filtró la suspensión de los protoplastos a través de

un filtro de 300 μm y se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml. A continuación, se agregó un colchón de sacarosa 0,6 M en cada tubo y se centrifugó a 1.200 g a temperatura ambiente durante 5 min. Se transfirió la interfase a un nuevo tubo y se centrifugó nuevamente. Se resuspendió el *pellet* y se lavó 2 veces con una solución de manitol 8 %, CaCl_2 4 mM, KCl 80 mM, Na_2PO_4 , pH 7,2. Se electroporaron 300 μl de células a una densidad celular de 1×10^6 células/ml mezcladas con transcritos de RNA infectivos obtenidos *in vitro*, utilizando un electroporador Gene Pulser II (BioRad, USA) y una cubeta de 0,2 cm (BioRad, USA). Los parámetros de electroporación que se utilizaron fueron de 0,16 kV y 125 μFD . El *buffer* de electroporación fue manitol 8 %, KCl 80 mM, CaCl_2 4 mM, Na_2PO_4 , 2 mM, pH 7,0. Luego, se incubaron las células a 0 °C durante 5 min y se resuspendieron en 1ml de manitol 9 %, sacarosa 3 %, por 24-48 h.

Para los análisis de *Western blot*, se tomó 1 ml de cultivo ($1-3 \times 10^5$ células), y se centrifugó a 1.000 g durante 10 min. El *pellet* celular se transfirió a un tubo Eppendorf, se volvió a centrifugar a 1.000 g y el *pellet* se resuspendió directamente en *buffer* de siembra para proteínas y se calentó a 100 °C por 5 min. Se sembraron 10 μl en cada calle de un gel de poliacrilamida-SDS.

Recuento de protoplastos viables utilizando diacetato de fluoresceína (FDA)

Los protoplastos viables transportan a su interior el FDA por lo cual se observan de un color verde brillante. Se diluyó 10 veces una alícuota de 10 μl de la suspensión de protoplastos en el *buffer* PIM. Se preparó una solución de FDA 0,1 mg/ml en acetona. Para determinar la viabilidad de las células, se agregaron 10 μl de la suspensión de protoplastos, 89 μl de *buffer* PIM y 1 μl de FDA. Se mezcló y se dejó reposar 2 min. Luego, se colocaron las células en una cámara de Neubauer y se las contó en un microscopio de fluorescencia bajo luz UV. Se calcularon los protoplastos viables por ml, según: $\text{protoplastos viables/ml} = \text{N}^\circ \text{ de protoplastos fluorescentes} \times 10^4 \times \text{factor de dilución}$.

19. Purificación de TMV

Se homogenizaron 1-2 g de hojas de tabaco severamente infectadas con TMV en 1-2 ml de *buffer* fosfato 0,5 M pH 7, β -mercaptoetanol 14,3 mM. Se midió el volumen del extracto y se agregaron 2 vol. de cloroformo:butanol 50:50 (v/v) saturado en H_2O . Se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 min. La fase acuosa se transfirió a otro tubo de microcentrífuga y las partículas virales se precipitaron con PEG_{8000} 4 % durante 10 min en hielo. Se centrifugó a los viriones durante 10 min. Los *pellets* se resuspendieron en

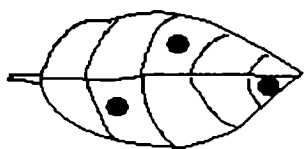
buffer fosfato 10 mM, pH 7 (100-200 μ l) y se volvieron a centrifugar durante 10 min para su clarificación. Se precipitó nuevamente el virus con PEG₈₀₀₀ 4 % y NaCl 1 % y se concentró por centrifugación. El *pellet* se resuspendió en *buffer* fosfato 10 mM, pH 7 (100-200 μ l) y se midió la concentración de los viriones en un espectrofotómetro. En una cubeta de 1 cm, una absorbancia de 2,97 (A_{260}) equivale a una concentración viral de 1 mg/ml. La relación A_{260}/A_{280} debe tener un valor cercano a 1,20.

20. Ensayos de infección

En cada ensayo de infección se inocularon entre 3 y 8 plantas por línea. Los experimentos se repitieron al menos 4 veces para las infecciones con PVX, 2 veces para las infecciones con PVY y TMV, 2 veces en las co-inoculaciones con PVX-PVY, 2 veces para la versión mutante de PVX Δ p12, 2 veces con las plantas injertadas, y 1 vez para los experimentos de inoculación localizada y de re-inoculación con PVX. Las plantas se cultivaron en el cuarto descrito en el punto 7 y, a las 6-8 semanas post-germinación, se inocularon mecánicamente a la 3ª hoja superior utilizando carborundum como abrasivo. Las hojas inoculadas se lavaron luego de 10 min con H₂O.

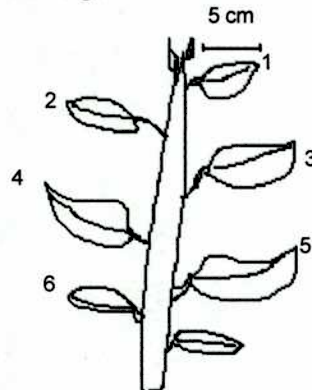
21. Ensayos de ELISA

Los ensayos de ELISA para la detección y cuantificación de PVX y PVY se realizaron utilizando *kits* comerciales (*Boehringer Mannheim*, Alemania) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Como se muestra en el esquema, para la toma de muestras se cortaron 3 discos de hojas (35-50 mg en total) tratando de abarcar todo el área de la hoja. Los discos se colocaron en un tubo Eppendorf de 1,5 ml junto con 300 μ l de *buffer* de homogenización del *kit* y se homogenizaron utilizando un embolo especialmente adaptado al mismo acoplado a un motor eléctrico de velocidad regulable. Los extractos se guardaron a -20°C hasta el momento del ensayo.



22. Muestras de hojas

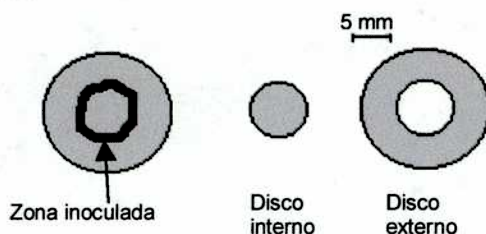
Para la toma de muestras, se numeraron las hojas de una planta desde arriba hacia abajo. En casi todos los casos, la hoja seleccionada para el muestreo fue el número 3. Se consideró como hoja número 1 a aquella hoja superior totalmente expandida con más de 5 cm de largo.



Muestras de hojas en el experimento de inoculación localizada

Para la inoculación localizada en hojas, primero, se pintó la boca del borde más ancha de una pipeta Pasteur con un marcador indeleble. Se presionó sobre la hoja en forma de un sello para marcar la zona que se inoculó. Luego de marcar 6 zonas por hoja/planta, se mojó la boca de la misma pipeta con un extracto de hojas infectadas, se eliminó el excedente del líquido en el borde del tubo que contiene el extracto, y se colocó la boca de la pipeta en forma coincidente con la zona marcada con el marcador. Previamente, las hojas fueron polvoreadas con carborundum. Una vez apoyada la pipeta, se la giró levemente haciendo un poco de presión. Se repitieron los pasos en cada zona marcada. De esta manera, quedaron marcados sobre la hoja, los sitios exactos de las inoculaciones.

Para la toma de muestras, se utilizaron 2 sacabocados de tamaños diferentes. Uno pequeño que coincidía exactamente con la zona marcada con el marcador, y uno grande que abarcaba una región circundante a la zona marcada de aproximadamente 5 mm.



La secuenciación DNA se realizó por el método de terminación de cadena por dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977).

Secuenciación manual

Se utilizó el *kit* comercial de *fmol DNA sequencing* (Promega, USA). La preparación del DNA plasmídico, la mezcla de reacción y la purificación de los productos se realizó según las especificaciones del fabricante. Para resolver los productos de la reacción de secuenciación, se utilizaron geles preparados a partir de una solución de acrilamida 38 % y bisacrilamida 2 % (ver el punto 14). La corrida electroforética se realizó a una potencia constante de 60 W en una cuba vertical (BRL-GIBCO, USA). Los geles se fijaron durante 15-20 min en metanol 10 %, ácido acético 10 % y se secaron bajo línea de vacío a 80 °C, durante 1,5-2 h. El *buffer* de siembra consistió en formamida 80 %, TBE 1X, BPB 0,2 %, xilen cianol 0,2 %. Las muestras fueron calentadas a 80 °C durante 2 min antes de ser sembradas.

Secuenciación automática

Se utilizaron 2 *kits* comerciales de Applied Biosystems (USA): *Taq Dye Primer Cycle Sequencing Kit* (para utilizar iniciadores universales) y *PRISM™ Ready Reaction Dye Deoxy™ Terminator Cycle Sequencing Kit* (para utilizar iniciadores específicos). En ambos casos, la preparación del DNA plasmídico, la mezcla de reacción y la purificación de los productos se realizaron según las especificaciones de los fabricantes. Se utilizó un secuenciador automático Model 373A *DNA sequencing system* (Applied Biosystems, USA).

24. Inmunización de conejos

Se inmunizaron 2 conejos de 3 meses de edad de la siguiente manera: al día 0 se extrajo 1 ml de sangre (suero preinmune) y a continuación se inyectó una dosis de 100 µl de la solución de proteína purificada (0,5 mg/ml) en la vena marginal de la oreja con una aguja de calibre 25. Al día uno, se inyectó un total de 1 ml de una emulsión de antígeno en adyuvante completo de Freund (CFA), preparada con 1 ml de CFA y 1 ml de antígeno 1 mg/ml. La emulsión se inyectó por vía intradérmica en 30 sitios diferentes del lomo, previamente afeitado. El volumen remanente, que no pudo inyectarse en el lomo, se aplicó por vía subcutánea. A las 5 semanas se administró el primer refuerzo, que consistió en 2 inyecciones de 0,5 ml de una emulsión preparada

con 0,5 ml de la solución de antígeno (1 mg/ml) y 0,5 ml de adyuvante incompleto de Freund (IFA), en cada pata trasera, por vía intramuscular. A los 12 días luego del refuerzo, se extrajeron 20-30 ml de sangre de la vena de la oreja. La sangre se dejó coagular durante 2 h a temperatura ambiente, se separó el coágulo de las paredes del tubo, y se dejó toda la noche a 4 °C para que el mismo se contrajera. Se centrifugó a 10.000 g por 10 min a 4 °C y se colectó la fase correspondiente al suero. Se alicuotó en volúmenes de 0,5 ml y se mantuvo a -20 °C hasta su uso. Al cabo de 4 semanas, se realizó un refuerzo y un sangrado similares a los anteriores. Durante esta etapa se trabajó en colaboración con la empresa Biosidus S.A., la que nos facilitó a los animales y la infraestructura.

25. Inmunización de ratones con DNA plasmídico

Se utilizaron ratones de 6-8 semanas (pesos de entre 19-21 g). En general, las hembras responden mejor a las inoculaciones por este protocolo. Los animales fueron previamente anestesiados para evitar la contracción muscular durante las inyecciones. Para ello se utilizó pentobarbital de sodio (75 mg/kg, intraperitoneal) o halotano inhalable. Luego de anestesiar, se afeitó una de las patas traseras para exponer la zona del músculo tibial. La solución de DNA se preparó en *buffer* PBS a una concentración entre 0,5-1 mg/ml. Cada músculo se inyectaron con 50 µl de solución de DNA. Se utilizó una aguja de calibre 27 (0,4 x 20 mm) en una jeringa de 1 ml de tipo tuberculina. Se colocó en la base de la aguja, un tubo de polietileno (diámetro del tubo = 2 mm, grosor de la pared del tubo = 0.38 mm) de tal manera de dejar expuestas solamente 2-3 mm de la punta de la aguja. Se cargó la solución de DNA en la jeringa, y se inyectó en forma perpendicular sobre el músculo tibial del animal, presionando suficientemente para que el borde del tubo de polietileno presione sobre la piel del animal. Luego de inyectar, se aguardaron 10 seg para permitir la difusión de la solución de DNA. Este trabajo se realizó en colaboración con la Dra. Gabriela Levitus y el Lic. Sergio Ghio del INGEPI-Conicet.

26. Baculovirus

Los baculovirus son vectores versátiles y poderosos que han sido utilizados en diversos sistemas eucariotes para expresar proteínas provenientes de diversas fuentes (Gruenwald y Heitz, 1993). Los baculovirus (familia *Baculoviridae*) son virus DNA doble de cadena (dsDNA) e infectan numerosas especies de insectos que son

sus hospedadores naturales. El genoma de baculovirus consiste en una molécula de dsDNA circular superenrollada de aproximadamente 130 kb. La misma se replica y se transcribe en el núcleo de la célula hospedadora, en donde es empaquetada en nucleocápsides en forma de bastón. Debido a la naturaleza flexible de estas nucleocápsides, el tamaño de las partículas puede ser variable, es decir, las partículas de baculovirus recombinantes pueden acomodar una cantidad grande de DNA foráneo. La cepa de baculovirus mejor estudiada es *Autographa californica nuclear polyhedrosis* (AcNPV). Su genoma fue completamente mapeado y parcialmente secuenciado. La polihedrina es una proteína sintetizada abundantemente durante la etapa tardía de la infección, alcanzando un 30-50 % de la proteína total en las células infectadas. Sin embargo, la polihedrina no es esencial para el ciclo viral. Por tal motivo, en el sistema vector se utiliza un promotor fuerte de polihedrina para dirigir la expresión de proteínas foráneas. El *DNA BaculoGold baculovirus* (PharMingen, USA) es un derivado del genoma de AcNPV y contiene una mutación letal y una delección en el gen de la polihedrina. La co-transfección del *DNA BaculoGold* con el vector de transferencia, pVL1393, rescata la mutación letal mediante una recombinación homóloga dentro de la célula de insecto co-transfectada. De esta manera se logra una eficiencia de casi 100 % en la obtención de baculovirus recombinantes. Este sistema de expresión presenta la ventaja de expresar a la proteína foránea en su forma nativa con todas las modificaciones post-traduccionales. Debido a que la traducción de la proteína foránea en este sistema comienza a partir su propio ATG, es conveniente introducir un consenso de Kozack en las secuencias adyacentes. Además, la distancia entre el ATG y el promotor de polihedrina debe ser la mínima posible para favorecer una alta expresión. El sistema de expresión mediante baculovirus requiere el empleo de las técnicas que se describen a continuación:

Líneas celulares

Se utilizó la línea sf9, originalmente establecida a partir del tejido ovárico de la larva *Spodoptera frugiperda*. Las células sf9 se cultivaron en forma de monocapas en el medio de cultivo TNK-FH (Clontheck, USA) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 % y a 27 °C. Las células se repicaron cada 3 ó 4 días. Las células crecidas hasta el punto de confluencia fueron despegadas de la base de la botella mediante sacudidas suaves. La suspensión celular se homogenizó con una pipeta mediante succión y expulsión, y se llevó a una dilución 1:3 con medio fresco TNM-FH SFB 10 %. Para determinar la viabilidad de las células, se empleó la tinción con el colorante vital *Trypan Blue*, el cual tiñe las células muertas (Ausubel *et al.*, 1984).

Co-transfecciones para generar baculovirus recombinantes

Se utilizó el *kit* comercial *Baculovirus Expression Vector System* (PharMingen, USA). La co-transfección se realizó según las especificaciones del fabricante. Brevemente, para la co-transfección del *DNA Baculogold* (PharMingen, USA) y el vector de transferencia que contiene los genes de las proteínas p12 y p8 (ORFs 3 y 4) o de la proteína p8 de PVX (ORF4) (pVL12a y pVL8a, respectivamente), se mezclaron en un tubo 0,5 µg de *DNA BaculoGold* con 2 µg de vector pVL12a o pVL8a. Se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente y se agregó 1 ml de *buffer* de transfección B del *kit*. Se preparó previamente una placa de Petri de 60 mm sembrada con 2×10^6 células sf9. Se aspiró el sobrenadante y se agregó el *buffer* de transfección A del *kit*, cubriendo toda la superficie de las células. Luego, se agregó 1 ml de *buffer* B con los DNAs en forma de gotas, observándose la formación de precipitados blancos durante el proceso. Se incubó durante 4 h a 27 °C y se descartó el sobrenadante de la placa de Petri. Se lavaron las células 2 veces con 3 ml de medio de cultivo TNK-FH. Finalmente, se agregaron 3 ml de medio de cultivo fresco TNK-FH suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 % y se incubó a 27 °C durante 4 a 5 días. A los 5 días de incubación, se tomó el sobrenadante del medio de cultivo y se guardó a 4 °C. Los baculovirus recombinantes presentes en el sobrenadante se utilizaron como inóculo inicial para su amplificación mediante infecciones repetidas en células sf9.

Ensayos de dot-blot para confirmar la producción de baculovirus recombinantes

Los ácidos nucleicos desnaturalizados se aplicaron a una membrana Z probe (BioRad, USA) utilizando un equipo de filtración por vacío (Bio-Dot Apparatus, BioRad, USA) que permitió obtener puntos (*dots*) homogéneos en forma rápida. Se agregaron 100 µl de una solución NaOH 0,5 N en cada uno de los 96 pocillos de una multiplaca conteniendo células sf9 previamente infectadas con diluciones seriadas del inóculo inicial (obtenido de la co-transfección). Se sacudió la multiplaca para despegar las células y se dejó reposar por 10 min. Luego, se agregaron 100 µl de acetato de amonio 1,2 M, se mezcló y se dejó reposar por 10 min más. Se fijaron los ácidos nucleicos desnaturalizados de las células infectadas a la membrana de Nylon mediante la aplicación de vacío, pasando las muestras por los pocillos del Bio-Dot. Luego de la transferencia, se trató la membrana en la forma descrita para el protocolo de *Southern blot*. La sonda se preparó según lo indicado en el punto referido a la preparación de sondas radiactivas.

Titulación del virus

El ensayo consistió en infectar a una monocapa de células sf9 con una dilución alta de la suspensión viral para favorecer la infección de sólo algunas de ellas. Se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-3} a 10^{-7} de la suspensión de virus previamente amplificada en un volumen final de 1 ml. Se infectaron las células sf9 crecidas en forma de monocapa en una placa de 6 pocillos con cada una de las diluciones y se incubó durante 1 h a 27 °C. Se descartaron los sobrenadantes de cada pocillo y se agregaron 2 ml de una solución 0,5 % agarosa en medio de cultivo TNM-FH y se dejó solidificar. La cobertura formada por la capa de agarosa permitió mantener estable a las células infectadas y controlar la propagación viral hacia otras células vecinas. Se incubó la placa durante 4 días a 27 °C y se agregaron en cada pocillo 2 ml de una solución de 0,5 % agarosa en medio de cultivo TNM-FH suplementado con Rojo Fenol 0,5 mg/ml. Finalmente, luego de 2 días de incubación, se produjo la lisis de las células infectadas formando placas de lisis. Cada placa se originó a partir de una partícula viral.

27. Expresión de la proteína p12 en la cepa BL24 de *E. coli*

Debido a la naturaleza tóxica de la proteína p12, se pusieron a punto las condiciones para inducir su expresión en células BL24 de *E. coli*. El sistema de expresión basado en la cepa BL24 se basa en utilizar simultáneamente 2 plásmidos compatibles en una misma célula bacteriana. Uno de ellos es el vector de expresión pRSETc conteniendo el gen de la proteína p12 de PVX (ORF3) bajo el promotor pT7 (pRSETp12). El segundo plásmido se encuentra integrado en el genoma bacteriana de BL24 y contiene el gen que codifica la RNA polimerasa del fago T7 bajo un promotor termoinducible de *E. coli* (Ausubel *et al.*, 1984). Luego de la inducción por calor, se produce RNA polimerasa T7 y se inicia la transcripción del gen de la proteína p12 a partir del promotor pT7.

Las células competentes BL24 se transformaron con el plásmido pRSETp12. Se creció un cultivo de una de las colonias obtenidas en medio líquido conteniendo ampicilina durante toda la noche a 30 °C. Al otro día, se preparó un *stock* iniciador agregando glicerol 50 % al cultivo líquido hasta una concentración final de 8 % y se mantuvo a -70 °C. Para la inducción, se inició un cultivo líquido de 50 ml conteniendo ampicilina a partir de 1 ml del *stock* iniciador y se incubó con agitación a 30 °C hasta alcanzar una DO_{600} de aproximadamente 0,25 (aproximadamente 4-5 h de incubación). Luego, el cultivo líquido se incubó a 42 °C durante 30 min y se dejó recuperando durante 2 h a 37 °C. Se cosecharon las células por centrifugación y se prepararon extractos a partir

de ellas. Para la purificación de los cuerpos de inclusión, las células BL24 previamente resuspendidas en 5 ml *buffer* de lisis (*buffer* fosfato PH 7, EDTA 1 mM) se sonicaron en frío. Luego, se centrifugó a 5.000 g durante 10 min, se descartó el sobrenadante, y se resuspendió el *pellet* con 1 ml de *buffer* de lisis.

28. Observaciones microscópicas

Para la fijación de tejidos vegetales, se incubaron muestras de tejido de aproximadamente 1 mm x 1 mm del tamaño en una solución de 2,5 % glutaldehído en *buffer* fosfato 0,1 M, pH 6,8 durante 2 h a temperatura ambiente. Luego, las mismas se lavaron tres veces con el *buffer* fosfato y se post-fijaron con una solución de tetraóxido de osmio 1 % durante 1-2 h a 4 °C. Posteriormente, las muestras se deshidrataron mediante incubaciones sucesivas de 30 min en etanol 50, 60, 70 y 90 %, y se incluyeron en resina LR White (Polyscience, USA). Alternativamente, los pasos de deshidratación se realizaron con mezclas de etanol:propileno en relaciones de 3:1, 1:1 y 1:3. Luego, se trató con óxido de propileno y se incluyó en resina Spur (Polyscience, USA). Los cortes de los tacos con muestras incluidas se realizaron con un micróscopio Ultracut E (Reichert-Jung, Alemania). Las secciones se observaron en un microscopio óptico.

Los depósitos de callosa y de lignina se revelaron siguiendo los procedimientos descritos por O'Brien y Mc Cully (1981) y Fulcher (1982). Para ello, se cortaron un pequeño trozo de tejido conteniendo lesiones de tipo HR de hojas de plantas p12 infectadas con PVX. El tejido se incubó en Aniline Blue 0,1% para detectar callosa y en Safranina O 0,1% para detectar lignina. La tinción con Aniline Blue se visualizó mediante un microscopio de epifluorescencia Zeiss equipado con un condensador de epi-iluminación III RS y con los filtros de 365 y 418 nm como filtros de excitación y de barrera, respectivamente. La tinción de lignina fue registrada con luz blanca en el mismo microscopio. La acumulación de componentes fenólicos en las hojas de plantas p12 infectadas se observó con luz UV de 365 nm en un *aparato UV Image Master trans-illuminator* (Amersham Pharmacia, USA).

Para las observaciones de microcopla electrónica, los cortes incluidos en resina Spur o LR White, se montaron en grillas cubiertas de Formward (Polyscience, USA) y carbón. Luego, las muestras se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-10C (Carl Zeiss, Alemania). Los ensayos de inmunolocalización se realizaron de acuerdo con el protocolo descrito por Davies *et al.* (1993). Brevemente, luego de obtener cortes con

el micrótopo, los mismos se montaron en grillas de níquel y se incubaron con los antisueros apropiados, según el procedimiento descrito en la sección de *Western blot*. En la composición del *buffer* de bloqueo, se usó BSA en vez de leche descremada, y no se agregó Tween-20. Como segundo anticuerpo se utilizó anti-conejo conjugado a oro coloidal de 10 nm de diámetro en una dilución 1:100.

Para las observaciones de microscopía confocal, se utilizó un microscopio Olympus Optical (GmbH, Alemania) provisto de un láser de krypton/argon (488 nm).

Los trabajos en el microscopio óptico y en el microscopio electrónico de transmisión fueron realizados en colaboración con la Dra. Sara Maldonado (UBA-INTA). Los trabajos con el microscopio confocal fueron realizados en colaboración con la Dra. Catherine Sarrobert (CEA, Francia).

29. Mediciones de parámetros fisiológicos

Las mediciones que se describen a continuación fueron realizadas en colaboración con la Dra. Catherine Sarrobert (CEA, Francia).

Mediciones de intercambio carbónico

Se utilizaron plantas de entre 6-7 semanas de edad. Las plantas fueron crecidas por 3 días en una cámara de cría equipada con un sensor de CO₂ en condiciones en las condiciones descritas en el punto 7. La fotosíntesis se calculó a partir de la cantidad de CO₂ asimilado por las plantas durante el período de luz, en un ambiente con una concentración de CO₂ de 300 µL.L⁻¹ (300 ppm) y una intensidad lumínica de 300 mol.m⁻².s⁻¹. La respiración fue calculada durante el período de oscuridad a partir de la cantidad de CO₂ producida y normalizada por unidad de superficie de hoja. Los resultados representan los promedios de 3 mediciones independientes. Se utilizaron 4 plantas para cada línea por medición.

Mediciones de los niveles de azúcares y nitrato

Los niveles de azúcares solubles y de almidón se determinaron mediante *kits* comerciales y procediendo según las especificaciones del fabricante. Brevemente, los azúcares y el almidón se extrajeron a partir de 1 g de hoja congelado en nitrógeno líquido, utilizando 2 ml de 10 mM Tris-HCl *buffer*, pH 7,4. Luego de centrifugar a 10.000 g por 5 min, se cuantificó la cantidad de azúcares solubles en el sobrenadante utilizando un *kit* comercial para la determinación de sacarosa, glucosa y fructosa (Boehringer-Mannheim, Alemania). Para cuantificar el almidón, el *pellet* obtenido en el

paso de la centrifugación se resuspendió en 1 ml de NaOH 0,5 M y se incubó durante 1 h a 60 °C. Luego, se agregaron 20 µl de acetato de sodio/ácido acético 3 M, pH 4,5 y 80 µl de HCl 5N. Para medir el contenido de almidón se utilizó un *kit* comercial (Boehringer-Mannheim, Alemania). El almidón fue cuantificado como equivalentes de glucosa.

Para las mediciones de nitrato, se extrajo 1 g de hoja congelada en nitrógeno líquido con 2 ml de H₂O destilada. Luego de una centrifugación a 10.000 g por 5 min, se determinó la cantidad de nitrato en el sobrenadante utilizando el protocolo descrito por Castaldo *et al.* (1975).

Los resultados representan los promedios de 3 experimentos independientes, con 2 a 3 muestras por cada línea.

Mediciones de la emisión de fluorescencia de clorofila

Las técnicas de medición de fluorescencia de clorofila y de otros componentes del aparato fotosintético son utilizadas comúnmente para estudiar los eventos tempranos relacionados con la patogenicidad viral.

La emisión de la fluorescencia de clorofila puede ser analizada y evaluada cuantitativamente, informándonos sobre la eficiencia del transporte de electrones, del rendimiento cuántico y de la existencia de la fotoinhibición. Ello se debe a que la competencia entre los tres procesos disipatorios principales del fotón absorbido se refleja en cambios en la fluorescencia emitida por la clorofila (Fig. 48). En la cadena de transporte de electrones, el pasaje de un electrón desde la clorofila del fotosistema 2 (PS2) a las quinonas (Q_A) es mucho más rápido que los siguientes pasos. Por ende, cuando se acumula un exceso de Q_A reducidas, el PS2 no puede disipar la energía por esta vía, aumentando temporalmente la emisión de fluorescencia. Cuando existe ese estado de bloqueo de las vías de disipación de energía por los procesos fotoquímicos, se dice que el PS2 se encuentra “cerrado”.

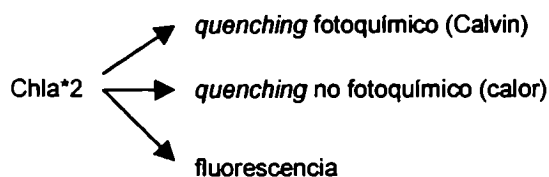


Fig. 48. Esquema de las tres formas posibles de disipación de energía absorbida por la clorofila del PS2.

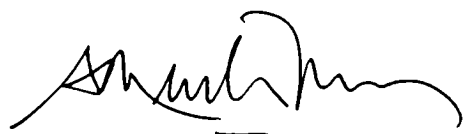
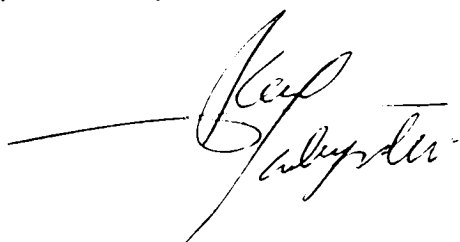
Cuando se ilumina una hoja con un pulso de luz blanca saturante, se consigue “cerrar” momentáneamente todos los centros de reacción, lo que combinado con la lentitud del transporte de electrones, da lugar a un nivel de fluorescencia máxima. De acuerdo con

lo mencionado más arriba, hay dos tipos de atenuación o *quenching* de la fluorescencia: el fotoquímico y el no fotoquímico.

El rendimiento cuántico máximo se define como $F_v/F_{\max}$. La F_v es igual a la diferencia entre F_0 y $F_{\max}$. F_0 es la fluorescencia mínima que se obtiene cuando el tejido vegetal, previamente adaptado a la oscuridad, es iluminado a muy baja intensidad, por lo que la proporción de centros de reacción cerrado es casi nula y el *quenching* fotoquímico es máximo al no haber acumulación de Q_A reducidas. $F_{\max}$ es la fluorescencia máxima que se obtiene de aplicar un pulso de luz saturante, en donde los centros de reacción están todos cerrados, y por lo tanto el *quenching* fotoquímico es nulo. El registro de valores de $F_v/F_{\max}$ disminuidos es un parámetro indicativo de que el PS2 de dicha muestra se encuentra dañado por fotoinhibición.

Además, las mediciones de fluorescencia en presencia de luz ambiental controlada (denominada luz modulada) permiten calcular el rendimiento cuántico efectivo del PS2 adaptado a la luz ambiental. El mismo se define como $\Delta F/F'_{\max}$, en donde ΔF es la diferencia entre $F'_{\max}$ y F . La $F'_{\max}$ es la fluorescencia obtenida aplicando el pulso saturante de luz en una hoja previamente adaptada a la luz ambiental. F es la fluorescencia obtenida aplicando la luz modulada, de distintos valores de irradiancia. El $\Delta F/F'_{\max}$ disminuye a medida que se le aplica mayor valor de irradiancia de la luz modulada a la hoja. En resumen, la medición de fluorescencia con luz modulada permite calcular parámetros relacionados con el *quenching* fotoquímico, proporcionando datos acerca de la eficiencia de transporte de electrones. Cuanto menor es el rendimiento cuántico efectivo, menor es el valor del *quenching* fotoquímico y por lo tanto menor, es la eficiencia de transporte de electrones.

Las fluorescencias de la clorofila en hojas intactas se midieron utilizando el fluorómetro PAM-2000 fluorometer (Walz, Alemania). El rendimiento cuántico máximo de PS2 fue calculado a partir de hojas adaptadas en la oscuridad durante 30 min. La relación $F_v/F_{\max}$ fue determinada de la siguiente manera. $F_v = F_{\max} - F_0$, en la cual F_v es la fluorescencia variable, $F_{\max}$ es la máxima fluorescencia obtenida mediante la irradiación con 800 mseg de pulsos de luz blanca en la hoja (densidad de flujo fotónico $> 4000 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$), y F_0 es la fluorescencia inicial que se produce bajo la luz roja de 655 nm de longitud de onda y modulada a 600 Hz. El rendimiento cuántico efectivo fue calculado a partir de las mediciones de fluorescencia en hojas irradiadas en forma continua con una luz de 255 o 600 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y pulsos regulares de luz blanca saturante para estimar la eficiencia de transporte de electrones. El resultado representa el promedio de mediciones en 3 plantas por línea.



BIBLIOGRAFIA

- Anandalakshmi R, Pruss GJ, Ge X, Marathe R, Mallory AC, Smith TH, Vance VB. (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95(22): 13079-13084.
- Angell SM, Davies C and Baulcombe DC. (1996). Cell-to-cell movement of potato virus X is associated with a change in the size-exclusion limit of plasmodesmata in trichome cells of *Nicotiana clevelandii*. *Virology* 216: 197-201.
- Ares X. (1997). Caracterización de la proteína de 24 kDa de PVX, y obtención de plantas transgénicas resistentes a tobamovirus. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
- Ares X, Calamante G, Cabral S, Lodge J, Hemenway P, Beachy RN and Mentaberry A. (1998). Transgenic plants expressing potato virus X ORF2 protein (p24) are resistant to tobacco mosaic virus and Ob tobamoviruses. *J Virol*. 72: 731-738.
- Atabekov JG, Rodionova NP, Karpova OV, Kozlovsky SV, Novikov VK, Arkhipenko MV. (2001). Translational activation of encapsidated potato virus X RNA by coat protein phosphorylation. *Virology* 286(2): 466-474.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, and Struhl K. (1994). *Current Protocol in Molecular Biology* 4 vols. John Wiley and Sons. Inc. (versión actualizada 2001)
- Baluska F, Cvrckova F, Kendrick-Jones J, Volkmann D. (2001). Sink plasmodesmata as gateways for phloem unloading. Myosin VIII and calreticulin as molecular determinants of sink strength? *Plant Physiol.* (1): 39-46.
- Baluska F, Samaj J, Napier R, Volkmann D. (1999). Maize calreticulin localizes preferentially to plasmodesmata in root apex. *Plant .J.* 19(4): 481-488.
- Baulcombe DC. (1996). RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Mol Biol.* 32(1-2): 79-88.
- Beck DL, Guilford PJ, Voot DM, Andersen MT and Forster RL (1991). Triple gene block proteins of white clover mosaic potexvirus are required for transport. *Virology* 183: 695-702.
- Beck DL, Van Dolleweerd CJ, Lough TJ, Balmon E, Voot DM, Andersen MT, O'Brien IE and Forster RL. (1994). Disruption of virus movement confers broad-spectrum resistance against systemic infection by plant viruses with a triple gene block. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 10310-10314.
- Becker F, Buschfeld E, Schell J and Bachmair A (1993). Altered response to viral infection by tobacco plants perturbed in ubiquitin system. *Plant J.* 3: 875-881.
- Berna A, Gafny R, Wolf S, Lucas WJ, Holt CA, Beachy RN. (1991). The TMV movement protein: role of the C-terminal 73 amino acids in subcellular localization and function. *Virology* 182: 889-897.
- Bianchini M, Radrizzani M, Brocardo M.G, Reyes G.B, Gonzalez Solveyra C, Santa-Coloma T.A. (2001). Specific oligobodies against ERK-2 that recognize both the native and the denatured state of the protein. *J Immunol Methods* 252: 191-197.
- Blackman LM, Gunning BES and Overall RL. (1998). A 45 kDa protein isolated from the nodal walls of *Chara corallina* is localized to plasmodesmata. *Plant J.* 15: 401-411.
- Bleykasten-Grosshans C, Guilley H, Bouzoubaa S, Richards KE and Jonard G. (1997). Independent expression of the first two triple gene block proteins of *Beet necrotic yellow vein virus* complements virus defective in the corresponding gene but expression of the third protein inhibits viral cell-to-cell movement. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 240-246.

- Brederode FT, Linthorst HJM. and Bol JF. (1991). Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding. *Plant Mol. Biol.* 17:1117-1125.
- Calamante G. (1998). Utilización del virus X de la papa como vector de expresión transitoria en plantas. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.
- Carrington JC, Kasschau KD, Mahajan SK and Schaad MC. (1996). Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* 8: 1669-1681.
- Cataldo DA, Haroon M, Schrader LE and Youngs VL (1975). Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by titration of salicylic acid. *Commun Soil Science and Plant Analysis* 6: 71-80.
- Cockerham G. (1970). Genetical studies on resistance to potato virus X and Y. *Heredity* 25: 309.
- Coic EC and Lesaint C (1971). Comment assurer une bonne nutrition en eau et éléments minéraux en horticulture. *Hortic Fr.* 8: 11-14.
- Chen M, Sheng J, Hind G, Handa A, and Citovsky V. (2000). Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. *EMBO J.* 19: 913-920.
- Citovsky V, Knorr D, Schuster G and Zambryski P. (1990). The p30 movement protein of tobacco mosaic virus is a single-strand nucleic acid binding protein. *Cell* 60: 637-647.
- Citovsky V, Mc Lean BG, Zupan JR and Zambryski P. (1993). Phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein by a developmentally regulated plant cell wall-associated protein kinase. *Genes Dev.* 7: 904-910.
- Crawford KM and Zambryski P. (2000). Subcellular localization determines the availability of non-targeted proteins to plasmodesmata transport. *Curr. Biol.* 10: 1032-1040.
- Davies C, Hills G and Baulcombe DC. (1993). Sub-cellular localization of the 25-kDa protein encoded in the triple gene block of potato virus X. *Virology* 197: 166-175.
- Deom CM, Oliver MJ and Beachy RN. (1987). The 30-kilodalton gene product of tobacco mosaic virus potentiates virus movement. *Science* 237: 384-389.
- Deom CM, Lapidot M and Beachy RN. (1992). Plant virus movement proteins. *Cell* 69: 221-224.
- Dietrich RA, DeLaney TP, Uknes SJ, Ward ER, Ryals J and Dangl JL. (1994). *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell* 77: 565-574.
- Ding B, Turgeon R, Parthasarathy MV. (1992a). Substructure of freeze-substituted plasmodesmata. *Protoplasma* 169: 28-41.
- Ding B, Haudenschild JS, Hull RJ, Wolf S, Beachy RN, Lucas WJ. (1992b). Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 4: 915-928.
- Dorokhov Yu, Makinen K, Frolova O, Merits A, Saarinen J, Kalkkinen N, Atabekov JG and Saarma M. (1999). A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: the host-cell receptor for the tobacco mosaic virus movement protein. *FEBS Lett.* 461: 223-228.
- Dumer J, Shah J and Klessing DF. (1997). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends. Plant Sci.* 7: 266-274.

Erhardt M, Stussi-Garaud C, Guilley H, Richards KE, Jonard G and Bouzoubaa S. (1999). The first triple gene block protein of *Peanut clump virus* localizes to the plasmodesmata during virus infection. *Virology* 264: 220-229.

Ermey C, Schoumacher F, Godefroy-Colburn T and Stussi-Garaud C. (1992). Nucleic acid binding properties of the 92-kDa replicase subunit of alfalfa mosaic virus produced in yeast. *Eur. J. Biochem.* 203: 167-172.

Fernandez-Northcote E. (1990). Variability of PVX and PVY and its relationship to genetic resistance. En: Control of virus and virus-like diseases of potato and sweet potato. Report of the III Planning Conference, 131, International Potato Center, Lima, Perú.

Fulcher RG. (1982). Fluorescence microscopy of cereals. *Food Microstructure* 1: 167-175.

Gilmer D, Bouzoubaa S, Hehn A, Guilley H, Richards K and Jonard G. (1992). Efficient cell-to-cell movement of beet necrotic yellow vein virus requires 3' proximal genes located in RNA 2. *Virology* 189: 40-47.

Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP and Blinov VM. (1988). A novel superfamily of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination. *FEBS Lett.* 235: 16-24.

Gruenwald S and Heitz J. (1993). *Baculovirus Expression Vector System: Procedures and Methods Manual*. 2nd ed. PharMingen.

Gurunathan S, Kinman D and Seder R. (2000). DNA vaccines immunology, application and optimization. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 927-974.

Habili N and Symons RH. (1989). Evolutionary relationship between luteoviruses and other RNA plant viruses based on the sequence motifs in their putative RNA polymerases and nucleic acid helicases. *Nucleic Acids Res.* 17: 9543-9555.

Hamilton AJ and Baulcombe DC. (1999). A novel species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing. *Science* 286: 950-952.

Haseloff J, Goelet P, Zimmer D, Ahlquist P, Dasgupta R, and Kaesberg P. (1984). Striking similarities in amino acid sequence among nonstructural proteins encoded by RNA viruses that have dissimilar genomic organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81(14): 4358-4362.

Hefferon KL, Doyle S and AbouHaidar MG. (1997). Immunological detection of the 8K protein of *Potato virus X* (PVX) in cell walls of PVX-infected tobacco and transgenic potato. *Arch. Virol.* 142: 425-433.

Heinlein M, Epel BL, Padgett HS and Beachy RN. (1995). Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton. *Science* 270: 1983-1985.

Herbers K, Meuwly P, Metraux JP and Sonnewald U. (1996). Salicylic acid-independent induction of pathogenesis-related protein transcripts by sugars is dependent on leaf developmental stage. *FEBS Lett.* 397: 239-244.

Herbers K, Tacke E, Hazirezaei M, Krause KP, Meizer M, Rohde W and Sonnewald V. (1997). Expression of luteoviral movement protein in transgenic plants leads to carbohydrate accumulation and reduced photosynthetic capacity in source leaves. *Plant J.* 12: 1045-1056.

Herzog E, Hemmer O, Hauser S, Meyer G, Bouzoubaa S and Fritsch C. (1998). Identification of genes involved in replication and movement of peanut clump virus. *Virology* 248: 312-322.

Hooker WJ and Benson AP. (1960). Time of symptoms response in *Datura tatula* L. to potato virus X as a function of virus concentration. *Virology* 10: 245-251.

- Huang M and Zhang L. (1999). Association of the movement protein of alfalfa mosaic virus with endoplasmic reticulum and its trafficking in epidermal cells of onion bulbs scales. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 680-690.
- Ishiwatari Y, Fujiwara T, McFarland KC, Nemoto K, Hayashi H, Chino M, and Lucas WJ. (1998). Rice phloem thioredoxin h has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport through plasmodesmata. *Planta* 205: 12-22.
- Itaya A, Hickman H, Bao Y, Nelson RS and Ding B. (1997). Cell-to-cell trafficking of cucumber mosaic virus movement protein: green fluorescent protein fusion produced by biolistic gene bombardment in tobacco. *Plant J.* 12: 1223-1230.
- Itaya A, Woo YM, Masuta C, Bao Y, Nelson RS and Ding B. (1998). Developmental regulation of intercellular protein trafficking through plasmodesmata in tobacco leaf epidermis. *Plant Physiol.* 118: 373-385.
- Kalinina NO, Fedorkin ON, Samuilova OV, Maiss E, Korpela T, Morozov S and Atabekov JG. (1996). Expression and biochemical analyses of the recombinant potato virus X 25K movement protein. *FEBS Lett.* 397: 75-78.
- Kavanagh T, Goulden M, Santa Cruz S, Chapman S, Barker I and Baulcombe D. (1992). Molecular analysis of a resistance-breaking strain of potato virus X. *Virology* 189: 609-612.
- Karpinski S, Reynolds H, Karpinska B, Wingsle G, Creissen G and Mullineaux P. (1999). Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* 284: 654-657.
- Kessler F, Schnell D, Blobel G. (1999). Identification of proteins associated with plastoglobules isolated from pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts. *Planta* 208: 107-113.
- Klein P, Kanelisa M and Delisi C. (1985). *Biochim. Biophys. Acta.* 815: 468. (<http://psort.nibb.ac.jp>).
- Konte G and Fritig B. (1984). An efficient microinoculation procedure to study plant virus multiplication at predetermined individual infection sites on the leaves. *Phytopathol. Z.* 109: 131-136.
- Koonin EV and Dolja VV. (1993). Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28: 375-430.
- Kooter JM, Matzke MA and Meyer P. (1999). Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends Plant Sci.* 4: 340-347.
- Kramer G and Argos P. (1984). Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Res.* 12(18): 7269-7282.
- Kragler F, Monzer J, Xoconostle-Cazares B and Lucas WJ. (2000). Peptide antagonists of the plasmodesmal macromolecular trafficking pathway. *EMBO J.* 19(12): 2856-2868.
- Krapp A, Hofmann B, Schäfer C and Stitt M (1993). Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: A mechanism for the "sink-regulation" of photosynthesis?. *Plant J.* 3: 817-828.
- Krapp A and Stitt M (1995). An evaluation of direct and indirect mechanisms for the sink-regulation of photosynthesis in spinach: Changes in gas exchange, carbohydrates, metabolites, enzyme activities and steady-state transcript levels after cold-girdling source leaves. *Planta* 195: 313-323.

- Laemli (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lazarowicz SG and Beachy RN. (1999). Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell* 11: 535-548.
- Lawrence DM and Jackson AO. (2001). Interactions of the TGB1 protein during cell-to-cell movement of Barley stripe mosaic virus. *J Virol.* 75(18): 8712-8723.
- Lough TJ, Shash K, Xoconostle-Cázares B, Hofstra KR, Beck DL, Balmori E, Forster RLS and Lucas WJ (1998). Molecular dissection of the mechanism by which potexvirus triple gene blocks mediate cell-to-cell transport of infectious RNA. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 801-814.
- Lough TJ, Netzler NE, Emerson SJ, Sutherland P, Carr F, Beck DL, Lucas WJ and Forster RL (2000). Cell-to-cell movement of potexviruses: evidence for a ribonucleicprotein complex involving the coat protein and first triple gene block protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 962-974.
- Lucas WJ. and Wolf S. (1993). Plasmodesmata: the intercellular organelles of green plants. *Trends in Cell Biol.* 3: 308-315.
- Lucas WJ, Olesinski A, Hull RS, Haudenschild JS, Deom CM, Beachy RN and Wolf S (1993). Influence of the tobacco mosaic virus 30 kDa movement protein on carbon metabolism and photosynthesis partitioning in transgenic tobacco plants. *Planta* 190: 88-96.
- Lucas WJ and Gilbertson RL (1994). Plasmodesmata in relation to viral movement within leaf tissues. *Annu Rev Phytopathol* 32: 387-411.
- Lucas WJ, Bouche-Pillon S, Jackson DP, Nguyen L, Baker L, Ding B and Hake S. (1995). Selective trafficking of Knotted 1 homoeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata. *Science* 27: 1980-1983.
- Lucas WJ and Wolf S. (1999). Connections between virus movement, macromolecular signaling and assimilate allocation. *Curr Opin Plant Biol* 2: 192-197.
- Malcuit I, Marano MR, Kavanagh TA, Dejong W, Forsynth A and Baulcombe DC. (1999) The 25 kDa movement protein of PVX elicits Nb-mediated hypersensitive cell death in potato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 536-543.
- McLean BG, Zupan J and Zambryski P. (1995). Tobacco mosaic virus movement protein associates with the cytoskeleton in tobacco cells. *Plant Cell* 7: 2101-2114.
- McLean BG, Hempel FD, Zambryski, PC. (1997). Plant intercellular communication via plasmodesmata. *Plant Cell* 7: 1043-1054.
- Meshi T, Watanabe Y, Saito T, Sugimoto A, Maeda T and Okada Y. (1987). Function of the 30 kDa protein of tobacco mosaic virus: involvement in cell-to-cell movement and dispensability for replication. *EMBO J.* 6: 2557-2563.
- Mittler R, Shulaev V and Lam E. (1995). Coordinated activation of programmed cell death and defense mechanisms in transgene tobacco plants expressing a bacterial proton pump. *Plant Cell* 7: 29-42.
- Moore PJ, Fenczik CA, Deom CM, Beachy RN. (1992). Developmental changes in plasmodesmata in transgenic tobacco expressing the movement protein of tobacco mosaic virus. *Protoplasma* 170: 115-127.
- Morozov SYu, Gorbulev VG, Novikov VK, Agranovsky AA, Kozlov YV, Atabekov JG and Baeyv AA. (1981). The primary structure of the 5'- and 3'- terminal regions of the RNA of potato virus X. *Dokl. Akad Nauk USSR* 259: 723-725. (en ruso)

- Morozov SYu, Lukasheva LI, Chernov BK, Skryabin KG and Atabekov JG. (1987). Nucleotide sequence of the open reading frames adjacent to the coat protein cistron in potato virus X genome. *FEBS Lett.* 213: 438-442.
- Morozov SY, Dolja VV and Atabekov JG. (1989). Probable reassortment of genomic elements among elongated RNA-containing plant viruses. *J. Mol. Evol.* 29: 52-62.
- Morozov SY, Miroshnichenko NA, Zelenina DA, Fedorkin ON, Solovijev AG, Lukasheva LI and Atabekov JC. (1990). Expression of RNA transcripts of potato virus X full-length and subgenomic cDNAs. *Biochimie* 72: 677-684.
- Morozov S, Miroshnichenko NA, Solovyev AG, Fedorkin ON, Zelenina DA, Lukasheva LI, Karasev AV, Dolja VV and Atabekov JG. (1991a). Expression strategy of the potato virus X triple gene block. *J Gen Virol.* 72: 2039-2042.
- Morozov S, Miroshnichenko NA, Solovyev AG, Zelenina DA, Fedorkin ON, Lukasheva LI, Grachev SA and Chernov BK. (1991b). In vitro membrane binding of the translation products of the carlavirus 7 kDa protein genes. *Virology* 183: 782-785.
- Morozov S, Fedorkin ON, Juttner G, Schiemann J, Baulcombe DC and Atabekov JG. (1997). Complementation of a potato virus X mutant mediated by bombardment of plant tissues with cloned viral movement protein genes. *J Gen Virol.* 78: 2077-2083.
- Morozov SY, Solovyev AG, Kalinina NO, Fedorkin ON, Samuilova OV, Schiemann J and Atabekov JG. (1999). Evidence for two nonoverlapping functional domains in the potato virus X 25K movement protein. *Virology* 260: 55-63.
- Murashige T and Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Naim, C.J. , Lewandowski, D.J. and Burns, J.K. (1998) Genetics and expression of two pectinesterase genes in Valencia orange. *Physiol. Plant.* 102: 226-235.
- Nejdat A and Beachy RN. (1990). Transgenic tobacco plants expressing a coat protein gene of tobacco mosaic virus are resistant to some other tobamoviruses. *Mol Plant-Microbe Interact.* 3: 247-251.
- O'Brien TP and McCully ME. (1981). The study of plant structure. Principles and selected methods. *Thermocarphy Pty. Lds., Melbourne.*
- Olesinski AA, Lucas WJ, Galun E and Wolf S. (1995). Pleiotropic effects of tobacco mosaic virus movement protein on carbon metabolism in transgenic tobacco plants. *Planta* 197: 118-126.
- Oparka KJ, Roberts AG, Roberts IM, Prior DA and Santa Cruz S. (1996). Viral coat protein is targeted to, but does not gate, plasmodesmata during cell-to-cell movement of potato virus X. *Plant J.* 10: 805-813.
- Oparka KJ, Roberts AG, Boevink P, Santa Cruz S, Roberts I, Pradel KS, Imlau A, Kotlizky G, Sauer N, and Epel B. (1999). Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell* 97: 743-754.
- Orman BE, Celnik RM, Mandel AM, Torres HN and Mentaberry AN. (1990). Complete DNA sequence of a South American isolate of potato virus X. *Virus Res.* 16: 293-305.
- Overall RL and Blackman LM. (1996). A model of the macromolecular structure of plasmodesmata. *Trends in Plant Science* 1: 307-311.

Petersen M, Brodersen P, Naested H, Andreasson E, Lindhart U, Johansen B, Nielsen HB, Lacy M, Austin MJ, Parker JE, Sharma SB, Kleissig DF, Martienssen R, Mattsson O, Jensen AB, and Mundy J. (2000). Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* 103: 1111-1120.

Petty IT and Jackson AO. (1990). Mutational analysis of barley stripe mosaic virus RNA β . *Virology* 179: 712-718.

Ponz F and Bruewing G. (1986). Mechanisms of resistance to plant viruses. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24: 355-383.

Price M. (1992). Examination of potato virus X proteins synthesized in infected tobacco plants. *J. Virol.* 66: 5658-5661.

Quirino FB, Noh YS, Himelblau E and Amasino R. (2000). Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant Sci.* 5: 278-282.

Reichel C and Beachy RN. (1998). Tobacco mosaic virus infection induces severe morphological changes of the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 11169-11174.

Reichel C, Más P, and Beachy RN. (1999). The role of the ER and cytoskeleton in plant viral trafficking. *Trends Plant Sci.* 4: 458-462.

Ross AF. (1961). Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* 14: 340-358.

Rouleau M, Smith RJ, Bancroft JB and Mackie GA. (1994). Purification, properties and subcellular localization of *Foxtail mosaic potexvirus* 26-kDa protein. *Virology* 204: 254-265.

Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cázares B and Lucas WJ. (1999). Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: implication for spracellular regulation in plants. *Development* 126: 4405-4419.

Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cázares B and Lucas WJ. (2001). The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Curr Opin Plant Biol.* 4(3): 202-209.

Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY and Hunt MD. (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8: 1809-1819.

Sambrook J, Fritsch EJ and Maniatis T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger F, Nicklen S and Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 5463-5467 (de Sambrook, J., Fritsch, E.J. and Maniatis, T., 1989).

Santa Cruz S and Baulcombe DC. (1993). Molecular analysis of potato virus X isolates in relation to the potato hypersensitivity gene Nx. *Mol Plant-Microbe Interact.* 6(6): 707-714.

Scheible WR, Gonzalez-Fontes A, Lauerer M, Müller-Röber B, Caboche M and Stitt M. (1997). Nitrate as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *Plant Cell* 9: 783-798.

Seppanen P, Puska R, Honkanen J, Tyulkina LG, Fedorkin O., Morozov S and Atabekov JG. (1997). Movement protein-derived resistance to triple gene block-containing plant viruses. *J. Gen. Virol.* 78: 1241-1246.

Sessions A, Yanofsky MF and Weigel D. (2000). Cell-cell signaling and movement by the floral transcription factors LEAFY and APETALA1. *Science* 289: 779-782.

- Sheen J, Zhou L and Jang JC. (1999). Sugars as signaling molecules. *Curr. Op. in Plant Biol.* 2: 410-418.
- Sisk WP, Bradley JD, Kingsley D, and Patterson TA. (1992). Deletion of hydrophobic domains of viral glycoproteins increases the level of their production in *Escherichia coli*. *Gene* 112(2): 157-162.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ and Klenck DC. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.
- Solovyev AG, Savenkov EI, Agranovsky AA and Morzov SY. (1996). Comparison of the genomic cis-elements and coding regions in RNA β components of the hordeiviruses barley stripe mosaic virus, lychnis ringspot virus, and poa semilatifolius virus. *Virology* 219: 9-18.
- Solovyev AG, Savenkov EI, Grdzelskikh VZ, Kalinina NO, Morozov SY, Schiemann J, and Atabekov JG. (1999). Movement of hordeivirus hybrids with exchanges in the triple gene block. *Virology* 253(2): 278-287.
- Solovyev AG, Stroganova TA, Zamiatina Jr AA, Fedorkin ON, Schiemann J and Morozov SYu. (2000). Subcellular sorting of small membrane-associated triple gene block proteins: TGBp3-assisted targeting of TGBp2. *Virology* 269: 132-127.
- Sonenberg N, Shatkin AJ, Riccardi RP, Rubin M and Goodman RM. (1978). Analysis of terminal structures of RNA from potato virus X. *Nucleic Acids Res.* 5: 2501.
- Sonnewald V, Brauer M, von Schaewen A, Stitt M and Willmitzer L (1991). Transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in either the cytosol, vacuole or apoplast: a powerful tool for studying sucrose metabolism and sink/source interactions. *Plant J.* 1: 95-106.
- Sonnewald V. (1992). Expression of *E. coli* inorganic pyrophosphatase in transgenic plants alters photoassimilate partitioning. *Plant J.* 2: 571-581.
- Sun J, Okita TW and Edwards GE. (2001). Modification of carbon partitioning, photosynthetic capacity, and O₂ sensitivity in Arabidopsis plants with low ADP-Glucose Pyrophosphatase activity. *Plant Physiol.* 119: 267-276.
- Staehelin LA. (1997). The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J.* 11(6): 1151-1165.
- Takahashi M, Shimamoto K and Ehara Y. (1989). Cauliflower mosaic virus gene VI causes growth suppression, development of necrotic spots and expression of defense-related genes in transgenic tobacco plants. *Mol Gen Genet* 216: 188-194.
- Tamai A and Meshi T. (2001). Cell-to-cell movement of Potato virus X: the role of p12 and p8 encoded by the second and third open reading frames of the triple gene block. *Mol Plant-Microbe Interact* 14(10): 1158-1167.
- Verchot J, Angell SM and Baulcombe DC. (1998). In vivo translation of the triple gene block of *Potato virus X* requires two subgenomic mRNAs. *J. Virol.* 72: 8316-8320.
- Verwoerd T, Dekker B and Hoekema A. (1989). A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res* 17: 2362.
- Voinnet O, Lederer C and Baulcombe DC. (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103: 157-162.
- Watanabe Y, Meshi T and Okada Y. (1987). Infection of tobacco protoplasts with in vitro transcribed tobacco mosaic virus RNA. *FEBS Lett.* 219: 65-69.

Watanabe Y, Ogawa T, Okada Y. (1992). In vivo phosphorylation of the 30-kDa protein of tobacco mosaic virus. FEBS Lett. 313(2): 181-184.

White RG. (1994). Actin associated with plasmodesmata. Protoplasma 180: 169-184.

Wisniewski LA, Powell PA, Nelson RS, and Beachy RN. (1990). Local and systemic spread of tobacco mosaic virus in transgenic tobacco. Plant Cell 1990 2(6): 559-567.

Wolf S, Deom CM, Beachy RN and Lucas WJ. (1989). Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. Science 246: 377-379.

Wong SM, Lee KC, Yu HH and Leong WF. (1998). Phylogenetic analysis of triple gene block viruses based on the TGB1 homolog gene indicates a convergent evolution. Virus Genes 16: 295-302.

Xoconostle-Cázares B, Xiang Y, Ruiz-Medrano R, Wang HL, Monzer J and Lucas WJ. (1999). Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. Science 283: 94-98.

Xoconostle-Cázares B, Ruiz-Medrano R, and Lucas WJ. (2000). Proteolytic processing of CmPP36, a protein from the cytochrome b(5) reductase family, is required for entry into the phloem translocation pathway. Plant J. 24(6): 735-747.

Yhalom A, Lando R, Katz A, and Epel BL. (1998). A calcium-dependent protein kinase is associated with maize mesocotyl plasmodesmata. J. Plant Physiol. 153: 354-362.

Yang Y, Ding B, Baulcombe DC and Verchot J. (2000). Cell-to-cell movement of the 25K protein of *Potato virus X* is regulated by three other viral proteins. Mol. Plant-Microbe Interact. 13: 599-605.

Zhou H and Jackson AO. (1996). Expression of the *Barley stripe mosaic virus* RNA β "triple gene block". Virology 216: 364-379.