

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Departamento de Genética



**ESTUDIO DEL MECANISMO DE RESISTENCIA  
TRANSGÉNICA A VIRUS EN PLANTAS BASADO EN  
FENÓMENOS DE SILENCIAMIENTO GÉNICO:  
RESISTENCIA EN PLANTAS PORTADORAS DEL GEN  
HC-PRO DEL VIRUS DE LA SHARKA (PPV)**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR POR**

Daniel Barajas Ramírez

Bajo la dirección del Doctor:

José Ramón Díaz-Ruíz Alba

**Madrid**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**



**CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE PLANTAS**

**ESTUDIO DEL MECANISMO DE RESISTENCIA TRANSGÉNICA A VIRUS  
EN PLANTAS BASADO EN FENÓMENOS DE SILENCIAMIENTO GÉNICO:  
RESISTENCIA EN PLANTAS PORTADORAS DEL GEN HC-PRO DEL  
VIRUS DE LA SHARKA (PPV)**

**TESIS DOCTORAL**

**DANIEL BARAJAS RAMÍREZ**

**Madrid, 2005**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**ESTUDIO DEL MECANISMO DE RESISTENCIA TRANSGÉNICA A VIRUS  
EN PLANTAS BASADO EN FENÓMENOS DE SILENCIAMIENTO GÉNICO:  
RESISTENCIA EN PLANTAS PORTADORAS DEL GEN HC-PRO DEL  
VIRUS DE LA SHARKA (PPV)**

Memoria presentada para optar al  
Grado de Doctor en Ciencias Biológicas por  
DANIEL BARAJAS RAMÍREZ

Vº Bº Director de la Tesis:

Vº Bº Codirector de la Tesis:

Dr. José Ramón Díaz-Ruiz Alba  
Profesor de Investigación  
Centro de Investigaciones Biológicas  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Dr. Francisco Tenllado Peralo  
Científico Titular  
Centro de Investigaciones Biológicas  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Vº Bº Tutora de la Tesis:

Dr. Ana Margarita Figueiras Merino  
Profesora Titular  
Departamento de Genética  
Universidad Complutense de Madrid

Daniel Barajas Ramírez



Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, bajo la dirección del Profesor José Ramón Díaz-Ruíz Alba y la codirección del Dr. Francisco Tenllado Peralo, con la financiación de una beca de Postgrado para la Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Ciencia.



*A mi Familia*



***ÍNDICE***

RESUMEN.....	14
ABREVIATURAS.....	16
AGRADECIMIENTOS.....	19
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>1.1. SILENCIAMIENTO GÉNICO POSTRANSCRIPCIONAL, DEFENSA ANTIVIRAL EN PLANTAS Y CONTRAATAQUE DE LOS VIRUS.....</b>	<b>23</b>
1.1.1 Resistencia derivada del patógeno y silenciamiento génico.....	24
1.1.2 Inducción de silenciamiento génico por transgenes.....	25
1.1.3 Inducción de silenciamiento génico por virus y recuperación.....	27
1.1.4 Mecanismo del silenciamiento génico postranscripcional (PTGS).....	28
1.1.5 Supresión de PTGS en plantas por proteínas virales.....	31
1.1.5.1. Supresión de PTGS por la proteína HC-Pro de potyvirus.....	32
1.1.5.2. Otras proteínas virales supresoras de PTGS.....	34
1.2. LOS POTYVIRUS.....	36
1.2.1 Posición taxonómica.....	36
1.2.2 Características de la familia Potyviridae.....	36
1.2.3 El género Potyvirus.....	37
1.2.3.1. Estructura y organización genómica.....	37
1.2.3.2. Estrategia de expresión genómica: procesamiento de la poliproteína viral.....	37
1.3. EL VIRUS DE LA SHARKA (PPV).....	41
1.3.1 Características y control de la enfermedad.....	41
1.3.2 La proteína HC-Pro de PPV.....	43
1.4. HIPOVIRUS.....	44
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>47</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
<b>3.1. VIRUS E INOCULACIÓN DE PLANTAS.....</b>	<b>53</b>
3.1.1 Origen de los aislados virales.....	53
3.1.2 Mantenimiento de las plantas.....	53
3.1.3 Transcripción in vitro de clones de PVX e inoculación de transcritos virales.....	53
3.1.4 Inoculación de plantas con extractos de planta infectada.....	54
3.2. PLÁSMIDOS Y CEPAS BACTERIANAS.....	54
3.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	56
3.4. TRANSFORMACIÓN DE <i>N. BENTHAMIANA</i> CON CONSTRUCCIONES DERIVADAS DEL GEN HC-PRO DE PPV.....	56
3.4.1 Clonaje del gen HC-Pro para transformación de plantas.....	56
3.4.2 Transformación de <i>N. benthamiana</i> .....	57
3.4.3 Análisis de la presencia del transgén.....	57
3.4.4 Germinación de semillas de plantas transgénicas.....	58
3.5. CLONAJE DEL GEN DE LA PROTEÍNA P29 DE CHV1.....	58
3.5.1 Clonaje de p29 para expresión transitoria en plantas.....	58
3.5.2 Clonaje de p29 para expresión a partir del vector PVX.....	58
3.6. EXPRESIÓN TRANSITORIA DE GENES EN PLANTAS MEDIANTE AGROINFILTRACIÓN.....	59
3.7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	59

3.7.1	Análisis de acumulación de PPV mediante ELISA .....	59
3.7.2	Análisis de la expresión de proteína GUS.....	59
3.7.3	Análisis de la expresión de proteína GFP .....	60
3.7.4	Análisis de acumulación de proteínas mediante Western blot.....	60
<b>3.8.</b>	<b>ANÁLISIS DE RNA.....</b>	<b>61</b>
3.8.1	Extracción de RNA .....	61
3.8.2	Análisis de RNA mediante Northern blot.....	62
3.8.2.1.	Análisis de RNA viral y mRNA .....	62
3.8.2.2.	Análisis de siRNA .....	62
3.8.2.3.	Sondas empleadas .....	63
3.8.3	Análisis de RNA mediante RT-PCR.....	64
<b>3.9.</b>	<b>ANÁLISIS DE DNA GENÓMICO.....</b>	<b>64</b>
3.9.1	Extracción de DNA .....	64
3.9.2	Digestión del DNA .....	64
3.9.3	Análisis del DNA mediante Southern blot .....	65
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>67</b>
<b>4.1.</b>	<b>TRANSFORMACIÓN DE <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i> CON CONSTRUCCIONES TRADUCIBLE (HCT) Y NO TRADUCIBLE (HCN) DEL GEN HC-PRO DE PPV 5.15.....</b>	<b>69</b>
<b>4.2.</b>	<b>DETECCIÓN DE PROTEÍNA HC-PRO EN LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS .....</b>	<b>71</b>
4.2.1	Detección de proteína HC-Pro mediante expresión transitoria.....	71
4.2.2	Detección de proteína HC-Pro en plantas transgénicas HCT.....	72
4.2.3	Detección de actividad de la proteína HC-Pro relacionada con supresión de PTGS.....	73
4.2.3.1.	Sinergismo en infecciones con PVX.....	73
4.2.3.2.	Supresión de protección antiviral .....	74
<b>4.3.</b>	<b>RESISTENCIA A PPV 5.15 EN PLANTAS TRANSGÉNICAS HCT Y HCN .....</b>	<b>75</b>
4.3.1	Preparación del inóculo de PPV 5.15.....	75
4.3.2	Identificación de líneas HCT y HCN con resistencia a PPV 5.15 .....	77
4.3.3	Análisis molecular de las plantas resistentes y susceptibles a PPV 5.15 .....	78
4.3.4	Especificidad de la resistencia.....	80
4.3.5	Caracterización de los niveles de mRNA del transgén HC-Pro en las líneas resistentes a PPV .....	82
4.3.6	Análisis de siRNA derivados del transgén HC-Pro en plantas resistentes a PPV .....	84
4.3.7	Silenciamiento de un gen GUS con homología de secuencia con el transgén HC-Pro .....	84
<b>4.4.</b>	<b>FACTORES DETERMINANTES DE LA RESISTENCIA A PPV EN LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS HC-PRO .....</b>	<b>86</b>
4.4.1	Resistencia a PPV en la progenie de plantas HCT2 resistentes o susceptibles a PPV .....	86
4.4.2	Análisis molecular del número de copias del transgén HC-Pro en la línea HCT2 .....	90
<b>4.5.</b>	<b>RESISTENCIA A PVX-HCT EN PLANTAS TRANSGÉNICAS HCT Y HCN.....</b>	<b>92</b>
4.5.1	Análisis de la resistencia a PVX-HCT .....	93
4.5.2	Análisis molecular de PVX-HCT .....	94
4.5.3	Factores determinantes de la resistencia a PVX-HCT .....	96
<b>4.6.</b>	<b>SUPRESIÓN DE PTGS Y RESISTENCIA A PPV MEDIANTE INFECCIÓN CON OTROS VIRUS .....</b>	<b>98</b>

---

4.6.1	Supresión de PTGS mediante infección con PVY.....	98
4.6.2	Supresión de PTGS mediante infección con CMV.....	99
4.7.	ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD SUPRESORA DE PTGS DE LA PROTEÍNA P29 DE CHV1 EN PLANTAS.....	103
4.7.1	Supresión del PTGS de la proteína GFP.....	103
4.7.2	Sinergismo en infección con PVX.....	105
5.	DISCUSIÓN.....	107
5.1.	ESTUDIO DE LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS HCT Y HCN.....	109
5.1.1	Resistencia a PPV mediada por PTGS.....	109
5.1.2	Bases moleculares de la resistencia a PPV.....	111
5.1.3	Papel de la proteína HC-Pro expresada por el transgén.....	113
5.1.4	Supresión de PTGS mediante infección con PVY o CMV.....	115
5.2.	LA PROTEÍNA P29 DE HIPOVIRUS COMO SUPRESOR DE PTGS.....	117
6.	CONCLUSIONES.....	119
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	123

## RESUMEN

La mayoría de virus son capaces de inducir en las plantas a las que infectan una respuesta de silenciamiento génico, que sirve en la planta huésped como mecanismo natural de defensa frente al virus. A la vez, muchos virus son capaces de contraatacar produciendo proteínas que interfieren con el mecanismo de silenciamiento génico. El balance entre la inducción de la defensa antiviral de la planta, basada en silenciamiento génico, y la supresión de esta defensa por parte de los virus, es probablemente uno de los factores que determinan el curso de una infección viral. En la presente tesis se han empleado plantas transgénicas que expresan secuencias correspondientes a la proteína supresora de silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) HC-Pro del virus de la sharka o *Plum pox virus* (PPV), con el fin de estudiar el proceso de silenciamiento génico inducido frente a este transgén y el posible efecto de la proteína HC-Pro, codificada por el propio transgén, sobre el silenciamiento génico y la resistencia a virus. Con nuestro sistema hemos pretendido aportar información sobre el posible balance existente entre la inducción y supresión de silenciamiento génico por parte de los virus.

Se transformaron plantas de *Nicotiana benthamiana* con construcciones derivadas del gen HC-Pro de PPV. Se empleó una versión traducible (HCt), diseñada para producir proteína HC-Pro, y otra versión no traducible (HCn). Se determinaron los niveles de expresión de proteína HC-Pro en varias de las líneas HCt obtenidas, así como la capacidad de la proteína HC-Pro expresada de suprimir silenciamiento génico. La proteína HC-Pro expresada en varias líneas HCt no manifestó capacidad para interferir con el silenciamiento génico ensayado en varios sistemas.

Se estudió la resistencia a PPV en las plantas transgénicas HC-Pro. Se identificaron dos líneas HCt y otras dos HCn con una alta proporción de plantas resistentes a PPV y a PVX-HCT, un virus quimérico derivado de PVX que porta el gen HC-Pro de PPV. La resistencia a PPV se correlaciona con bajos niveles de acumulación del mRNA del transgén, con la presencia de RNAs pequeños interferentes (siRNAs) específicos del transgén y con la capacidad del transgén de silenciar un gen *gusA*, que tiene homología con la porción 3' del transgén HC-Pro. Todo ello sugiere que la resistencia a PPV es consecuencia del silenciamiento génico postranscripcional inducido por el transgén HC-Pro en parte de las plantas transgénicas.

Se estudiaron los factores genéticos que determinan el silenciamiento génico del transgén HC-Pro en una proporción de las plantas de la línea HCt2 con resistencia a PPV. La resistencia es heredable y probablemente determinada por la presencia de un locus concreto del transgén HC-Pro entre los múltiples loci presentes en la línea HCt2, como sugiere la proporción de plantas resistentes a PPV próxima a 3/4 del total y la presencia de hasta dos loci del transgén en las plantas no resistentes a PPV.

Se estudió también la supresión del silenciamiento génico del transgén HC-Pro mediante infecciones con los virus PVY o CMV, y su efecto sobre la resistencia a PPV. Ambos virus fueron capaces de suprimir el silenciamiento génico del transgén

HC-Pro. Además, en el caso de infección con CMV, se pudo probar la supresión de la resistencia a PPV.

Los resultados obtenidos, se discuten desde el punto de vista del posible papel de la proteína HC-Pro sobre el silenciamiento génico sufrido por el propio transgén que la codifica.

Como parte adicional del trabajo, se probó la capacidad de supresión de silenciamiento génico, por parte de la proteína p29 del virus de hongos CHV1, en plantas. Esta proteína comparte algunas de las características típicas de los supresores de silenciamiento génico en plantas y animales. Mediante varias pruebas realizadas no se pudo demostrar actividad supresora de silenciamiento génico por parte de la proteína p29 en plantas, aunque este hecho no elimina la posibilidad de que p29 funcione como supresor de silenciamiento génico en hongos.

## ABREVIATURAS

AMV RT	Transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis de aves
BSA	Albúmina de suero bovino
CP	Proteína de la cápsida viral
CTAB	Bromuro de Cetiltrimetilamonio
DIECA	Dietilditiocarbamato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
DO	Densidad óptica
dpi	Días postinoculación
dsRNA	RNA de doble cadena
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
g	Gramo
GFP	Proteína fluorescente verde
GUS	$\beta$ -Glucuronidasa
HC-Pro	Factor de transmisión o componente auxiliar
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Litro
M	Molar
mA	Miliamperios
MES	Ácido morfolinoetanosulfónico
mg	Miligramo
$\mu$ g	Microgramo
min	Minuto
miRNA	Micro RNA
ml	Mililitro
$\mu$ l	Microlitro
mM	Milimolar
$\mu$ M	Micromolar
MOPS	Ácido morfolinopropansulfónico
mRNA	RNA mensajero
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
nt	Nucleótido
NTP	Ribonucleótido trifosfato
$^{\circ}$ C	Grados centígrados
ORF	Fase de lectura abierta
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pg	Picogramo
PTGS	Silenciamiento génico postranscripcional

PVP	Polivinil pirrolidona
RdRP	RNA polimerasa dependiente de RNA
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcripción inversa seguida de PCR
SDS	Dodecilsulfato sódico
seg	Segundo
siRNA	RNA pequeño interferente
TBE	Tampón Tris-borato-EDTA
TGB	Bloque de genes triple
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidad de actividad enzimática
VIGS	Silenciamiento génico inducido por virus

### **Acrónimos de Virus**

Nombre (*Nombre inglés*), *Género*

BWYV	Virus del amarilleo de la remolacha del oeste ( <i>Beet western yellows virus</i> ), <i>Luteovirus</i> .
CABMV	Virus del mosaico del chicharro transmitido por áfidos ( <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> ), <i>Potyvirus</i> .
CaMV	Virus del mosaico de la coliflor ( <i>Cauliflower mosaic virus</i> ), <i>Caulimovirus</i> .
CHV1	Virus del hongo del chancro del castaño ( <i>Cryphonectria hypovirus 1</i> ), <i>Hypovirus</i> .
CMV	Virus del mosaico del pepino ( <i>Cucumber mosaic virus</i> ), <i>Cucumovirus</i> .
FHV	Virus cabaña ( <i>Flock house virus</i> ), <i>Alphanodavirus</i> .
PMMoV	Virus del moteado suave del pimiento ( <i>Pepper mild mottle virus</i> ), <i>Tobamovirus</i> .
PPV	Virus de la sharka o Virus de la viruela del ciruelo ( <i>Plum pox virus</i> ), <i>Potyvirus</i> .
PVA	Virus A de la patata ( <i>Potato virus A</i> ), <i>Potyvirus</i> .
PVX	Virus X de la patata ( <i>Potato virus X</i> ), <i>Potexvirus</i> .
PVY	Virus Y de la patata ( <i>Potato virus Y</i> ), <i>Potyvirus</i> .
TEV	Virus del grabado del tabaco ( <i>Tobacco etch virus</i> ), <i>Potyvirus</i> .
TMV	Virus del mosaico del tabaco ( <i>Tobacco mosaic virus</i> ), <i>Tobamovirus</i> .
TRV	Virus del cascabeleo del tabaco ( <i>Tobacco rattle virus</i> ), <i>Tobravirus</i> .
TuMV	Virus del mosaico del nabo ( <i>Turnip mosaic virus</i> ), <i>Potyvirus</i> .
TVMV	Virus del moteado de las venas del tabaco ( <i>Tobacco vein mottling virus</i> ), <i>Potyvirus</i> .



## *Agradecimientos*

*La realización de una Tesis Doctoral requiere un gran esfuerzo personal. Hace falta paciencia y empeño para seguir adelante cuando parece que todo va mal. Todo ello no habría sido posible sin la gente que ha estado a mi lado durante este periodo de mi vida. A todos ellos quiero agradecer su ayuda científica y personal en la consecución de este trabajo.*

*En especial a mis directores de Tesis: José Ramón Díaz-Ruíz, que me ha guiado y motivado durante todo el tiempo que he estado en el laboratorio y me ha estimulado a ahondar en las implicaciones del trabajo realizado, y Francisco Tenllado, que ha sido mi ayuda más próxima en el día a día.*

*También a mis compañeros Belén, Cesar y Felix que me enseñaron a echar a andar en el laboratorio ya durante mis primeras prácticas de fin de carrera.*

*A Dionisio López Abella, Maite Serra e Isabel García-Luque y a los compañeros de sus laboratorios que me han ayudado y aconsejado en multitud de ocasiones.*

*A mis compañeros más próximos, Virginia, Pablo, Lourdes, Marisol, Elisa, Dora, Juanjo, Loic, Justo, Lucía, Livia y Claudia con los que he compartido muchos momentos y que me han ayudado en el terreno científico y personal.*

*A mis colegas Emilio y Miguel que me han ayudado a olvidarme de vez en cuando, haciendo el loco con la bicicleta de montaña.*

*A mi Tutora de Tesis Ana Margarita Figueiras, que me ha ayudado un montón durante los trámites de presentación de la Tesis.*

*A toda mi familia, que me han mostrado todo su entusiasmo e interés en lo que yo hacía.*

*Todos me habéis ayudado a mejorar.*

*Gracias*



## ***1. INTRODUCCIÓN***



## 1.1. SILENCIAMIENTO GÉNICO POSTRANSCRIPCIONAL, DEFENSA ANTIVIRAL EN PLANTAS Y CONTRAATAQUE DE LOS VIRUS

El silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) en plantas es una de las manifestaciones del 'silenciamiento por RNA', un mecanismo de degradación de RNA específico de secuencia, que está presente en una gran variedad de organismos eucariotas (Susi *et al.*, 2004). Se han identificado procesos relacionados con silenciamiento por RNA en plantas (Napoli *et al.*, 1990), en hongos donde recibe el nombre de 'quelling' (Romano y Macino, 1992), en protozoos (Ngo *et al.*, 1998; Ruiz *et al.*, 1998a) y en varios sistemas animales tanto vertebrados (Bahramian y Zarbl, 1999; Elbashir *et al.*, 2001b) como invertebrados (Fire *et al.*, 1998; Kennerdell y Carthew, 1998), donde se denomina 'RNA de interferencia' (RNAi). El mecanismo de silenciamiento por RNA es activado por RNA de doble cadena (dsRNA), el cual es procesado específicamente por una enzima de tipo RNasa III que produce fragmentos de RNA de 21-25 nt conocidos como RNAs pequeños interferentes (siRNAs). Estos siRNAs dirigen la degradación específica de RNAs con los que tienen complementariedad de secuencia (Hammond *et al.*, 2000; Zamore *et al.*, 2000). La presencia de este mecanismo en organismos tan dispares sugiere un origen evolutivo remoto y su alta conservación sugiere que puede estar involucrado en diversas funciones de gran importancia para la célula.

En plantas, una de las funciones del PTGS es la defensa frente a virus. Su principal ventaja es su adaptabilidad, ya que multitud de virus son capaces de inducir este mecanismo, y una vez inducido es la secuencia nucleotídica del virus la que determina la especificidad del mecanismo de defensa. Por esta razón se ha llegado a considerar este tipo de defensa antiviral en plantas como análoga a la respuesta inmune en animales (Voinnet, 2001; Plasterk, 2002; Lecellier y Voinnet, 2004). Además de jugar un papel como defensa natural frente a virus, el PTGS puede usarse artificialmente como herramienta biotecnológica para generar resistencia a virus en plantas, mediante la introducción de transgenes u otras moléculas inductoras de PTGS frente al virus (Llave *et al.*, 2004; Tenllado *et al.*, 2004).

Como contrapartida a la defensa antiviral mediada por PTGS, numerosos virus producen proteínas capaces de interferir con el mecanismo de PTGS (Moissiard y Voinnet, 2004; Roth *et al.*, 2004), lo que corrobora el papel del PTGS como mecanismo de defensa antiviral, ya que los virus necesitan interferir con este proceso para ser capaces de establecer la infección viral.

El silenciamiento por RNA juega un papel importante no solo en la defensa frente a virus, sino también en el control de otros elementos de DNA y RNA potencialmente dañinos para la estabilidad del genoma, como son los transposones y retrotransposones (Sijen y Plasterk, 2003; Vastenhouw y Plasterk, 2004). También parece estar implicado en otros procesos celulares no relacionados con la defensa, como la organización de la cromatina (Volpe *et al.*, 2002; Verdel *et al.*, 2004) y el reordenamiento del DNA en algunos protozoos (Taverna *et al.*, 2002; Mochizuki y Gorovsky, 2004). En relación con estas funciones, el silenciamiento por RNA es capaz de dirigir en el núcleo la metilación de secuencias de DNA homólogas al RNA diana del silenciamiento (Jones *et al.*, 2001; Matzke *et al.*, 2004).

El silenciamiento por RNA también parece jugar un papel importante en la regulación de la expresión de genes endógenos, mediada por micro RNAs (miRNAs) y otros pequeños RNAs (Llave *et al.*, 2002b; Bartel y Bartel, 2003). La regulación de la expresión génica mediada por miRNAs guarda una gran relación con otros procesos de silenciamiento por RNA. Las moléculas efectoras, los miRNAs, son similares en estructura y función a los siRNAs, pero a diferencia de estos son codificados por genes endógenos que producen transcritos con estructuras secundarias características (Llave *et al.*, 2002b). Estos RNA precursores son procesados por una serie de enzimas de tipo Rnasa III para formar miRNAs (revisado en Bartel, 2004), de manera similar al procesamiento de dsRNAs para formar siRNAs. Su modo de acción también es muy similar, ya que los miRNAs pueden dirigir la degradación de mRNAs con los que tienen una alta complementariedad de secuencia (Llave *et al.*, 2002a), o bien bloquear la traducción de mRNAs con los que tienen complementariedad de secuencia parcial (Bartel, 2004). Además, gran parte de los complejos enzimáticos que intervienen en el silenciamiento por RNA podrían también estar implicados en la regulación génica por miRNAs (Hutvagner y Zamore, 2002).

Algunas de las proteínas virales supresoras de PTGS, son también capaces de interferir con la función de los miRNAs (Chapman *et al.*, 2004), lo que sugiere que parte de las alteraciones producidas en plantas durante una infección viral podrían ser consecuencia de la alteración de genes regulados por miRNAs.

### **1.1.1 Resistencia derivada del patógeno y silenciamiento génico**

El concepto de resistencia derivada del patógeno, acuñado por Sanford y Johnston (1985), planteó por primera vez la posibilidad de que se pudiera obtener resistencia frente a organismos patógenos, mediante la expresión en el organismo huésped de genes o porciones del genoma procedentes del patógeno. Esta estrategia se ha utilizado ampliamente para la obtención de resistencia frente a virus de plantas, donde es una alternativa de gran importancia debido a la escasez tanto de productos fitosanitarios adecuados como de genes de resistencia naturales frente a gran número de enfermedades virales.

En algunos casos, es la proteína de origen viral expresada en plantas la que provoca la resistencia al virus. La sobreexpresión de la proteína, su presencia en un momento inadecuado del ciclo viral o la expresión de formas alteradas pueden ser algunas de las causas implicadas en la consecución de la resistencia a virus. (revisado en Baulcombe, 1996 y Beachy, 1997).

Una de las proteínas virales más utilizadas para la obtención de resistencia derivada del patógeno es la proteína de la cápsida (CP) de diversos virus. En el caso de plantas transgénicas que expresan la CP de TMV (Powell-Abel *et al.*, 1986), se observó correlación entre la mayor acumulación de proteína CP y una mayor resistencia (Powell *et al.*, 1990), además las plantas resultaban más resistentes a la inoculación con viriones de TMV que con RNA viral, por lo que se postuló que el mecanismo de resistencia podría ser mediado por una inhibición de la desencapsidación del virión a su entrada en la célula (Register III y Beachy, 1988; Bendahmane *et al.*, 1997), debido a la presencia de altas concentraciones de proteína CP transgénica. En otros casos de resistencia mediada por proteína CP de TMV o de otros virus, la causa de resistencia podría ser además la interferencia con otros estadios del ciclo viral como la replicación (Taschner *et al.*, 1994), la traducción

o el movimiento a larga distancia (Wisniewski *et al.*, 1990). En otros casos, en los que se emplean formas alteradas de proteínas de movimiento (MP), se postula que la resistencia puede ser debida a la interacción de la proteína mutada con los plasmodesmos, lo que podría causar una interferencia con el movimiento célula a célula del virus (Lapidot *et al.*, 1993). Este tipo de resistencia resulta eficaz frente a una gran variedad de virus (Cooper *et al.*, 1995), probablemente debido a que muchos virus interactúan de un modo similar con los plasmodesmos durante su movimiento.

En otros ejemplos de resistencia derivada del patógeno, la resistencia no puede ser atribuida a la expresión de proteína, por lo que la causa debe ser el propio transgén o el RNA que expresa. En los casos en los que se emplean transgenes que codifican RNAs defectivos interferentes o RNAs satélites, una de las causas posibles es la competencia entre el transcrito del transgén y el RNA viral, por los factores necesarios para la replicación o el movimiento del virus (Gerlach *et al.*, 1987; Kollar *et al.*, 1993). En otros casos, la causa de la resistencia implica fenómenos de silenciamiento génico postranscripcional (PTGS).

Los primeros indicios de que el silenciamiento génico podría estar implicado en algunos fenómenos de resistencia derivada del patógeno, surgieron al observar resistencia a virus mediada por transgenes virales que no codifican proteínas (Lindbo y Dougherty, 1992b; Tenllado *et al.*, 1996), además de la falta de correlación entre la acumulación del transcrito del transgén y el grado de resistencia en algunos casos (Lawson *et al.*, 1990). Más tarde se observó en plantas con altos niveles de resistencia a TEV, correlación entre la resistencia al virus y el silenciamiento postranscripcional del transgén viral (Lindbo *et al.*, 1993).

La confirmación de que el silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) podría ser la causa de resistencia a virus en estos casos, llegó con la demostración de que un mismo transgén viral que provocaba resistencia a virus era capaz de silenciar a otro transgén homólogo (Mueller *et al.*, 1995). Tras esta observación se acuñó el término 'resistencia dependiente de homología'. Este hecho implicaba que el PTGS era capaz de dirigir la degradación de RNA viral o de mRNA siempre que hubiera suficiente homología de secuencia con el transgén silenciado. La resistencia a virus podía producirse incluso con transgenes no virales, con tal de que hubiese homología entre el transgén silenciado y el virus. En plantas que contenían un transgén GUS silenciado postranscripcionalmente se producía resistencia a un virus PVX portador del gen GUS (English *et al.*, 1996). La resistencia a virus mediada por PTGS presenta una alta especificidad, ya que habitualmente es necesaria una homología de secuencia entre el virus y el transgén superior al 85% (Tenllado *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 1998), suele ser altamente eficaz incluso frente a inoculaciones con gran cantidad de virus, y suele provocar una ausencia total de síntomas y de acumulación viral (Marathe *et al.*, 2000), en contraste con otros mecanismos, como la resistencia mediada por proteína CP, que no son tan eficientes frente a altas dosis de inóculo y en ocasiones solo causan retraso en la aparición de los síntomas (Beachy, 1999).

### **1.1.2 Inducción de silenciamiento génico por transgenes**

Los fenómenos de silenciamiento génico, se observaron por primera vez en plantas transgénicas en las que se trataba de sobreexpresar ciertos caracteres de la planta mediante la introducción de copias extra de un gen (Napoli *et al.*, 1990). En

algunos casos, este hecho no solo no conducía a la sobreexpresión del producto génico, sino que incluso provocaba niveles de expresión por debajo de los observados en plantas no transgénicas. La inactivación de la expresión génica no solo afectaba al transgén introducido sino también a los genes endógenos con homología a este, a lo que se denominó cosupresión (Napoli *et al.*, 1990). El silenciamiento génico podía darse a dos niveles: 'silenciamiento génico transcripcional' (TGS), en el que se produce una reducción de la transcripción del transgén en el núcleo, asociada a la metilación de la región promotora del transgén (Vaucheret *et al.*, 1998); y 'silenciamiento génico postranscripcional' (PTGS), en el que la transcripción del transgén en el núcleo no se ve afectada, pero la acumulación de transcritos en el citoplasma se ve notablemente reducida debido a su degradación específica (Sijen y Kooter, 2000; Vaucheret *et al.*, 2001). La degradación afecta a todos los RNA del citoplasma con homología de secuencia con el transgén silenciado, y suele ir acompañada de metilación en la región codificadora del transgén.

En principio, la inducción de silenciamiento por un transgén parece ser independiente de su secuencia, aunque es posible que algunos motivos o estructuras en el RNA pudieran favorecer su inducción (Maiti *et al.*, 1993; Prins *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2004). Otros factores como la traducibilidad del RNA (Cassidy y Nelson, 1995; Que *et al.*, 1997), también podrían influir sobre la capacidad del transgén de inducir PTGS. Como característica más relevante del silenciamiento génico de un transgén, este suele producirse solo en algunas de las líneas transformadas. Se ha observado que el silenciamiento se produce con mayor frecuencia en líneas transgénicas con un alto número de copias del transgén (Smith *et al.*, 1994; Goodwin *et al.*, 1996).

Desde su descubrimiento, se han propuesto varios modelos que tratan de explicar como se induce el silenciamiento génico y porqué solo se produce en algunas de las líneas transformadas (revisado en Waterhouse *et al.*, 1999). Se propuso que el PTGS se podría inducir como consecuencia de los altos niveles de transcripción del transgén en algunas líneas, por encima de cierto umbral (Lindbo *et al.*, 1993), motivados por la presencia de un alto número de copias del transgén (Goodwin *et al.*, 1996) o por la utilización de promotores fuertes (Elmayan y Vaucheret, 1996; Que *et al.*, 1997). Se propuso que la acumulación del RNA por encima de este umbral podría ser reconocida por una enzima RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP) capaz de sintetizar RNAs complementarios, que promoverían la degradación específica del RNA (Lindbo *et al.*, 1993). Sin embargo, otros datos contradicen este modelo al encontrarse líneas silenciadas y no silenciadas transformadas con la misma construcción y con niveles similares de transcripción (English *et al.*, 1996), por lo que se propuso un modelo alternativo en el que el PTGS se induciría por la producción de RNAs 'aberrantes' (abRNA) a partir del transgén, con alguna particularidad que lo hiciese reconocible por una enzima RdRP. La producción de este abRNA podría verse estimulada por la metilación de la secuencia codificante del transgén, que se observa con frecuencia en transgenes silenciados, y la presencia de varias copias del transgén podría favorecer la existencia de interacciones ectópicas entre el DNA homólogo que favoreciese la metilación (Baulcombe y English, 1996). Ambos modelos basados en el umbral de RNA o en la producción de abRNA no son excluyentes y podrían darse en combinación, de manera que los altos niveles de transcripción favoreciesen la inducción de PTGS al promover mayores cantidades de abRNA.

El análisis más detallado de la inserción de las copias de un transgén en plantas transgénicas, reveló que el silenciamiento se asocia frecuentemente con la inserción de varias copias del transgén contiguas en un solo locus, bien dispuestas una seguida de la otra como repeticiones directas o una contra la otra como repeticiones invertidas (IR) (Sijen *et al.*, 1996; Stam *et al.*, 1997; Muskens *et al.*, 2000). Se planteó que tal disposición podría favorecer la síntesis de abRNA (Sijen *et al.*, 1996).

Tras el descubrimiento de que el RNA de doble cadena (dsRNA) es capaz de inducir PTGS con alta eficiencia en nemátodos (Fire *et al.*, 1998), *Drosophila* (Kennerdell y Carthew, 1998) y también en plantas (Waterhouse *et al.*, 1998; Tenllado y Díaz-Ruíz, 2001), se propuso que el silenciamiento se producía en aquellas plantas transgénicas en las que la disposición de las copias del transgén favoreciese la producción de dsRNA. La producción de dsRNA podría darse en el caso de que un transgén se insertase frente a un promotor de la planta, de manera que se produjesen transcritos sentido y antisentido. También podría producirse en el caso de que dos copias del transgén se insertasen en disposición IR. En esta situación, se produciría dsRNA en el caso de fallar con cierta frecuencia la terminación de la transcripción en alguna de las copias del transgén (Sijen y Kooter, 2000) (Figura 1.1). De hecho, en el caso de transgenes diseñados expresamente con secuencias en disposición IR, la frecuencia en la obtención de líneas silenciadas es mucho mayor que en el caso de transgenes con disposición sencilla (Waterhouse *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2000; Wang y Waterhouse, 2000).

### **1.1.3 Inducción de silenciamiento génico por virus y recuperación**

En gran parte de los casos descritos de resistencia a virus mediada por PTGS, es el transgén el que induce el silenciamiento, mientras que el virus actúa únicamente como diana. Sin embargo, la mayoría de virus también son capaces de inducir PTGS, presumiblemente debido a la producción de intermediarios de 'doble cadena' de RNA durante la replicación viral (revisado en Marathe *et al.*, 2000). Como consecuencia, el propio RNA viral y cualquier RNA presente en el citoplasma con homología al virus, son diana del PTGS. Este fenómeno se conoce como 'silenciamiento inducido por virus' (VIGS). El VIGS puede afectar tanto a transgenes con secuencias virales como a transgenes no virales, siempre que el virus porte secuencias homólogas al transgén. En este sentido, la infección de plantas portadoras de un transgén GFP con un virus recombinante PVX portando la secuencia GFP, es capaz de silenciar al transgén (Ruiz *et al.*, 1998b). También se puede inducir VIGS frente a genes endógenos de la planta, siempre y cuando el virus porte secuencias homólogas a tal gen (Brigneti *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004b).

En algunos casos en plantas transgénicas, el PTGS inducido por el virus es capaz de reducir notablemente la acumulación del propio virus, fenómeno que se conoce como 'recuperación' (Lindbo *et al.*, 1993; Tenllado *et al.*, 1995). En tales casos, se observa que las plantas son inicialmente susceptibles al virus, pero tras varias semanas los síntomas y la acumulación del virus decaen como consecuencia del PTGS. Tras la recuperación, el transgén homólogo queda silenciado y las plantas son resistentes a reinoculaciones con el virus (Guo y García, 1997; Guo *et al.*, 1999). Se cree que la recuperación sucede porque el PTGS inducido por el virus, es de alguna manera potenciado por el transgén homólogo, probablemente porque este es capaz de amplificar el silenciamiento inducido por el virus, sirviendo de molde a enzimas RdRP (Vaistij *et al.*, 2002). En el caso de VIGS frente a genes endógenos,

no se produce recuperación (Ruiz *et al.*, 1998b; Jones *et al.*, 1999), lo que probablemente tiene relación con que estos genes no actúan como molde para la amplificación del silenciamiento (Vaistij *et al.*, 2002; Himber *et al.*, 2003).

Algunos virus son capaces de inducir el fenotipo de recuperación incluso en ausencia de un transgén homólogo (Covey *et al.*, 1997; Ratcliff *et al.*, 1997). En tales casos el virus es el inductor y la única diana del PTGS. Las plantas recuperadas son resistentes a la reinoculación con virus que portan secuencias homólogas al virus inductor de PTGS. La infección de plantas con el virus TRV portando el gen GFP resultó en inducción de PTGS y recuperación de las plantas. Las plantas recuperadas fueron resistentes a la reinoculación con el virus PVX portando el gen GFP, pero no al virus PVX portando el gen GUS (Ratcliff *et al.*, 1999). La existencia en algunos casos de recuperación en ausencia de transgenes homólogos, apoya que el PTGS funciona como un mecanismo de defensa natural frente a virus.

#### **1.1.4 Mecanismo del silenciamiento génico postranscripcional (PTGS)**

Los primeros trabajos sobre silenciamiento realizados en plantas transgénicas (Wassenegger y Pelissier, 1998), hongos (Cogoni *et al.*, 1994) y nemátodos (Fire *et al.*, 1998), aportaron conocimientos sobre las características del silenciamiento por RNA fundamentalmente a nivel fisiológico. Sin embargo, los conocimientos a nivel molecular del mecanismo de silenciamiento por RNA provienen mayoritariamente de estudios bioquímicos realizados en extractos celulares de *Drosophila* (Tuschl *et al.*, 1999) y en células humanas (Elbashir *et al.*, 2001b), así como de estudios genéticos con mutantes de diversos organismos defectivos en silenciamiento (revisado en Tijsterman *et al.*, 2002 y Denli y Hannon, 2003). La mayoría genes y demás factores implicados en silenciamiento por RNA tienen homólogos en múltiples organismos, lo que permite afirmar que el esquema básico del mecanismo de silenciamiento por RNA está bastante conservado. Sin embargo, algunos aspectos del mecanismo y del papel que juega podrían diferir de unos organismos a otros (Cerutti, 2003; Susi *et al.*, 2004).

Uno de los aspectos centrales del silenciamiento por RNA es el reconocimiento y procesamiento de dsRNA por parte de una enzima de tipo RNasa III, o ribonucleasa específica de dsRNA, denominada Dicer (Bernstein *et al.*, 2001; Carmell y Hannon, 2004). La enzima Dicer corta el dsRNA en fragmentos de 21-25 nucleótidos, denominados RNAs pequeños interferentes o siRNAs, con extremos 5'-fosfato y dos nucleótidos protuberantes en los extremos 3'-hidroxilo. Estos siRNAs son transferidos a otro complejo enzimático, denominado 'complejo de silenciamiento inducido por RNA' (RISC) (Hammond *et al.*, 2000), donde se cree que las dos hebras del siRNA se separan y sirven como guía para identificar RNAs complementarios. Estos RNAs diana son entonces cortados por RISC en el centro de la zona complementaria con el siRNA (Elbashir *et al.*, 2001a) y a continuación, probablemente, son degradados por exonucleasas (Figura 1.1).

Se han identificado homólogos de Dicer en varios organismos. En plantas y en *Drosophila* existen varios genes homólogos a Dicer, que aparentemente participan en distintas vías de silenciamiento y de regulación por miRNAs (Lee *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2004). Así pues, en la planta *Arabidopsis thaliana* el homólogo de Dicer DCL1 parece estar implicado en la biogénesis de miRNAs (Reinhart *et al.*, 2002). DCL2

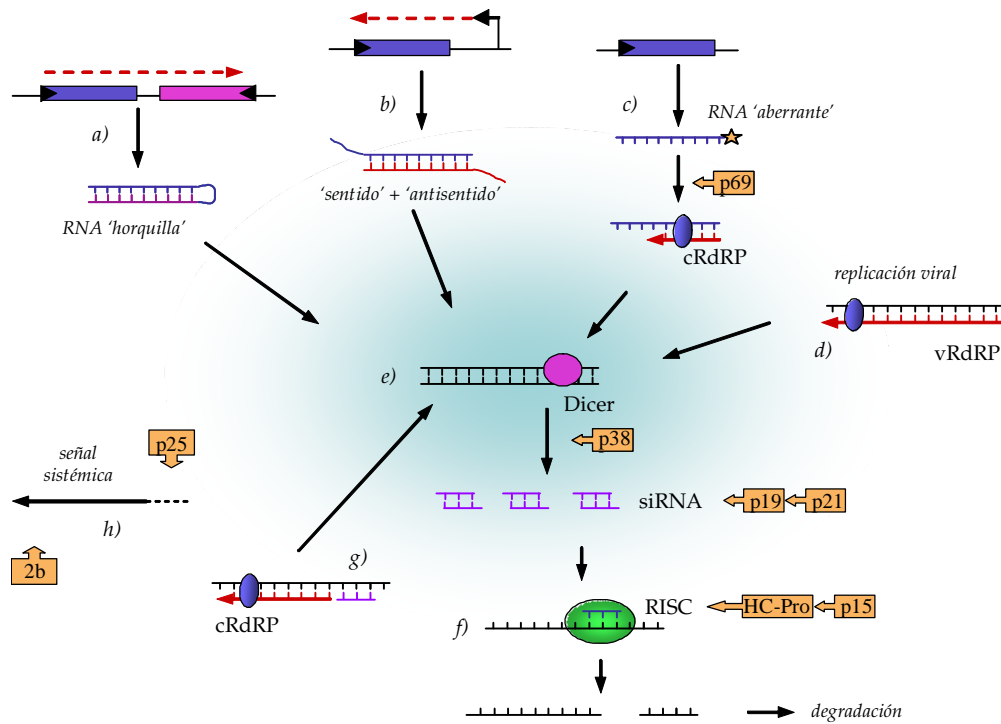
parece participar en la defensa antiviral al ser necesario para la producción de siRNAs a partir de RNA viral y DCL3 es necesario en la producción de siRNAs endógenos implicados en la organización de la cromatina y control de elementos transponibles (Xie *et al.*, 2004). En la formación del complejo RISC participan varias proteínas, entre las que se encuentran proteínas de la familia Argonauta (AGO)(Hammond *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004a) y otras parcialmente caracterizadas (Caudy y Hannon, 2004). También es posible la existencia de varios complejos RISC especializados en distintas vías de silenciamiento o de regulación por miRNAs, ya que en *Drosophila* la proteína AGO2 es fundamental en la degradación de RNA mediada por siRNAs, mientras que AGO1 lo es en la formación y función de miRNAs (Okamura *et al.*, 2004). Las proteínas Dicer además de su función en el procesamiento de dsRNA, podrían participar también en la formación del complejo RISC e incluso formar parte de él (Doi *et al.*, 2003; Pham *et al.*, 2004).

Sobre este esquema básico general se añaden características adicionales que aparentemente no se dan en todos los organismos, como la amplificación del PTGS, la transitividad y el silenciamiento sistémico observados en plantas, hongos y nemátodos. En estos organismos, además del procesamiento de dsRNA y corte de RNAs diana, existe una vía de amplificación que permite generar nuevos siRNAs a partir de los RNA diana (Sijen *et al.*, 2001; Vaistij *et al.*, 2002). En esta función juegan un papel fundamental enzimas 'RNA polimerasas dependientes de RNA' (RdRP) (Ahlquist, 2002). En varios organismos se han identificado mutantes que afectan a enzimas RdRP y que son defectivos en algunas formas de silenciamiento (Cogoni y Macino, 1999; Mourrain *et al.*, 2000; Smardon *et al.*, 2000). Se cree que la amplificación se puede producir al generar nuevo dsRNA a partir del RNA diana, utilizando enzimas RdRP y posiblemente siRNAs como cebadores. Este nuevo dsRNA sería procesado por Dicer produciendo siRNAs y complejos RISC efectores adicionales.

Este modelo de amplificación del PTGS sirve también para explicar el fenómeno de transitividad, que consiste en la aparición de siRNAs que no corresponden en secuencia al dsRNA original, sino que derivan del RNA diana. Esto se puede observar cuando el dsRNA tiene homología solo con una porción del RNA diana, de manera que si aparecen siRNAs correspondientes a la secuencia exclusiva del RNA diana implica que se ha formado dsRNA a partir de este RNA diana. En nemátodos solo se ha observado transitividad en dirección 3'-5' del RNA diana, lo que se explicaría bien con el modelo en el que el siRNA actúa como cebador de la RdRP (Sijen *et al.*, 2001). Sin embargo, en plantas se ha observado transitividad en dirección 3'-5' y además en 5'-3', lo que no se explica con el modelo de siRNAs como cebadores. Se propone que en tales casos la actividad RdRP puede ser no dependiente de cebador, reconociendo el RNA diana por mediación de los siRNAs o a través de alguna otra característica peculiar del RNA diana, como falta de cola poli-A u otro tipo de modificación (Vaistij *et al.*, 2002). Los fenómenos de amplificación y transitividad se observan con frecuencia cuando el silenciamiento es dirigido frente a transgenes, aunque no se observan cuando el silenciamiento es inducido frente a genes endógenos, lo que sugiere que alguna característica hace a los mRNAs endógenos sustratos poco eficientes para la actividad RdRP (Vaistij *et al.*, 2002).

La amplificación del PTGS mediada por enzimas RdRP podría contribuir a potenciar o incluso iniciar el silenciamiento en los casos en los que la cantidad de

dsRNA inductor es minoritaria. De hecho, mutantes de *A. thaliana* en un gen de RdRP, son defectivos en PTGS inducido por un transgén no diseñado expresamente para la producción de dsRNA, pero no en PTGS inducido por un virus, que presumiblemente produce altas cantidades de dsRNA (Dalmay *et al.*, 2000).



**Figura 1.1.** Representación del mecanismo de silenciamiento por RNA y de los posibles puntos de acción de proteínas virales supresoras de silenciamiento. Algunos de los mecanismos postulados para la inducción de PTGS por parte de transgenes son: a) la disposición en repetición invertida (IR) de dos copias de un transgén, que permitiría la transcripción de un RNA capaz de formar una estructura de 'horquilla' de dsRNA. b) La inserción de un transgén frente a un promotor interno, que podría provocar la transcripción de RNAs 'sentido' y 'antisentido' capaces de formar un dsRNA. c) Alguna característica del transgén que promoviese la formación de RNA 'aberrante', capaz de inducir silenciamiento probablemente a través de la formación de dsRNA por una enzima RdRP de la célula (cRdRP). Numerosos virus son capaces de inducir silenciamiento durante la infección viral. d) Se cree que la formación de dsRNA durante la replicación mediada por la RdRP del virus (vRdRP) podría ser causante de la inducción de silenciamiento. e) Las distintas vías de inducción de PTGS confluirían en la formación de dsRNA. Éste es procesado por 'Dicer', que produce siRNA. f) Los siRNAs se incorporan al complejo efector RISC que media la degradación de RNAs complementarios al siRNA. g) La amplificación del silenciamiento podría producirse por la formación de nuevo dsRNA a partir del RNA diana, por mediación de una RdRP celular (cRdRP) y posiblemente usando siRNAs como cebadores. h) En algún punto de esta ruta se produce una señal de silenciamiento sistémico, capaz de moverse de célula a célula y a larga distancia y de iniciar el silenciamiento en puntos distantes del organismo.

Otra característica aparentemente exclusiva de nemátodos y plantas es el silenciamiento sistémico. En algunos casos, la introducción de un inductor de PTGS en una porción de tejido o en un grupo de células, es capaz de generar una señal de silenciamiento que silencia genes o transgenes, homólogos al inductor, en el resto del organismo (Voinnet y Baulcombe, 1997; Fire *et al.*, 1998; Palauqui y Balzergue, 1999; Klahre *et al.*, 2002). En plantas, esta señal puede moverse desde un pie de

planta que contiene un transgén silenciado, hasta un injerto que contiene un transgén homólogo no silenciado, e inducir su silenciamiento (Palauqui *et al.*, 1997). El patrón de movimiento sistémico de la señal de silenciamiento, a través del floema, es similar en varios aspectos al movimiento sistémico de virus (Voinnet *et al.*, 1998; Ueki y Citovsky, 2001), y parece seguir la ruta de fotoasimilados hacia las partes en crecimiento de la planta.

Se cree que la señal de silenciamiento tendría que ser un ácido nucleico, debido a su especificidad, y más probablemente RNA derivado de alguna etapa del silenciamiento a nivel local. En este sentido, existen en plantas dos tipos de siRNAs que difieren en tamaño (Hamilton *et al.*, 2002), unos de 21-22 nucleótidos y otros de 24-25 nucleótidos, y que probablemente son producidos por distintas enzimas Dicer (Tang *et al.*, 2003). La presencia de siRNAs de 21-22 nt parece ser suficiente para producir degradación de RNAs homólogos, mientras que la presencia de siRNAs de 24-25 nt parece necesaria para la consecución de silenciamiento sistémico y la metilación en el núcleo de DNA homólogo (Hamilton *et al.*, 2002).

Un estudio más reciente separa en dos fases el movimiento de la señal de silenciamiento: movimiento célula a célula a través de plasmodesmos y movimiento a larga distancia a través del floema (Himber *et al.*, 2003). A partir de células en las que se ha inducido PTGS, este se puede extender a células circundantes hasta una distancia de 10-15 células, para lo cual es suficiente con la presencia de siRNAs de 21-22 nt. Si en las células receptoras existe RNA con homología al inductor de silenciamiento y este es competente para la amplificación, como suele suceder con transgenes, se puede producir amplificación dependiente de RdRP, que produzca nuevos siRNAs capaces de translocarse a las células circundantes. Para este movimiento célula a célula del silenciamiento no es necesaria la presencia de siRNAs de 24-25 nt, por lo que su papel podría estar limitado al movimiento a larga distancia del silenciamiento a través del floema. Recientemente se ha demostrado la presencia en el floema de plantas de RNAs de tamaños entre 20 y 25 nt, que corresponden a siRNAs y miRNAs (Yoo *et al.*, 2004). Estos RNAs son además capaces de moverse a través del floema, translocándose desde un pie de planta donde son producidos hasta un injerto donde no se producen, lo cual sugiere que podrían funcionar como señal sistémica de silenciamiento. Además, se ha identificado una proteína en el floema de estas plantas denominada PSRP1 con capacidad de unir RNA preferentemente de cadena sencilla y de tamaño próximo a 25 nt. Esta proteína es capaz de facilitar específicamente el tráfico de pequeños RNAs a través de los plasmodesmos, por lo que podría estar implicada en el movimiento de la señal de silenciamiento (Yoo *et al.*, 2004).

### **1.1.5 Supresión de PTGS en plantas por proteínas virales**

Uno de los hechos que más ha reforzado la teoría de que el PTGS o silenciamiento por RNA sirve en la naturaleza como mecanismo de defensa antiviral, es el descubrimiento de actividades supresoras de PTGS en múltiples virus de plantas y algunos virus animales. Gran parte de los genes virales implicados en supresión de PTGS, habían sido identificados previamente como factores de patogenicidad necesarios para una correcta acumulación y expansión del virus en la planta (Voinnet *et al.*, 1999). Esto sugiere que la supresión de silenciamiento es un paso fundamental para la consecución de la infección viral por parte de la mayoría de virus.

Los primeros indicios que condujeron a pensar que los virus podrían producir proteínas supresoras de silenciamiento, provienen de trabajos en sinergismo viral. El sinergismo es la exacerbación de síntomas en infecciones simultáneas con dos virus (González-Jara *et al.*, 2004; Hull, 2002). Existen múltiples ejemplos de sinergismo, muchos de ellos producidos por un potyvirus y otro virus no relacionado, como por ejemplo PVX. Más tarde se demostró que la expresión transgénica de la proteína HC-Pro de potyvirus es suficiente para producir sinergismo, aumentando la sintomatología y acumulación de diversos virus no relacionados entre sí (Pruss *et al.*, 1997), lo que indujo a pensar que la proteína HC-Pro podría estar inhibiendo un mecanismo de defensa de la planta que afectase de manera generalizada a múltiples virus. Tras ello, se demostró que tal mecanismo de defensa inhibido por HC-Pro era el silenciamiento génico postranscripcional. Se demostró que la proteína HC-Pro era capaz de suprimir el silenciamiento inducido por transgenes y por virus (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Brigneti *et al.*, 1998; Kasschau y Carrington, 1998) y podía revertir el PTGS ya establecido (Llave *et al.*, 2000). Aunque no hay certeza plena de que el sinergismo sea consecuencia directa de la supresión de PTGS, parece bastante probable que así sea, ya que ambas actividades se localizan en el dominio central de la proteína HC-Pro (Shi *et al.*, 1997; Anandalakshmi *et al.*, 1998; González-Jara *et al.*, 2005), y otros supresores de silenciamiento de diversos virus no relacionados entre sí también son capaces de causar sinergismo (Brigneti *et al.*, 1998; Voinnet *et al.*, 1999; Pfeffer *et al.*, 2002; Delgado *et al.*, 2004).

Tras el descubrimiento de la actividad supresora de PTGS de HC-Pro se identificaron muchas otras proteínas virales con capacidad supresora (revisado en Moissiard y Voinnet, 2004 y Roth *et al.*, 2004), incluso algunas de virus animales (Li *et al.*, 2002; Delgado *et al.*, 2004). Todas estas proteínas difieren en su estructura, localización celular, origen filogenético e incluso en la forma de interferir con el mecanismo de PTGS (Figura 1.1), conformando posiblemente un caso de convergencia evolutiva, lo que confirma la necesidad generalizada de los virus de interferir con el PTGS para producir la infección viral. Algunas de estas proteínas son capaces de interferir con el silenciamiento en la propia célula en la que se expresan, mientras otras interfieren con la formación o el movimiento de la señal sistémica de silenciamiento. Algunas de ellas además pueden interferir con la función de los miRNAs, que están implicados en la regulación de la expresión de múltiples genes (Kasschau *et al.*, 2003). Se cree que la interferencia con la función de miRNAs puede ser la causa de los defectos en desarrollo y diferenciación observados en plantas transgénicas que expresan algunos supresores de silenciamiento (Chapman *et al.*, 2004; Dunoyer *et al.*, 2004). Estos defectos son muy similares a los producidos por mutaciones en la enzima Dicer que regula la formación de miRNAs en *A. thaliana* (dcl-1/CAF) (Reinhart *et al.*, 2002). Esto sugiere que al menos parte de los síntomas causados por infecciones virales pueden ser debidos a interferencia de los supresores de PTGS con el metabolismo de miRNAs (Kasschau *et al.*, 2003).

#### 1.1.5.1. Supresión de PTGS por la proteína HC-Pro de potyvirus

El descubrimiento de la actividad supresora de PTGS de HC-Pro, se realizó casi simultáneamente y de forma independiente en tres sistemas diferentes. En uno de ellos, se cruzaron plantas que expresan HC-Pro de manera estable a partir de un transgén, con plantas que contienen un transgén GUS silenciado postranscripcionalmente (Kasschau y Carrington, 1998). En las plantas resultantes revertió el silenciamiento del transgén GUS y se perdió la resistencia frente a un

virus con homología al transgén GUS. En otro de los sistemas, se observó además supresión de VIGS frente a un transgén, por parte de HC-Pro expresado desde un vector viral (Anandalakshmi *et al.*, 1998). En el tercer sistema se observó supresión del silenciamiento de un transgén, tras la infección de las plantas con un potyvirus o con un vector viral que expresa HC-Pro (Brigneti *et al.*, 1998). Los dos primeros emplearon una porción del genoma de TEV que incluye los genes P1 y HC-Pro, mientras que el tercero empleó aisladamente el HC-Pro de PVY. Se ha propuesto que la expresión de P1 puede potenciar el efecto supresor del HC-Pro (Pruss *et al.*, 1997), sin embargo la proteína HC-Pro por si sola es suficiente para suprimir el PTGS.

Otras proteínas HC-Pro de diversos potyvirus muestran capacidad supresora de PTGS o actividades relacionadas, como sinergismo o transactivación de otros virus. Tal es el caso de PPV (Yang y Ravelonandro, 2002; Tenllado *et al.*, 2003), CABMV (Mlotshwa *et al.*, 2002b), PVA (Savenkov y Valkonen, 2001b), TVMV (Simón-Mateo *et al.*, 2003) o TuMV (Kasschau *et al.*, 2003) lo que hace pensar que cualquier proteína HC-Pro presenta actividad supresora de PTGS. Sin embargo su actividad podría estar limitada a ciertas plantas huéspedes (Sáenz *et al.*, 2002), de manera que la capacidad supresora de PTGS podría ser uno de los factores que determinan la gama de huéspedes de un virus.

La proteína HC-Pro es capaz de suprimir el PTGS ya establecido en un tejido, por lo que se dedujo que es capaz de interferir con el mantenimiento del PTGS (Llave *et al.*, 2000). HC-Pro también es capaz de reducir notablemente o retrasar la acumulación de siRNAs, en varios sistemas (Llave *et al.*, 2000; Johansen y Carrington, 2001; Mallory *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2002). En algunos sistemas también parece interferir parcialmente con la metilación del DNA de genes silenciados (Llave *et al.*, 2000). Sin embargo, donde más discrepancia se ha observado es en su capacidad para interferir con el silenciamiento sistémico. En algunos sistemas la expresión estable de HC-Pro a partir de un transgén no impide la producción y exportación de la señal de silenciamiento sistémico (Mallory *et al.*, 2001) e incluso favorece la producción de una señal sistémica con algunos tipos de inductores de PTGS (Mallory *et al.*, 2003). Sin embargo, en otro sistema, la expresión transitoria mediante agroinfiltración de HC-Pro es capaz de impedir el silenciamiento sistémico (Hamilton *et al.*, 2002). La diferencia entre ambos sistemas podría ser debida a la distinta relación entre la cantidad relativa de inductor y supresor de silenciamiento, a diferencias en el mecanismo de silenciamiento entre ambos sistemas, o a la presencia de *Agrobacterium* y la respuesta a este de la planta.

La proteína HC-Pro es capaz de impedir el procesamiento de mRNAs mediado por miRNAs, aunque no impide la acumulación de miRNAs e incluso la estimula (Kasschau *et al.*, 2003). Esto sugiere que HC-Pro podría actuar en la fase efectora de los miRNAs interfiriendo con la función del complejo RISC, pero no en la producción de miRNAs mediada por la enzima Dicer dcl-1/CAF. Dada la probable similitud entre el modo de acción de miRNAs y siRNAs (Hutvagner y Zamore, 2002), estas observaciones se pueden hacer extensibles al PTGS. De esta manera, parece probable que el HC-Pro actúe fundamentalmente impidiendo la fase efectora de los siRNAs, es decir la función del complejo RISC. Otras evidencias provenientes del trabajo con amplicones apoyan que la principal vía de acción de HC-Pro es inhibir el efecto y no la producción de siRNAs. Los amplicones son transgenes que expresan

RNAs virales, con capacidad de replicación. En algunos sistemas la supresión de silenciamiento de amplicones por HC-Pro viene acompañada de un aumento notable en la acumulación de RNA viral y siRNAs de 24-25 nt (Mallory *et al.*, 2002). Si el principal modo de acción de HC-Pro es en efecto impedir la degradación del RNA viral por parte del complejo RISC, es de esperar un aumento de la acumulación y replicación viral, con la consiguiente producción de dsRNA y aumento en la producción de siRNAs. Sin embargo, si la principal vía de supresión de PTGS por HC-Pro fuese impedir el procesamiento de dsRNA por Dicer, sería de esperar que no aumentase notablemente la acumulación de siRNAs.

Otras evidencias sugieren que HC-Pro si podría interferir, al menos parcialmente, con el procesamiento de dsRNA por Dicer, al observarse acumulación de especies de dsRNA en presencia de HC-Pro (Mallory *et al.*, 2002; Dunoyer *et al.*, 2004). La complejidad del mecanismo de silenciamiento, su diversificación y la posibilidad de que enzimas Dicer participen también en complejos RISC hacen necesario más trabajo para discernir el modo de acción de HC-Pro.

Otros indicios del modo de acción de HC-Pro provienen de estudios de interacción de proteínas en el sistema de dos híbridos de levaduras. Se probó la interacción de HC-Pro con proteínas de *A. thaliana*, identificando una proteína de tipo calmodulina que se denominó rgs-CaM (Anandalakshmi *et al.*, 2000). La sobreexpresión de esta proteína en *A. thaliana* provocó defectos en el desarrollo similares a los causados por HC-Pro y supresión del silenciamiento inducido por virus. También se observó supresión del silenciamiento de un transgén mediante expresión de rgs-CaM a partir de un vector viral. Puesto que las proteínas de tipo calmodulina están implicadas en señalización celular, es posible que HC-Pro actúe modificando alguna vía de regulación del silenciamiento interaccionando con rgs-CaM. En plantas de patata se han identificado también dos proteínas que interaccionan con HC-Pro en el sistema de dos híbridos (Guo *et al.*, 2003), aunque no se ha establecido relación con la supresión de PTGS.

#### 1.1.5.2. Otras proteínas virales supresoras de PTGS

La proteína p19 de tombusvirus fue inicialmente identificada como un supresor débil del PTGS (Voinnet *et al.*, 1999), aunque en estudios posteriores se reveló como uno de los supresores más efectivos (Hamilton *et al.*, 2002). La proteína p19 tiene capacidad de unir siRNAs *in vitro* (Silhavy *et al.*, 2002) e *in vivo* (Dunoyer *et al.*, 2004; Lakatos *et al.*, 2004) y de impedir el corte de mRNAs diana por miRNAs, por lo que se ha propuesto que su modo de acción se basa en secuestrar siRNAs y miRNAs e impedir su función. Debido a su modo de acción, se cree que esta proteína puede funcionar como supresor de silenciamiento en múltiples organismos (Baulcombe y Molnar, 2004).

En el caso de la proteína 2b de cucumovirus, los primeros experimentos en plantas con un transgén silenciado mostraron que era capaz de prevenir la iniciación del PTGS pero no de suprimir el PTGS ya establecido (Brigneti *et al.*, 1998). Se trata de una proteína de localización nuclear (Lucy *et al.*, 2000) y parece no interferir con los mecanismos de regulación génica mediados por miRNAs (Chapman *et al.*, 2004). Su principal vía de actuación parece ser la interferencia con el movimiento a larga distancia de la señal sistémica de silenciamiento, aunque no necesariamente con su producción (Guo y Ding, 2002).

La proteína p25 de potexvirus es capaz de suprimir el establecimiento del silenciamiento sistémico, aunque no es capaz de suprimir el silenciamiento a nivel local inducido por un virus (Voinnet *et al.*, 2000). Se ha documentado que reduce la acumulación de los siRNAs de 24-25 nt, relacionados con el silenciamiento sistémico (Hamilton *et al.*, 2002), y aparentemente no afecta a la producción y función de miRNAs (Dunoyer *et al.*, 2004). Su modo de acción podría consistir en interferencia con la producción o movimiento de la señal de silenciamiento sistémico.

La proteína AC2 de geminivirus tiene capacidad supresora de silenciamiento a nivel local, aunque no previene el silenciamiento sistémico, y es capaz de reducir la acumulación de siRNAs de 21-22 nt y de 24-25 nt (Hamilton *et al.*, 2002). La proteína contiene un dominio de localización nuclear (Dong *et al.*, 2003) y un motivo de unión a DNA de tipo dedo de zinc, conservado en varios geminivirus e implicado en la actividad supresora de PTGS (Van Wezel *et al.*, 2003), por lo que se cree que puede mediar la supresión de silenciamiento actuando sobre la transcripción de ciertos genes (Trinks *et al.*, 2005).

La proteína p15 de pecluvirus es capaz de suprimir silenciamiento a nivel local y sistémico y de reducir notablemente la acumulación de siRNAs. Contiene un dominio que media la oligomerización de la proteína y que es necesario para la función supresora de silenciamiento (Dunoyer *et al.*, 2002). Además impide el procesamiento de mRNAs mediado por miRNAs. También puede suprimir el silenciamiento en células humanas (Dunoyer *et al.*, 2004).

La proteína CP o p38 de carmovirus es capaz de suprimir el silenciamiento a nivel local y sistémico, además de reducir notablemente la acumulación de siRNAs (Qu *et al.*, 2003). No impide el procesamiento de mRNAs mediado por miRNAs (Chapman *et al.*, 2004) y promueve la acumulación de RNAs sentido y antisentido, por lo que se ha propuesto que podría actuar interfiriendo con el procesamiento de dsRNA por Dicer (Qu *et al.*, 2003). Además, es capaz de suprimir el silenciamiento en células humanas (Dunoyer *et al.*, 2004).

La proteína p21 de closterovirus es capaz de suprimir el silenciamiento a nivel local (Reed *et al.*, 2003) y a nivel sistémico (Lu *et al.*, 2004). Es capaz de unir siRNAs y miRNAs *in vivo* y de interferir con el procesamiento de mRNAs mediado por miRNAs (Chapman *et al.*, 2004).

La proteína p69 de tymovirus es capaz de suprimir el silenciamiento inducido por un transgén lineal o un amplicón, aunque no el inducido por una repetición invertida que produce directamente dsRNA. No inhibe el procesamiento de mRNAs por miRNAs, sino que lo estimula aumentando la acumulación de miRNAs. Ambos datos sugieren que no interfiere con la producción de siRNAs o miRNAs por Dicer, ni con su función mediada por RISC, y que la interferencia podría darse con los mecanismos celulares de producción de dsRNA basados en RdRP (Chen *et al.*, 2004).

Otras proteínas de virus de plantas son capaces de interferir con el silenciamiento, aunque existen menos datos sobre su modo de acción. La proteína p0 de polerovirus suprime el silenciamiento a nivel local pero no a nivel sistémico (Pfeffer *et al.*, 2002). La proteína p1 de sobemovirus suprime el silenciamiento tanto a nivel local como a nivel sistémico (Voinnet *et al.*, 1999; Hamilton *et al.*, 2002). La proteína NSs de tospovirus suprime el silenciamiento al menos a nivel local (Takeda

*et al.*, 2002; Bucher *et al.*, 2003). La proteína NS3 de tenuivirus también suprime el silenciamiento al menos a nivel local, aunque no parece reducir los niveles de siRNAs (Bucher *et al.*, 2003). La proteína 16K de tobavirus es capaz de suprimir el PTGS en células de *Drosophila* (Reavy *et al.*, 2004). La proteína p130 de tobavirus (Kubota *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2004), la proteína  $\gamma$ b de hordevirus (Yelina *et al.*, 2002) y la subunidad pequeña de la CP de comovirus (Liu *et al.*, 2004) también tienen capacidad supresora de silenciamiento.

Algunas proteínas de virus animales también han mostrado capacidad de supresión de silenciamiento, como la proteína B2 de nodavirus, la NS1 del virus de la gripe (Bucher *et al.*, 2004; Delgadillo *et al.*, 2004) o la E3L del virus vaccinia (Li *et al.*, 2004). En algunos casos, esta actividad supresora de silenciamiento se ha correlacionado con una elevada patogenicidad del virus en su huésped natural.

## 1.2. LOS POTYVIRUS

### 1.2.1 Posición taxonómica

El término potyvirus deriva del nombre de la especie tipo de este grupo *Potato virus Y* (PVY) o virus Y de la patata. Desde el punto de vista filogenético se incluyen dentro del supergrupo de los virus de plantas de RNA de polaridad positiva tipo Picorna, ya que comparten aspectos de su estructura y expresión genómica con los picornavirus de animales (Goldbach, 1987). Dentro del supergrupo de los Picornavirus se incluyen dos familias con miembros pertenecientes a virus de plantas: *Comoviridae*, la cual incluye los géneros *Comovirus* y *Nepovirus*, cuyos genomas constan de dos moléculas de RNA, y *Potyviridae*, la cual incluye seis géneros, *Potyvirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Tritimovirus* y *Rymovirus*, cuyos genomas tienen una sola cadena de RNA (Barnett, 1992), y *Bymovirus*, cuyo genoma está constituido por dos cadenas de RNA (Kashiwazaki *et al.*, 1991).

### 1.2.2 Características de la familia Potyviridae

La familia *Potyviridae* constituye el grupo de virus de plantas más numeroso, con al menos 200 miembros, entre posibles y definitivos, repartidos entre estos seis géneros citados, lo cual representa un 30% de todos los virus de plantas conocidos actualmente (Ward y Shukla, 1991; van Regenmortel *et al.*, 2000). Estos virus provocan pérdidas considerables en cultivos agrícolas y ornamentales de importancia económica en todo el mundo. Los géneros propuestos para la familia *Potyviridae* se diferencian entre sí principalmente por su modo de transmisión en la naturaleza. Así, los potyvirus y los macluravirus son transmitidos por pulgones, los rymovirus y los tritimovirus por ácaros, los bymovirus por hongos y los ipomovirus por mosca blanca (van Regenmortel *et al.*, 2000; Hull, 2002).

Una característica común a todos los miembros de esta familia es la formación de unas inclusiones cilíndricas en forma de aspas de molino (del inglés "pinwheels") en el citoplasma de las células infectadas (Rubio-Huertos y López-Abella, 1966). La morfología de estas inclusiones, variable según los virus, constituye uno de los criterios taxonómicos empleados para su clasificación (Shukla *et al.*, 1989; Ward y Shukla, 1991).

Todos los miembros de la familia *Potyviridae*, a excepción de los bymovirus, presentan una sola partícula viral con forma de varilla de aspecto flexible y

filamentoso, sin envuelta, de unos 650 a 950 nm de longitud y 11 a 15 nm de diámetro. El genoma de los miembros de esta familia, a excepción de los bymovirus, está constituido por una única cadena de RNA de polaridad positiva de entre 9 kb y 10 kb de longitud (Riechmann *et al.*, 1992). La información genética codificada por el RNA genómico se organiza como una única fase de lectura abierta (ORF). La replicación tiene lugar a través de la producción de una cadena completa de RNA de sentido negativo.

### 1.2.3 El género *Potyvirus*

#### 1.2.3.1. Estructura y organización genómica

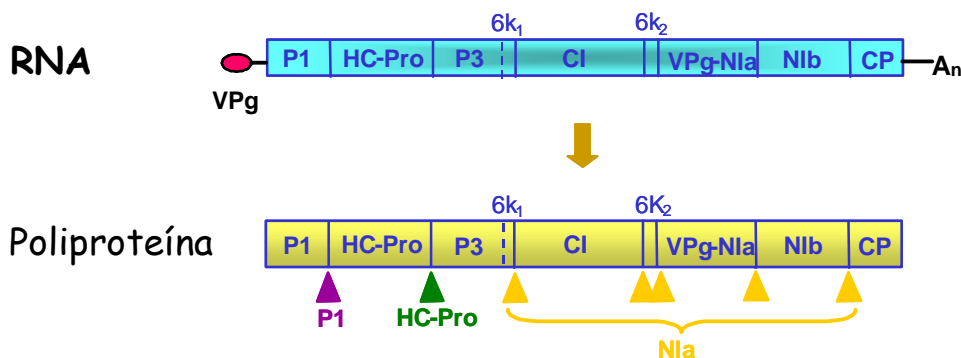
El género potyvirus comparte todas las características que definen a la familia *Potyviridae* en cuanto a la morfología de la partícula viral, formación de inclusiones cilíndricas en las células infectadas y estructura genómica. La partícula viral está compuesta por una sola cadena de RNA de unas 10 kb y sentido mensajero, rodeada por aproximadamente dos mil copias de la proteína de la cápsida (CP) viral. El RNA genómico de los potyvirus lleva además asociada una proteína VPg en su extremo 5' (Riechmann *et al.*, 1989; Murphy *et al.*, 1990) y una cola poli-A en el extremo 3' (Hari *et al.*, 1979) (Figura 1.2), y contiene una única ORF flanqueada por regiones no codificantes que se traduce en una poliproteína de aproximadamente 350 kDa cuyo procesamiento por proteasas virales da lugar a los productos finales (Verchot *et al.*, 1991; Riechmann *et al.*, 1992).

En la región no codificadora del extremo 5', de unos 200 nucleótidos, aparecen algunos bloques de nucleótidos conservados entre diferentes potyvirus (Laín *et al.*, 1989; Turpen, 1989). Esta región podría jugar un papel importante en procesos del ciclo viral como la encapsidación (Wu y Shaw, 1998), la traducción (Carrington y Freed, 1990) o la replicación genómica (Laín *et al.*, 1989), aunque no parece existir una estructura secundaria conservada (Turpen, 1989; Simón-Buela *et al.*, 1997). La región no codificadora presente en el extremo 3' del RNA viral muestra un alto grado de heterogeneidad en tamaño, secuencia y estructura secundaria entre potyvirus (Turpen, 1989; Quemada *et al.*, 1990). Esta región no codificadora podría formar estructuras secundarias e interactuar con la replicasa viral durante el inicio de la síntesis de la cadena de RNA de sentido negativo (Bryan *et al.*, 1992; Haldeman-Cahill *et al.*, 1998), además de proteger el RNA viral de degradación exonucleolítica. Se ha demostrado que dicha región tiene efecto sobre la expresión de síntomas en plantas infectadas con TVMV (Rodríguez-Cerezo *et al.*, 1991).

#### 1.2.3.2. Estrategia de expresión genómica: procesamiento de la poliproteína viral

El RNA genómico de los potyvirus funciona como un RNA mensajero. Aunque no se conoce bien cómo es el proceso de iniciación de la traducción, se cree que la poliproteína viral sufre procesamientos co- y post-traduccionales que son llevados a cabo por las tres proteínas virales con función proteasa (Riechmann *et al.*, 1992). El procesamiento de esta poliproteína da lugar a nueve productos proteicos que, a partir del extremo amino terminal, son: P1, factor de transmisión (HC-Pro), P3, 6k1, proteína de las inclusiones cilíndricas (CI), 6k2, proteína "a" de las inclusiones nucleares (NIa), proteína "b" de las inclusiones nucleares (NIb) y proteína de la cápsida (CP) (Figura 1.2). El procesamiento de la poliproteína viral daría como

resultado cantidades equimoleculares de cada una de las proteínas citadas (Restrepo *et al.*, 1990), con excepción de aquellas que son resultado de un procesamiento parcial de las principales (6k1 y VPg). Sin embargo, los potyvirus podrían no necesitar la misma cantidad de todos estos productos para completar su ciclo biológico, de manera que los excedentes quedan acumulados en forma de inclusiones celulares compartimentalizadas en el citoplasma y núcleo (Lessemann, 1988). Cabe destacar que, mientras que las proteínas que forman inclusiones y la CP se detectan en cantidades considerables en las células infectadas (Hollings y Brunt, 1981), no ocurre lo mismo con los productos proteicos P1 y P3, los cuales sólo han podido ser detectados mediante inmunomicroscopía electrónica (Rodríguez-Cerezo y Shaw, 1991). Podría ocurrir que los potyvirus tuvieran un sistema de control de expresión de productos génicos basado en un procesamiento diferencial de los intermediarios (Dougherty *et al.*, 1989).



**Figura 1.2.** Organización genómica de los potyvirus y procesamiento de la poliproteína viral. Las flechas indican los puntos de corte sobre los que actúan las tres proteínas virales con función proteasa.

La proteína P1, de 28 a 34 kDa, presenta actividad proteasa en su extremo carboxilo, que cataliza su separación del resto de la poliproteína (Figura 1.2), pudiendo estar implicado en este proceso algún cofactor de la planta (Verchot *et al.*, 1991; Verchot *et al.*, 1992). Junto con la P3, la P1 es la proteína menos conservada entre potyvirus, a excepción de su extremo carboxilo (Robaglia *et al.*, 1989; Ryan y Flint, 1997). Se ha sugerido que pudiera estar implicada en el proceso de movimiento célula a célula (Riechmann *et al.*, 1992). Se ha demostrado su papel como factor accesorio no esencial para la estimulación de la amplificación genómica (Verchot y Carrington, 1995a) y también podría estimular la función supresora de silenciamiento génico del HC-Pro (Pruss *et al.*, 1997). Tiene capacidad para unirse de manera no específica al RNA viral, tanto de cadena sencilla como de doble cadena (Brantley y Hunt, 1993), y se ha encontrado asociada a las inclusiones citoplasmáticas formadas por la proteína CI (Arbatova *et al.*, 1998).

El factor de transmisión o componente auxiliar HC-Pro o “helper component”, de 48 a 58 kDa de peso aparente, es una proteína multifuncional (Maia *et al.*, 1996). Interviene en la transmisión de potyvirus por pulgones, posiblemente actuando como puente entre el estilete del pulgón y la partícula viral (Atreya y Pirone, 1993; Wang *et al.*, 1998). Presenta en la región N-terminal un dominio KITC y una región rica en residuos de cisteína altamente conservados que están directamente involucrados en la unión del HC-Pro al estilete del vector (Blanc *et al.*, 1998). Se ha sugerido que el

motivo PTK, también altamente conservado y presente en la región central, es el responsable de la unión del HC-Pro a la partícula viral (Peng *et al.*, 1998).

El HC-Pro actúa además como factor de patogenicidad, necesario para la amplificación y movimiento a larga distancia del virus en la planta (Cronin *et al.*, 1995; Kasschau y Carrington, 1995; Kasschau *et al.*, 1997). Mutaciones en ciertos motivos de la región central inhabilitan a la proteína para la amplificación genómica y el movimiento a larga distancia (Kasschau *et al.*, 1997). Esta misma región está implicada en la inducción de sinergismo (Shi *et al.*, 1997) y en la supresión de PTGS (Kasschau y Carrington, 2001), por lo que se cree que las funciones en amplificación y movimiento a larga distancia pueden ser consecuencia de la supresión de la defensa antiviral basada en PTGS. La región central está también implicada en interacción con ácidos nucleicos (Maia y Bernardi, 1996; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2000). Es también un determinante de síntomas (Sáenz *et al.*, 2001), siendo al menos parte de ellos causados por la interferencia con el metabolismo de miRNAs (Kasschau *et al.*, 2003).

Por último, el HC-Pro presenta un dominio tiol-proteasa en su extremo carboxilo que le confiere capacidad autoproteolítica (Figura 1.2) y cuyo punto de corte se corresponde con el dipéptido Gly-Gly, altamente conservado entre potyvirus y localizado en el extremo carboxilo de la molécula, en la unión con la proteína P3 (Carrington *et al.*, 1989; Oh y Carrington, 1989). Esta región C-terminal podría estar también involucrada en el movimiento célula a célula del virus, habiéndose demostrado que el HC-Pro es capaz de incrementar el límite de exclusión de los plasmodesmos y de facilitar el paso del RNA viral de una célula a otra (Rojas *et al.*, 1997).

La proteína P3 ha sido identificada como una proteína de 37 a 42 kDa, lo cual podría corresponder a las formas P3 y P3-6k1, ya que el procesamiento entre P3 y 6k1 parece ser poco eficiente (Figura 1.2) (Riechmann *et al.*, 1992; Riechmann *et al.*, 1995). Al igual que P1, su secuencia está poco conservada entre potyvirus. Varios trabajos la localizan asociada a las inclusiones cilíndricas formadas por la proteína CI (Rodríguez-Cerezo *et al.*, 1993) o a las inclusiones nucleares (Langenberg y Zhang, 1997), por lo que se le atribuye un posible papel en la replicación viral. Dado que es la única proteína viral que no tiene capacidad de unión a RNA (Merits *et al.*, 1998), se postula que su participación en la replicación tiene lugar a través de la interacción con otras proteínas. Se le ha asignado también un papel como cofactor en el procesamiento de la poliproteína (Riechmann *et al.*, 1992). La sustitución del sitio natural de corte entre HC-Pro y P3 por el sitio específico de corte para la N1a no soporta la replicación viral (Kasschau y Carrington, 1995), al contrario de lo que sucede cuando esa sustitución se efectúa entre las proteínas P1 y HC-Pro (Verchot y Carrington, 1995b).

El péptido 6k1 presenta un alto nivel de homología (Laín *et al.*, 1989) entre diferentes potyvirus. No ha podido ser detectado *in vivo*, de manera que el procesamiento P3-6k1 puede no ser imprescindible para la infección viral. Su secuencia y posición en la poliproteína sugieren que podría ser análogo al péptido 2B de picornavirus (Laín *et al.*, 1989) que está involucrado en el proceso de replicación del RNA viral (Johnson y Sarnow, 1991).

La proteína de las inclusiones cilíndricas (CI), de 70 kDa, es la responsable de la formación de las inclusiones citoplasmáticas o “pinwheels” que caracteriza a todos los miembros de la familia *Potyviridae* (Dougherty y Hiebert, 1980). Se ha comprobado que interviene en el movimiento célula a célula del virus en la planta (Carrington *et al.*, 1998), siendo capaz de asociarse a la membrana plasmática y a plasmodesmos (Rodríguez-Cerezo *et al.*, 1997; Roberts *et al.*, 1998), así como a viriones (Langenberg, 1993). Presenta actividad RNA helicasa, NTPasa y de unión a RNA (Laín *et al.*, 1990; Laín *et al.*, 1991; Fernández *et al.*, 1995), estando involucrada en la replicación viral (Fernández *et al.*, 1997). La proteína CI podría estar implicada en otras funciones como la unión del complejo de replicación a membranas celulares.

El péptido 6k2 tiene capacidad de anclaje a membranas a través de su dominio central hidrofóbico y podría jugar un papel en el anclaje del complejo replicativo a la membrana (Restrepo-Hartwig y Carrington, 1994; Schaad *et al.*, 1997b). Guarda similitud con el péptido 3B de picornavirus, que tiene capacidad de unión a membranas y está implicado en la replicación viral (Giachetti y Semler, 1991).

La proteína “a” de las inclusiones nucleares (NIa), de 49 a 52 kDa, se localiza mayoritariamente en el núcleo de las células infectadas, lo cual implica que contiene señales para su transporte desde el citoplasma (Restrepo *et al.*, 1990; Restrepo-Hartwig y Carrington, 1992). Forma parte de las inclusiones nucleares que inducen ciertos potyvirus, las cuales posiblemente son consecuencia de la acumulación de un excedente de proteína (Dougherty y Hiebert, 1980). Se piensa que la no separación por proteólisis de 6k2, que le precede en la poliproteína (Figura 1.2), bloquea su migración al núcleo (Restrepo-Hartwig y Carrington, 1992). Presenta dos dominios funcionales, uno en el extremo amino, que se corresponde con la proteína VPg de unión a RNA viral (Murphy *et al.*, 1990), y otro en el extremo carboxilo, donde reside su actividad proteolítica (Dougherty y Parks, 1991). La actividad proteasa de tipo serina es la responsable del procesamiento tanto en *cis* como en *trans* de todos los puntos de corte de la poliproteína viral (Figura 1.2) (Carrington *et al.*, 1988; Dougherty *et al.*, 1989; García *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1998), salvo de los autoprosesados por P1 y HC-Pro. NIa procesa en *trans* con baja eficiencia el punto de corte entre los dominios VPg y NIaPro (Dougherty y Parks, 1991). Se ha demostrado *in vitro* que NIa interacciona con ella misma y con la proteína NIb a través del dominio VPg (Hong *et al.*, 1995; Guo *et al.*, 2001) sugiriéndose que esta última estimula la actividad RNA polimerasa de la NIb (Fellers *et al.*, 1998).

La proteína VPg, de 24 kDa, surge mediante procesamiento interno de NIa (Carrington *et al.*, 1993). Se une covalentemente al extremo 5' del RNA genómico a través de un residuo de Tyr, formando así parte de la partícula viral (Murphy *et al.*, 1991). Además de desempeñar funciones de protección y estabilización del RNA genómico, se ha propuesto que esta proteína podría estar relacionada con el transporte subcelular, con el movimiento a corta y larga distancia del virus en la planta (Schaad *et al.*, 1996; Schaad *et al.*, 1997a) y con el inicio de la replicación viral (Murphy *et al.*, 1996). Podría tener un papel en la traducción del RNA viral, ya que interacciona con el factor de iniciación de la traducción eIF(iso)4E (Wittmann *et al.*, 1997), que además es un factor necesario para la infección viral (Duprat *et al.*, 2002; Lellis *et al.*, 2002).

La proteína “b” de las inclusiones nucleares (NIb), de 56-58 kDa, al igual que la NIa se acumula en el núcleo formando parte de las inclusiones nucleares (Dougherty

y Hiebert, 1980). Nib es la RNA polimerasa dependiente de RNA responsable de la replicación viral y presenta una alta homología de secuencia con otras polimerasas virales (Domier *et al.*, 1987; Martín y García, 1991; Hong y Hunt, 1996). Es capaz de unirse a RNA (Merits *et al.*, 1998) y de interaccionar con una proteína de unión a poli-A del huésped (Wang *et al.*, 2000) aunque se desconoce como esa interacción puede afectar a la amplificación del virus.

La proteína de la cápsida (CP), de 30 a 37 kDa, está encargada principalmente de encapsidar el RNA viral (Shukla y Ward, 1989). Posee una región central altamente conservada entre potyvirus y extremos amino y carboxilo variables en longitud y secuencia. La región central está involucrada en la encapsidación del genoma viral. Los extremos amino y carboxilo se localizan en la superficie de la partícula (Allison *et al.*, 1985; Dougherty *et al.*, 1985) y no son necesarios para el ensamblaje de la partícula viral ni para la infectividad por inoculación mecánica (Shukla *et al.*, 1988). En su porción amino terminal se localiza un triplete de aminoácidos Asp-Ala-Gly (DAG) que está directamente involucrado en el proceso de transmisión de los potyvirus por pulgones (Atreya *et al.*, 1995; Blanc *et al.*, 1997; López-Moya *et al.*, 1999). Esta proteína interviene también en el movimiento a corta y larga distancia del virus en la planta (Dolja *et al.*, 1994; Dolja *et al.*, 1995; Rojas *et al.*, 1997). Aunque esta es la única proteína viral que no parece necesaria para la replicación del virus, la secuencia de RNA que la codifica sí que parece jugar un papel esencial en este proceso (Mahajan *et al.*, 1996; Haldeman-Cahill *et al.*, 1998).

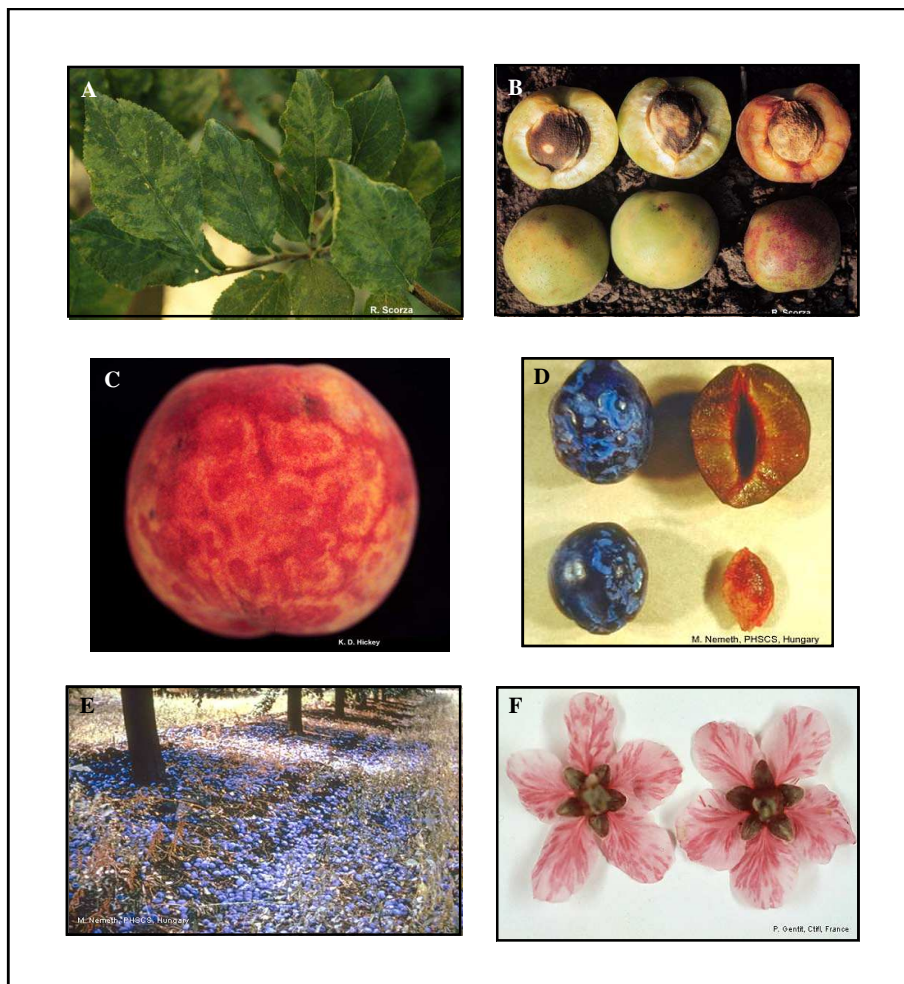
### 1.3. EL VIRUS DE LA SHARKA (PPV)

#### 1.3.1 Características y control de la enfermedad

La sharka es una de las enfermedades más devastadoras que afecta a árboles frutales, mayoritariamente del género *Prunus*, cuyo agente causal es el virus de la viruela del ciruelo o *Plum pox virus* (PPV), perteneciente al género *Potyvirus* familia *Potyviridae* (Kegler y Schade, 1971). Esta enfermedad se describió por primera vez en cultivos de ciruelo en Bulgaria en 1917. Actualmente la sharka se distribuye en gran parte de Europa y la cuenca mediterránea, y se ha detectado también en Chile, la India, y recientemente en Estados Unidos y Canadá (López-Moya *et al.*, 2000). En España la sharka se detectó por primera vez en 1984 en cultivos de ciruelo japonés var. Red Beauty en Sevilla, Murcia y Valencia (Llacer *et al.*, 1985). Posteriormente la enfermedad se ha extendido a Cataluña, Baleares, Aragón, Andalucía y Extremadura.

Sus huéspedes naturales son mayoritariamente especies del género *Prunus*, muchas de ellas de interés agronómico como el ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.), ciruelo japonés (*P. salicina* Lindl.), melocotonero (*P. persica* (L.) Batsch), albaricoquero (*P. armeniaca* L.), cerezo, tanto dulce (*P. avium* L.) como ácido (*P. cerasus* L.) (Kalashyan *et al.*, 1994; Crescenzi *et al.*, 1995) y almendro (*Prunus amygdalus* Batsch.) (Németh, 1994). Otras especies de *Prunus* silvestres y varias especies de plantas tanto leñosas como herbáceas de otros géneros podrían actuar como reservorios naturales del virus, pudiendo tener una gran importancia sobre la epidemiología y el control de PPV. Entre los huéspedes experimentales, las especies más utilizadas en laboratorio para multiplicar y propagar el virus pertenecen al género *Nicotiana*, y como plantas indicadoras especies del género *Chenopodium*.

Los síntomas de PPV en *Prunus* aparecen en hojas, flores, frutos y semillas (Figura 1.3). La severidad de los síntomas varía dependiendo de la especie de *Prunus* y de la variedad de cultivo, así como de la cepa de PPV, de la estación del año y de la localización. En las hojas pueden aparecer síntomas en forma de manchas anulares cloróticas o necróticas, o de amarilleo o clorosis de venas con deformación de las hojas. En los frutos se pueden observar manchas anulares sobre la piel, deformaciones de la pulpa y, en los casos más graves como el del albaricoquero, acorchado de la pulpa con aparición de anillos claros característicos en el hueso. Todos estos síntomas suelen ir acompañados de una caída prematura de los frutos (Kegler y Schade, 1971), de manera que los frutos pueden perder su valor comercial tanto para el consumo directo como para el uso industrial. En las variedades más sensibles las pérdidas pueden llegar a ser de entre el 80-100%. La atenuación de los síntomas en frutales durante el invierno y la distribución irregular del virus en la planta hace que en ocasiones sea muy difícil su detección (López-Moya *et al.*, 2000). En Europa, alrededor de cien millones de frutales de hueso están infectados con PPV (Kegler *et al.*, 1998).



**Figura 1.3.** Síntomas de infección de PPV en hojas, flores y frutos. A: manchas cloróticas en hoja de ciruelo; B: frutos de albaricoquero mostrando síntomas en pulpa (acorchado) y hueso (anillos); C: anillos en fruto de melocotonero; D: deformación de frutos de ciruelo; E: caída prematura de frutos de ciruelo; F: interrupción del color de los pétalos en flores de melocotonero.

La dispersión natural del virus de una planta a otra tiene lugar por medio de pulgones. Se han descrito más de veinte especies de pulgones capaces de transmitir PPV en condiciones experimentales (Labonne *et al.*, 1995) si bien en condiciones naturales se considera que los vectores más importantes son *Brachycaudus cardui*, *B. helichrysi*, *Myzus persicae* y *Phorodon humuli*. La actividad humana puede contribuir a la propagación del virus mediante el tránsito comercial de material vegetal infectado, siendo a menudo esta la causa de la introducción de PPV en una nueva región o país.

Las medidas de control incluyen la cuarentena en las áreas donde aún no está presente para evitar su introducción, la erradicación de plantas infectadas, la propagación de plántulas sanitariamente controladas libres de virus y el control de los insectos vectores. La escasez de variedades de cultivo resistentes al virus limita la utilización de métodos de mejora genética tradicional para el control de la enfermedad (Dosba *et al.*, 1992; Kegler *et al.*, 1998; Hurtado *et al.*, 2002). En tal situación los métodos de ingeniería genética como resistencia derivada del patógeno suponen una buena alternativa. Se ha descrito resistencia derivada del patógeno en plantas experimentales transformadas con diversas porciones de PPV (Ravelonandro *et al.*, 1993a; Guo y García, 1997; Jacquet *et al.*, 1998; Taver-Roudet *et al.*, 1998; Wittner *et al.*, 1998) y también en plantas de interés agronómico (Ravelonandro *et al.*, 1998; Ravelonandro *et al.*, 2000; Scorza *et al.*, 2001).

### **1.3.2 La proteína HC-Pro de PPV**

La mayoría de trabajos que abordan el análisis de las funciones que desempeña la proteína HC-Pro de potyvirus, se han llevado a cabo con los virus PVY, TEV o TVMV, siendo más escasos los trabajos publicados en relación a PPV. En concreto, algunos de los aspectos de HC-Pro que han sido investigados en PPV, incluyen, la actividad proteolítica de la proteína HC-Pro sobre su extremo 3' (Ravelonandro *et al.*, 1993b), la identificación de posiciones en la secuencia que afectan a su función en la transmisión por pulgones, pero no a la infectividad del virus (Martínez García, 2000), y su capacidad supresora de PTGS.

En cuanto a su capacidad supresora de PTGS, se ha comprobado que interfiere con la resistencia a virus promovida por la expresión de dsRNA a partir de una repetición invertida (Tenllado *et al.*, 2003). Se ha estudiado su capacidad como inductor de sinergismo en infecciones de PVX (Sáenz *et al.*, 2001; Yang y Ravelonandro, 2002), que es una propiedad relacionada con la capacidad de supresión de PTGS. Se han descrito cambios puntuales en aminoácidos de la proteína HC-Pro de PPV, que ocasionan una disminución de la sintomatología (Sáenz *et al.*, 2001), y a la vez tienen efectos negativos sobre la capacidad de inducción de sinergismo con PVX. Igualmente, se ha identificado por parte de nuestro laboratorio, una posición en el dominio central de HC-Pro cuya mutación inhabilita simultáneamente la función supresora de PTGS y la capacidad de inducir sinergismo con PVX (González-Jara *et al.*, 2005). Se ha demostrado que la incapacidad de PPV para infectar sistémicamente plantas de *N. tabacum* se debe, al menos en parte, a la incapacidad de su HC-Pro de estimular el movimiento a larga distancia en este huésped, ya que el HC-Pro de TEV, expresado como transgén en *N. tabacum*, sí es capaz de estimular el movimiento a larga distancia de PPV (Sáenz *et al.*, 2002). Dada la posible relación entre las funciones de estimulación de la amplificación y movimiento sistémico del virus, y supresión de PTGS por parte de

HC-Pro, estos defectos podrían denotar una incapacidad del HC-Pro de PPV de suprimir PTGS en *N. tabacum*, lo que sugiere que la capacidad de supresión de PTGS podría ser uno de los factores que determinan la gama de huéspedes de PPV.

#### 1.4. HIPOVIRUS

Los hipovirus son un grupo de virus de hongos que se identificaron por primera vez en cepas de *Cryphonectria parasitica*, un hongo causante de la enfermedad del chancro del castaño. La característica más notable de los hipovirus es que causan una reducción de la patogenicidad o hipovirulencia del hongo al que infectan (Dawe y Nuss, 2001). Estos virus se acumulan en el citoplasma en forma de RNA de doble cadena, y no se conocen vectores capaces de transmitirlo, por lo que su única vía de transmisión de unos individuos a otros parece ser la fusión de hifas. Su acumulación en forma de dsRNA en hongos, donde opera el mecanismo de silenciamiento génico, hace a este grupo de virus un candidato idóneo para la búsqueda de nuevos supresores de silenciamiento.

Otro aspecto que los hace interesantes desde el punto de vista de este trabajo, es su similitud de secuencia con los potyvirus (Koonin *et al.*, 1991), por lo que incluso se sugiere que ambos grupos puedan tener un origen común. El RNA genómico del hipovirus tipo CHV1-EP713 contiene dos marcos de lectura, denominados ORF A y ORF B. La ORF A codifica un polipéptido, que se autoprocasa para producir las proteínas p29 y p40, mediante la actividad proteasa de p29 (Choi *et al.*, 1991a). La ORF B codifica un polipéptido del que se libera la proteína p48, gracias a su actividad proteasa (Shapira y Nuss, 1991). Los mayores niveles de homología se observan entre la región central de ORF B y la RNA polimerasa NIb de potyvirus, la región C-terminal de ORF B y la helicasa CI de potyvirus, la región N-terminal de p29 y la región rica en cisteínas de HC-Pro, y entre los dominios proteasa de p29 y p48 y el dominio proteasa de HC-Pro (Choi *et al.*, 1991b; Koonin *et al.*, 1991; Shapira *et al.*, 1991).

Se ha determinado que la ORF A no es imprescindible para la replicación viral (Suzuki *et al.*, 2000). En base a esto y a la homología de la ORF B con la RNA polimerasa y helicasa de potyvirus, se deduce que la ORF B codifica los factores fundamentales de la replicación viral. A pesar de no ser imprescindibles para la replicación, las proteínas p29 y p40 funcionan como factores auxiliares y de patogenicidad. Ambas proteínas estimulan la acumulación de dsRNA viral y determinan gran parte de los cambios fisiológicos originados en el hongo infectado, como la reducción de la pigmentación y de la esporulación, aunque no determinan la hipovirulencia (Suzuki *et al.*, 1999; Suzuki y Nuss, 2002). La delección de p29 del genoma del virus, reduce la acumulación del RNA viral y la inducción de síntomas. Estas carencias pueden ser complementadas con la expresión de p29 en el hongo a partir de un transgén. De hecho, la expresión de p29 por si sola es capaz de inducir en el hongo varios de los síntomas de la infección viral (Suzuki *et al.*, 2003). Se ha delimitado con precisión la región de p29 determinante de síntomas, que corresponde a la región N-terminal rica en cisteínas y homóloga a la misma región de HC-Pro (Suzuki *et al.*, 1999). La delección de p40 del genoma del virus, también causa una reducción de la acumulación de RNA viral y de la inducción de síntomas, aunque, en este caso, la expresión de p40 a partir de un transgén no es capaz de complementar estos defectos (Suzuki *et al.*, 2003). Igualmente, la expresión de p40

por si sola no induce síntomas en el hongo, por lo que se cree que p40 contribuye a la inducción de síntomas indirectamente al estimular la acumulación del RNA viral (Suzuki y Nuss, 2002).

La función de p29 como factor de patogenicidad y determinante de síntomas, incluso en ausencia de la infección viral, sugieren que puede interferir directamente con algunas de las funciones del hongo. Esta característica, la homología observada entre p29 y HC-Pro y el hecho de que el virus se acumule como dsRNA, sugieren que la proteína p29 podría ser un supresor de silenciamiento génico.



## ***2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS***



En la actualidad, los métodos empleados para el control de enfermedades virales basados en la identificación de genes naturales de resistencia, en la detección precoz de plantas infectadas y en la eliminación de vectores y reservorios, tienen una eficacia muy limitada. Una alternativa para el control más eficiente de las enfermedades virales es la utilización de plantas transgénicas resistentes a virus. En este sentido, es de gran interés la caracterización y mejor conocimiento de los mecanismos de resistencia a virus, entre ellos el silenciamiento génico postranscripcional (PTGS), que destaca debido a su potencial para ser utilizable frente a una gran variedad de virus.

Además, se ha descubierto que muchos virus de plantas son capaces de inducir PTGS, y que este sirve como mecanismo natural de defensa de la planta frente al virus. Igualmente, la mayoría de virus de plantas producen durante la infección viral proteínas supresoras de PTGS, que son necesarias para la infección viral. En este sentido, el balance entre el PTGS inducido por el virus y la supresión de este por proteínas virales, es probablemente uno de los factores que determinan el curso de una infección viral.

En la presente tesis se han producido plantas transgénicas que expresan la proteína supresora de PTGS HC-Pro del virus PPV, con el fin de estudiar el silenciamiento génico inducido frente a este transgén y el posible efecto de la proteína HC-Pro, codificada por el propio transgén, sobre el silenciamiento. Tal situación es similar a la producida en una infección viral, en la que el virus es inductor y diana del PTGS y a la vez codifica un supresor de PTGS. Por ello, con este sistema se pretende aportar información sobre el posible balance entre inducción y supresión de PTGS.

Este sistema permitirá además caracterizar algunos aspectos de la resistencia a virus producida por el transgén HC-Pro, así como el efecto sobre el PTGS y la resistencia, de otros supresores de silenciamiento expresados por diversos virus.

También abordamos la identificación de nuevos supresores de PTGS. La conservación del mecanismo de PTGS en múltiples organismos y el creciente número de indicios que apuntan a que tiene un papel en la defensa frente a virus, sustentan que la supresión del PTGS puede ser un requerimiento necesario de manera generalizada en gran número de virus, no solo de plantas. Por ello hemos analizado la capacidad supresora de PTGS de la proteína p29 del virus de hongos CHV1 que presenta algunas características típicas de los supresores de PTGS.



### ***3. MATERIALES Y MÉTODOS***



### 3.1. VIRUS E INOCULACIÓN DE PLANTAS

#### 3.1.1 Origen de los aislados virales

Los aislados españoles de PPV 3.3 y 5.15 (López-Moya *et al.*, 1994), proceden de ciruelo japonés var. Red Beauty y albaricoquero var. Canino, respectivamente, y fueron cedidos por el Dr. M. Cambra (IVIA, Valencia). Estos aislados se inocularon mecánicamente en plantas de *Nicotiana benthamiana* y fueron mantenidos mediante sucesivas inoculaciones mecánicas.

El aislado P-21-82 de PVY (Llave *et al.*, 1999) procede de cultivos españoles de pimiento y fue proporcionado por el Dr. F. Ponz (CIT-INIA, Madrid). Este aislado pertenece al patotipo 0 y es transmisible por pulgones, por lo que se denominó PVY-0-AT (Canto *et al.*, 1995). Se mantuvo mediante inoculaciones sucesivas en plantas de *N. tabacum* L. var. Xanthi nc y de *N. benthamiana*.

TEV procede de la infección de plantas con transcritos del plásmido pTEV7DA, que contiene el genoma completo de TEV-HAT (Dolja *et al.*, 1992) y que fue cedido por el Dr. J. C. Carrington (Oregon State University, EE.UU.). El virus fue mantenido mediante sucesivas inoculaciones mecánicas en plantas de *N. tabacum* L. var. Xanthi nc y de *N. benthamiana*.

El aislado CMV-24 del subgrupo 1a de CMV procede de infecciones de melón en Valencia (García-Luque *et al.*, 1984). Se mantuvo mediante inoculaciones mecánicas en *N. benthamiana* y *N. clevelandii*.

El aislado español PMMoV-S procede de pimiento (García-Luque *et al.*, 1990). Se emplearon preparaciones de virus purificado a partir de *N. clevelandii* (García-Luque *et al.*, 1990).

PVX se obtuvo mediante infección de plantas con transcritos del plásmido p402, que contiene el genoma completo de PVX UK-3, y que fue cedido por el Dr. S. Santa Cruz (SCRI, Dundee, Escocia). El virus fue mantenido mediante sucesivas inoculaciones mecánicas en *N. benthamiana*. Igualmente los virus quiméricos derivados de PVX, denominados PVX-HCT, PVX-CP, PVX-GUS3' y PVX-p29, se obtuvieron mediante inoculación de plantas con transcritos de los correspondientes plásmidos.

#### 3.1.2 Mantenimiento de las plantas

Se emplearon plantas de *N. benthamiana* mantenidas en cámaras de ambiente controlado, a 22-25 °C, 60-75 % de humedad relativa y un fotoperiodo de 16 horas diarias de luz. Para la estimación de la infectividad de PPV se emplearon plantas de *Chenopodium foetidum* en las mismas condiciones.

#### 3.1.3 Transcripción *in vitro* de clones de PVX e inoculación de transcritos virales

Para la obtención de transcritos infectivos de PVX y de las quimeras derivadas de PVX, los plásmidos p402 (PVX), pPVX-HCT, pPVX-CP, pPVX-GUS3' y pPVX-p29 fueron linearizados con la enzima de restricción *SpeI*. El DNA digerido fue purificado mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol. Las reacciones

de transcripción se hicieron con 50-100 ng/μl de plásmido linearizado, tampón de transcripción (40 mM Tris HCl pH 8,0, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl, 10 mM DTT, 2 mM espermidina), 0,25 mM de ATP, CTP y UTP, 0,025 mM GTP, 0,5 mM m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G (análogo de CAP; Roche), 1 U/μl de RNasin (Promega) y 1 U/μl de T7 RNA polimerasa (Roche). Las reacciones fueron incubadas a 37°C durante 15 min para facilitar la incorporación del análogo de CAP. Tras ello se añadió 0,25 mM de GTP y se incubó otros 45-75 min a 37°C.

Para la inoculación de plantas de *N. benthamiana* con transcritos infectivos, se aplicaron 5 μl/hoja de la reacción de transcripción en dos hojas espolvoreadas con el abrasivo celite y se frotó suavemente con el dedo, empleando guantes. Tras unos minutos se lavaron las hojas con agua destilada y se devolvieron las plantas a las cámaras de ambiente controlado.

### **3.1.4 Inoculación de plantas con extractos de planta infectada**

Para la preparación de inóculos virales se recogieron hojas infectadas sistémicamente, con síntomas visibles y preferiblemente jóvenes y se trituraron en morteros en frío, en 5 volúmenes (ml/g de hoja) de tampón de inoculación (20 mM fosfato de sodio, pH 7,0), o en 10 volúmenes en el caso de las quimeras de PVX. Los extractos se clarificaron filtrándolos a través de Miracloth (Calbiochem), y se repartieron en alícuotas de un solo uso que se mantuvieron a -80 °C. En el caso de plantas infectadas con transcritos de quimeras de PVX se puso mayor énfasis en utilizar solo las primeras hojas sistémicas que mostraron síntomas, con el fin de reducir la probabilidad de obtener una población de virus delecionados, que es mayor a medida que prolifera la infección.

Las plantas se inocularon aplicando 10 μl de extracto por hoja, en dos hojas espolvoreadas con el abrasivo carborundo y frotando con el dedo, empleando guantes.

En el caso de plantas inoculadas con inóculo fresco de PPV 5.15, el inóculo se preparo en el momento de uso triturando hojas infectadas en 2 volúmenes de tampón de inoculación. El extracto se aplicó inmediatamente mojando el dedo en el extracto y frotando sobre dos hojas por planta espolvoreadas con carborundo.

En el caso de plantas previamente agroinfiltradas con pBI121 (Ver capítulo 3.6), se eliminaron de la planta los restos de las hojas agroinfiltradas y se inocularon las hojas inmediatamente superiores.

Para la co-inoculación de plantas con PPV y PVX en experimentos de sinergismo, se inoculó primeramente PPV en la mitad de dos hojas por planta, y al día siguiente PVX en las otras mitades de hoja.

Para la inoculación de PMMoV, se emplearon 10 μl por hoja de una preparación de virus purificado a 10 μg de partícula viral por ml (García-Luque *et al.*, 1990).

## **3.2. PLÁSMIDOS Y CEPAS BACTERIANAS**

pT3T7 (Roche) es un plásmido para clonaje en *Escherichia coli*. Confiere resistencia a ampicilina y tiene un sitio de clonaje múltiple flanqueado por promotores de transcripción *in vitro* T3 y T7.

pGEM-T Easy (Promega) es un plásmido para clonaje en *E. coli*. Confiere resistencia a ampicilina y tiene un sitio de clonaje múltiple flanqueado por promotores SP6 y T7. El plásmido viene linearizado y con extremos T protuberantes para el clonaje de productos de PCR.

p1HC5.15 (Martínez García, 2000) corresponde al plásmido de clonaje en *E. coli* pBluescript II KS, en el que se clonó la secuencia de PPV 5.15 comprendida entre las posiciones 986 y 2478 (Lain *et al.*, 1989), que incluye la secuencia HC-Pro y parte de la P1 y P3 flanqueantes.

pBI121 (Jefferson *et al.*, 1987) es un plásmido para expresión de genes en plantas, mediante agroinfiltración o transformación con *Agrobacterium tumefaciens*. Confiere resistencia a kanamicina en *E. coli* y en *A. tumefaciens*, y contiene un T-DNA que incluye un gen de resistencia a kanamicina en plantas (*nptII*) y el gen *gusA* (*UidA*) de *E. coli* (Jefferson *et al.*, 1986) que codifica para la proteína  $\beta$ -Glucuronidasa (GUS), bajo el control del promotor 35S de CaMV. El plásmido pBI/54-kDa es un derivado de pBI121 en el que se ha eliminado la secuencia *gusA* y se ha introducido la porción comprendida entre las posiciones 3411 y 4388 del genoma de PMMoV (Alonso *et al.*, 1991), que corresponde a parte del gen de la proteína 54-kDa. El plásmido pBI/IR-54 (Tenllado *et al.*, 2003) contiene dos porciones del fragmento 3411-4388 del genoma de PMMoV en posición sentido y antisentido (repetición invertida, IR), separadas por un gen de resistencia a fleomicina, y bajo el control del promotor 35S de manera que se produce un transcrito de RNA autocomplementario que forma una doble hebra. Los plásmidos pBI-HCT y pBI-HCNT (Tenllado *et al.*, 2003) se describen en el apartado 3.4.1.

pCAMBIA2300 es un plásmido para expresión de genes en plantas, mediante *A. tumefaciens*. Confiere resistencia a kanamicina en *E. coli* y en *A. tumefaciens*, y contiene un T-DNA que incluye un gen de resistencia a kanamicina en plantas y un sitio de clonaje múltiple. pCAMBIA1305.1 es básicamente igual que pCAMBIA2300 pero incluye un gen GUSplus y un gen de resistencia a higromicina en lugar de kanamicina. pEG5'PPV es un derivado del plásmido pCAMBIA2300 en el que se ha introducido la porción 5' de PPV 5.15 comprendida entre las posiciones 1 y 2919 que incluye la región 5' no traducible del virus, la secuencia codificadora de la proteína P1, la secuencia de HC-Pro y parte de la P3, todo ello bajo el control de un promotor 35S de CaMV. pCAM-p29 se describe en el apartado 3.5.1.

El plásmido p402 es una variante del plásmido pP2C2S (Chapman *et al.*, 1992; Baulcombe *et al.*, 1995). Confiere resistencia a ampicilina en *E. coli* y contiene el genoma completo de PVX al que se le ha duplicado el promotor del RNA subgenómico de la CP y se le ha añadido un sitio de clonaje múltiple, de manera que se pueden introducir secuencias exógenas que se expresan a través de la formación de un RNA subgenómico adicional. El plásmido contiene un promotor T7 a partir del cual se pueden producir transcritos infectivos. pPVX-HCT (González Jara, 2002) es un derivado de p402 en el que se ha introducido la secuencia codificadora de la proteína HC-Pro de PPV 5.15 suplementada con un codón de iniciación y un codón de terminación, de manera que expresa proteína HC-Pro. pPVX-CP incluye la secuencia codificadora de la proteína CP de PPV 5.15 con un codón de iniciación y un codón de terminación, de manera que expresa proteína CP. pPVX-GUS3' incluye la porción comprendida entre las posiciones 965 y 1804 del gen *gusA*. pPVX-p29 se describe en el apartado 3.5.2.

pLDST (Choi y Nuss, 1992) fue cedido por el Dr. D. Nuss (Center for Agricultural Biotechnology, University of Maryland, USA) y corresponde al vector de clonaje pUC19 en el que se ha insertado la secuencia completa del hypovirus CHV1-EP713.

pRTL2 (Restrepo *et al.*, 1990) es un plásmido intermedio para el clonaje de genes para expresión en planta. Es un derivado de pGEM al que se le ha introducido el promotor 35S de CaMV, la región 5' no traducible de TEV, un sitio de clonaje múltiple para la introducción de secuencias a expresar en planta y el terminador de la transcripción 35S de CaMV.

pSLJ75515 (Jones *et al.*, 1992) es un plásmido para expresión de genes en plantas. Confiere resistencia a tetraciclina en *E. coli* y *A. tumefaciens* y contiene un T-DNA con un gen BAR de resistencia a bialafos/fosfinotricina y un sitio de clonaje múltiple. pSLJ-GFP (Johansen y Carrington, 2001) es un derivado de pSLJ75515, al que se le ha introducido el casete de expresión en plantas de pRTL2 portando la secuencia codificadora de la proteína GFP (variedad smGFP).

Para los procedimientos de clonaje se emplearon las cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  o DH10B. Para la transformación de plantas y expresión transitoria se empleó la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*, excepto para la construcción pSLJ-GFP que está en la cepa GV2260. Ambas cepas de *Agrobacterium* contienen resistencia a Rifampicina.

### 3.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Las reacciones típicas de amplificación de DNA mediante PCR incluyeron 10 mM Tris HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4  $\mu$ M de cada cebador, 0,25 mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 0,05 U/ $\mu$ l de *Taq* DNA-polimerasa (Perkin Elmer), 1-5 ng de DNA molde (plásmidos) ó 200-500 ng (DNA genómico), en un volumen final de entre 15 y 50  $\mu$ l según aplicaciones. El programa típico de amplificación fue 1 ciclo de 3 min a 94°C, 30 ciclos con 30 seg a 94°C, 30 seg a 52-62 °C dependiendo de los cebadores y 1 min a 72°C por cada kilobase de tamaño del producto esperado, y por último 1 ciclo de 5 min a 72°C.

Los productos de PCR y los de otras manipulaciones de DNA, se analizaron en geles de agarosa al 1% en TBE 0,5x (45 mM Tris-borato pH 8,3, 1 mM EDTA) con 0,25  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio (Sambrook *et al.*, 1989).

### 3.4. TRANSFORMACIÓN DE *N. BENTHAMIANA* CON CONSTRUCCIONES DERIVADAS DEL GEN HC-PRO DE PPV

#### 3.4.1 Clonaje del gen HC-Pro para transformación de plantas

Se amplificó mediante PCR la secuencia correspondiente al gen HC-Pro de PPV 5.15 comprendida entre las posiciones 1068 y 2444 (Laín *et al.*, 1989), utilizando el plásmido p1HC5.15 como molde. Para la versión traducible de HC-Pro se emplearon los cebadores HCTup (AAATCTAGAATG TACTCTGACCCAGGC; posición 1068 de secuencia de PPV) que incluye una diana *Xba*I y un codón de iniciación ATG en fase, y HCTdown (GAAGGATCCTTATCCAACCAGGTATGT; complementario a posición 2444 de PPV) que incluye una diana *Bam*HI y un codón de terminación TAA. Para la versión no traducible se emplearon el cebador HCNTup (AAATCTAGATGATAGTCTGACCCAGGC; posición 1068 de PPV) que incluye una diana *Xba*I y dos codones de terminación en fase, y el HCTdown. Los productos de

PCR se digirieron con las enzimas de restricción *Xba*I y *Bam*HI y se clonaron en el plásmido pT3T7 digerido con las mismas enzimas. Los insertos en pT3T7-HCT y pT3T7-HCNT se secuenciaron con la ayuda de cebadores complementarios a los promotores T3 y T7 y a zonas internas de HC-Pro, para comprobar la incorporación de los codones de iniciación o terminación y la ausencia de cambios no deseados. Tras esto los clones en pT3T7 se digirieron con *Xba*I y *Bam*HI y los insertos HCT y HCNT se clonaron en el plásmido pBI121 digerido con *Xba*I y *Bam*HI. Las construcciones resultantes se denominaron pBI-HCT (HC-Pro traducible) y pBI-HCNT (HC-Pro no traducible). Su diseño permite la expresión de mRNAs que comprenden la secuencia HC-Pro seguida de la secuencia *gusA*, bajo el control del promotor 35S de CaMV. Los plásmidos pBI121, pBI-HCT y pBI-HCNT se introdujeron en *A. tumefaciens* LBA4404 mediante transformación por choque térmico.

### 3.4.2 Transformación de *N. benthamiana*

Se transformaron explantes de hoja de *N. benthamiana* según el procedimiento descrito por Horsch *et al.* (1985). Los explantes, procedentes de plantas crecidas *in vitro* (Ver capítulo 3.4.4), se precultivaron durante 2 días a 22-24 °C y 16 horas diarias de luz, en placas con medio Murashige-Skoog 1x (MS basal salt mixture; Sigma) pH 5,7 suplementado con vitaminas MS (MS vitamins; Sigma) (Murashige y Skoog, 1962), 3% de sacarosa, 1 mg/l de 6-benzilaminopurina, 0,1 mg/l de ácido  $\alpha$ -naftalenacético y 0,8% de agar bacteriológico. Para la transformación, los explantes se sumergieron durante 15-20 min en una solución de *A. tumefaciens* portando la construcción de interés, a aproximadamente  $5 \times 10^8$  células/ml en MS 1x. Los explantes se secaron brevemente sobre papel estéril para retirar el exceso de solución de *Agrobacterium* y se incubaron durante 2 días en placas con medio igual al de precultivo. Tras ello los explantes se pasaron a placas con medio de selección, que es igual que el de precultivo pero incluye 100 mg/l de kanamicina (Sigma) para seleccionar células transformadas y 300-500 mg/l de cefotaxima para detener la proliferación de *Agrobacterium*. Los tallos surgidos a partir de los callos transformados se pasaron a medio de enraizamiento conteniendo MS 0,5x (pH 5,7), vitaminas MS, 3% de sacarosa, 0,8% de agar bacteriológico, 0,5 mg/l de ácido indolbutírico, 25 mg/l de kanamicina (Sigma) y 300-500 mg/l de cefotaxima. Tras 3-4 semanas las plántulas con raíces desarrolladas se pasaron a tierra, donde se mantuvieron bajo plástico aproximadamente 2 semanas. Tras 8-10 semanas se obtuvieron semillas de las plantas regeneradas ( $R_0$ ). De la germinación de estas semillas se obtuvieron las plantas ( $R_1$ ) con las que se hicieron gran parte de los experimentos.

### 3.4.3 Análisis de la presencia del transgén

Para comprobar la presencia de los transgenes en plantas transformadas con pBI121, pBI-HCT o pBI-HCNT, se extrajo DNA total de plantas  $R_0$  según descrito (McGarvey y Kaper, 1991). Se trituraron 30-50 mg de hoja en  $N_2$  líquido y a continuación en tampón de extracción (1% CTAB, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,7 M NaCl, 10 mM EDTA, 0,5% PVP, 0,1%  $\beta$ -mercaptoetanol). Tras clarificar el homogeneizado mediante centrifugación, se precipitó el DNA total del sobrenadante con isopropanol. Tras resuspender el precipitado en agua se incubó con RNasa A para eliminar restos de RNA. Se utilizaron 200-500 ng de DNA total como molde de PCR. Para la detección del transgén HCT se usaron los cebadores HCTup y

HCTdown, y para la detección del HCNT se usaron HCNTup y HCTdown. Para la comprobación de las plantas transformadas con pBI121 se usaron cebadores específicos para la secuencia *gusA*.

### **3.4.4 Germinación de semillas de plantas transgénicas**

Las semillas se germinaron rutinariamente *in vitro* bajo selección en kanamicina. Para ello las semillas se esterilizaron tratándolas 5 min en etanol 70% y 20 min en hipoclorito de sodio (lejía comercial) 1-3% más 0,1% de Tween-20. Las semillas se lavaron 5-6 veces en agua estéril y se pusieron en botes Magenta (Sigma) con medio MS 0,5x (MS basal salt mixture; Sigma) pH 5,7 suplementado con vitaminas MS (MS vitamins; Sigma), 1% de sacarosa, 0,6% de agar bacteriológico y 100 mg/l de kanamicina. Los botes con semillas se mantuvieron 3-5 días a 4 °C y a continuación 2-3 semanas a 22-24 °C y 16 horas diarias de luz. Las plántulas resistentes a kanamicina se pasaron a tierra donde crecieron 2-3 semanas más.

Se utilizó la prueba  $\chi^2$  para analizar la probabilidad de ajuste entre el número observado de semillas resistentes o susceptibles a kanamicina y el número esperado en caso de segregaciones mendelianas. Se aceptaron que las diferencias entre los números observados y los esperados fueron por azar cuando la probabilidad asociada al resultado de  $\chi^2$  con 1 grado de libertad fue mayor de 0,05.

En el caso de utilizar poblaciones de plantas no seleccionadas en kanamicina, las semillas fueron germinadas en tierra y tras 2 semanas las plántulas se pasaron a macetas individuales donde se dejaron crecer 2-3 semanas más.

## **3.5. CLONAJE DEL GEN DE LA PROTEÍNA P29 DE CHV1**

### **3.5.1 Clonaje de p29 para expresión transitoria en plantas**

Se amplificó mediante PCR (empleando la DNA polimerasa High Fidelity; Roche) la secuencia correspondiente al gen p29 del virus CHV1 utilizando como molde el plásmido pLDST, y los cebadores p29NcoI5' (CATGCCATGGCTCAATTAAGAAAAC; posición 496 de CHV1) que introduce una diana NcoI solapante con el codón de iniciación de p29 y p29XmaI3' (TCCCCCGGGTTAGCCAATCCGGGCAAG; posición 1239 de CHV1) que introduce una diana XmaI y un codón de terminación TAA. El producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción NcoI y XmaI y se clonó en el plásmido pRTL2 digerido con las mismas enzimas. Se comprobó mediante secuenciación la ausencia de cambios no deseados en la secuencia del gen p29 y su correcta integración en pRTL2. El plásmido resultante se digirió con PstI y el casete de expresión que incluye el promotor 35S, la porción 5' no traducible de TEV, la secuencia p29 y el terminador, se clonó en el plásmido pCAMBIA1305.1 digerido con PstI. El plásmido resultante, pCAM-p29, se introdujo en *A. tumefaciens* LBA4404 mediante transformación por choque térmico.

### **3.5.2 Clonaje de p29 para expresión a partir del vector PVX**

Se amplificó mediante PCR (con DNA polimerasa High Fidelity; Roche) la secuencia del gen p29 de CHV1, usando el plásmido pLDST como molde, y los cebadores p29EagI5' (AACGGCCGATGGCTCAATTAAGAAAAC) que introduce la diana EagI y p29XmaI3' (TCCCCCGGGTTAGCCAATCCGGGCAAG) que introduce la diana XmaI y el codón de terminación TAA. El producto resultante se digirió con

las enzimas *EagI* y *XmaI* y se clonó en el plásmido p402 digerido con las mismas enzimas. Se comprobó mediante secuenciación la ausencia de cambios no deseados y la correcta integración en p402. El plásmido resultante pPVX-p29 permite producir transcritos infectivos correspondientes al virus quimérico PVX-p29.

### **3.6. EXPRESIÓN TRANSITORIA DE GENES EN PLANTAS MEDIANTE AGROINFILTRACIÓN**

Se utilizaron cultivos de *A. tumefaciens* portando los plásmidos de interés, que se crecieron en matraces o tubos de 50 ml en medio LB suplementado con antibióticos, a 28 °C con buena agitación y durante 20-24 horas. En caso de emplear volúmenes de cultivo mayores de 20 ml, se crecieron precultivos de 3-5 ml con los que se inoculó el volumen final de cultivo. Los cultivos se centrifugaron y el precipitado de bacterias se resuspendió en medio de agroinfiltración, que contiene 10 mM de tampón MES pH 5,6, 10 mM de MgCl<sub>2</sub> y 0,15 mM de acetosiringona, hasta una D.O.<sub>600</sub>= 1,0. La suspensión de bacterias se mantuvo durante 3-5 horas a 20-25 °C sin agitación. En caso de agroinfiltrar con varias construcciones, las distintas suspensiones de *Agrobacterium* se mezclaron a partes iguales. En el caso de la construcción pBI/IR-54 se infiltró a una D.O.<sub>600</sub>= 0,4 (Tenllado *et al.*, 2003). Las suspensiones de *Agrobacterium* se infiltraron por el envés de hojas de *N. benthamiana* utilizando una jeringa de 1 ml, sin aguja, ejerciendo una ligera presión con la punta sobre la hoja.

### **3.7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS**

#### **3.7.1 Análisis de acumulación de PPV mediante ELISA**

Se determinó la acumulación de proteína CP de PPV mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA), empleando el kit Realisa-PPV (Real, Durviz). Las placas se tapizaron primero con una dilución 1/100 de inmunoglobulinas policlonales de conejo anti-PPV en tampón carbonato (pH 9,6) 4 horas a 37 °C. A continuación se trituraron 20-30 mg de hoja en 320 µl de tampón de extracción PBS (15 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4, 150 mM NaCl) más 0,2% de DIECA, 2% de PVP-10. El homogeneizado se clarificó mediante centrifugación y el sobrenadante se aplicó sobre los pocillos tapizados, dejándolo 16 horas a 4 °C. Tras ello se lavó 3 veces con PBST (PBS más 0,05% de Tween-20) y se incubó 2 horas a 37 °C con una dilución 1/1000 de anticuerpo monoclonal anti-PPV en PBS más 0,5% de leche en polvo desnatada. A continuación se lavó 3 veces en PBST y se incubó 2 horas a 37 °C con una dilución 1/1000 de inmunoglobulinas anti-ratón conjugadas con fosfatasa alcalina en PBS más 0,5% de leche. Tras lavar 3 veces en PBST se añadió una solución de p-nitrofenilfosfato a 1 mg/ml en tampón sustrato (10% dietanolamina, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,8). El resultado de la reacción se leyó en un lector de placas EAR 400 SLT (Lab Instruments) a 405 nm.

#### **3.7.2 Análisis de la expresión de proteína GUS**

La determinación de actividad GUS en plantas transgénicas se realizó 2 días después de la agroinfiltración con pBI121, utilizando el kit GUS-light (Tropix). Para ello se trituraron 50-100 mg de tejido agroinfiltrado en 2 volúmenes de tampón de lisis (50 mM fosfato de sodio pH 7,0, 10 mM EDTA, 0,1% laurilsarcosina, 0,1% Triton X-100). El homogeneizado se clarificó mediante centrifugación, se añadieron 2 µl del

sobrenadante a 30  $\mu$ l de tampón de reacción (100 mM fosfato de sodio pH 7,0, 10 mM EDTA, 1% Glucuron) y se incubó a 20-25 °C durante 5-10 min. Sobre esto se añadieron 50  $\mu$ l de tampón acelerador y se midió la quimioluminiscencia en un luminómetro (Turner Designs TD-20/20). En cada procedimiento se midieron varias diluciones de una preparación de  $\beta$ -Glucuronidasa purificada (Roche) para construir una recta patrón donde referir los valores obtenidos de las muestras y poder comparar distintos experimentos.

### **3.7.3 Análisis de la expresión de proteína GFP**

La determinación de la acumulación de proteína GFP se hizo mediante exploración directa del tejido agroinfiltrado con una lámpara ultravioleta Black Ray B 100 AP (UVP). Las hojas fueron fotografiadas a 6 días después de la agroinfiltración, utilizando un transiluminador ultravioleta y una cámara digital sobre la que se montó un filtro amarillo.

### **3.7.4 Análisis de acumulación de proteínas mediante Western blot**

Para la detección de proteína HC-Pro expresada en plantas transgénicas, se trituraron muestras de 100 mg de hoja en nitrógeno líquido y a continuación en 100  $\mu$ l de tampón de extracción (200 mM Tris-Cl pH 6,8, 5% SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol, 10% glicerol y 0.005% de azul de bromofenol). Para la detección de HC-Pro expresado transitoriamente mediante agroinfiltración, se emplearon muestras de 100 mg de hoja a 8 días después de la agroinfiltración, que se trataron de la misma manera. Las muestras homogeneizadas se hirvieron durante 5 min y se clarificaron mediante centrifugación. Se cargaron 15-20  $\mu$ l del homogeneizado en geles de poliacrilamida al 10% (acrilamida/bisacrilamida en proporción 29,2:0,8 respectivamente) y SDS, empleando el soporte Mini-Protean II (Bio-Rad). La electroforesis se llevó a cabo en tampón Tris-glicina-SDS (25 mM Tris pH 8,3, 190 mM glicina y 0,1% SDS) durante aproximadamente 1 hora aplicando una corriente de 20 mA por cada soporte. Como marcador de peso molecular se usó la mezcla de proteínas patrón SeeBlue™ (Novex). Para la detección de las proteínas CP de PPV 3.3, PVY o TEV, se trituraron 30-40 mg de hoja infectada en 100  $\mu$ l de tampón de extracción y se cargaron 10  $\mu$ l en geles de poliacrilamida al 12%.

Las proteínas separadas mediante electroforesis se transfirieron a membranas de PVDF (fluoruro de polivinilideno) mediante el sistema de electrotransferencia Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad), empleando tampón Tris-glicina-metanol (25 mM Tris pH 8,3, 190 mM glicina y 20% metanol) y una corriente de 250 mA durante 1 hora.

La carga de cantidades similares de proteína total en cada muestra se comprobó mediante tinción de las proteínas del gel después de la transferencia. Los geles se tiñeron en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0,25%, con 45% de metanol y 10% de ácido acético y posteriormente se eliminó el exceso de colorante con una solución desteñidora de agua, metanol y ácido acético, en proporciones 7:2:1 respectivamente.

Tras la transferencia, las membranas se incubaron 1-2 horas en tampón PBST (15 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20) con 5% de leche desnatada en polvo. A continuación se incubaron toda la noche con un anticuerpo primario diluido en PBST 5% de leche a 4 °C. Las membranas se lavaron 3-4 veces en PBST y se incubaron durante 2-3 horas con un anticuerpo secundario conjugado

con peroxidasa diluido en PBS 5% de leche, y a continuación se lavaron de nuevo 3-4 veces en PBST.

Para la detección de HC-Pro de PPV se empleó un anticuerpo policlonal producido en el laboratorio (Martínez García, 2000) específico de conejo diluido 1/2000 como anticuerpo primario y como secundario un anticuerpo monoclonal de cabra específico frente a inmunoglobulinas de conejo conjugado con peroxidasa (GARPO), diluido 1/15000. La detección se realizó con el sistema ECL (Amersham).

Para la detección de las proteínas CP se utilizó en todos los pasos tampón PBS (sin Tween-20) y se emplearon los siguientes anticuerpos primarios: un anticuerpo policlonal de conejo específico frente a la CP de TEV diluido 1/1000 (cedido por el Dr. T. Pirone); un anticuerpo policlonal de conejo específico frente a la CP de PVY diluido 1/1000 (Llave *et al.*, 1999); y un anticuerpo policlonal de conejo frente a la CP de PPV (anticuerpo A1 del kit Realisa-PPV; Real, Durviz) diluido 1/250. Como anticuerpo secundario se empleó GARPO (anticuerpo de cabra anti-conejo marcado con peroxidasa) diluido 1/1000. La detección se realizó con 0,3 mg/ml de 4-cloronaftol, 0,01 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PBS.

### **3.8. ANÁLISIS DE RNA**

#### **3.8.1 Extracción de RNA**

Para el análisis de RNA viral de PPV, se extrajo RNA total con hidrocloreuro de guanidina (Logemann *et al.*, 1987). Para ello, el material vegetal (0,4-0,8 g) se trituró en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, evitando su descongelación. Se añadieron 2 volúmenes de tampón de extracción (8 M de hidrocloreuro de guanidina, 20 mM de MES pH 7,0 y 20 mM EDTA) y 1 volumen de fenol-cloroformo. El homogeneizado se clarificó mediante centrifugación y el RNA total se recuperó de la fase acuosa mediante precipitación con 0,7 volúmenes de etanol 100% y 0,2 de ácido acético 1 M. El precipitado de RNA se dejó secar y se resuspendió en agua estéril.

Para el análisis de mRNA y RNA viral de PVX se empleó el RNeasy Plant Mini kit (Qiagen), que consiste en triturado del material vegetal (0,1 g) en nitrógeno líquido, extracción con hidrocloreuro de guanidina y recuperación del RNA en columnas de afinidad.

Para el análisis de siRNAs se trituró el material vegetal (1,5-2 g) en nitrógeno líquido, se añadieron 5 volúmenes de Trizol (Invitrogen) y 1 volumen de cloroformo. El homogeneizado se clarificó mediante centrifugación y el RNA total se recuperó de la fase acuosa mediante precipitación con 1 volumen de isopropanol. El precipitado de RNA se dejó secar y se resuspendió en agua estéril. A partir del RNA total se purificó RNA de bajo peso molecular empleando el DNA/RNA Midi kit (Qiagen). El RNA total (0,5-1 mg) se mezcló con 1 ml de tampón QRL1 y se calentó a 65 °C 5 min. Se añadieron 9 ml de QRV2 y se aplicaron sobre la columna de afinidad. La columna se lavó con el tampón QRW y los RNAs de bajo peso molecular se eluyeron con QRW2. El RNA eluido se precipitó con 1 volumen de isopropanol, el precipitado se dejó secar y se resuspendió en agua estéril.

### **3.8.2 Análisis de RNA mediante Northern blot**

#### **3.8.2.1. Análisis de RNA viral y mRNA**

Para el análisis de RNA viral y mRNA transgénico se cargaron 2 ó 20 µg de RNA total, respectivamente, en geles desnaturalizantes de agarosa 1%, tampón MOPS 1x (50 mM de MOPS pH 7,0, 0,4 mM de EDTA) y 6% de formaldehído. Las muestras de RNA se prepararon en tampón MOPS 1x, 6% de formaldehído, 50% de formamida, 0,1 volúmenes de tampón de carga (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilencianol y 50% de glicerol) y 0,05 µg/µl de bromuro de etidio, calentándolas 10 min a 70 °C. La electroforesis se hizo a 100-120 V durante 2-3 horas en tampón conteniendo MOPS 1x y 6% de formaldehído. En algunos geles se empleó el marcador de peso molecular RNA millenium (Ambion).

Tras la electroforesis se transfirió el RNA a membranas de nylon cargado positivamente (Roche), mediante transferencia por capilaridad o mediante transferencia por vacío con el aparato VacuGene XL (Pharmacia biotech). En ambos casos se empleó tampón SSC 20x (3 M NaCl y 0,3 M Citrato de Sodio pH 7,0). Las membranas se irradiaron con luz ultravioleta en un aparato Stratalinker 1800 (Stratagene) a 1200 µ-julios x 100, para fijar el RNA.

Las membranas se prehibridaron a 68 °C durante 1-2 horas en horno de hibridación, en 5-10 ml de tampón de hibridación (50% de formamida, 5x SSC, 0,1% de laurilsarcosina, 0,02% de SDS y 2% de agente bloqueante de Roche). A continuación se hibridaron a 68 °C 16-20 horas en 5-7 ml de tampón de hibridación con 10-50 ng/ml de sonda de RNA marcada con digoxigenina (Roche). Las sondas se prepararon antes de su uso desnaturalizándolas a 95 °C durante 5-10 min. A continuación las membranas se lavaron a 68 °C 2 veces de 10 min con 2x SSC, 0,1% SDS y 2 veces de 30 min con 0,1x SSC, 0,1% SDS. Las membranas se bloquearon 30-60 min en tampón ácido maleico (0,1 M de ácido maleico, 0,15 M de NaCl y NaOH hasta pH 7,5) con 1% de agente bloqueante (Roche). A continuación se añadió anticuerpo antidigoxigenina marcado con fosfatasa alcalina (Roche) a 1/10000 y se incubó 30 min. Las membranas se lavaron 4 veces de 15-20 min en tampón ácido maleico con 0,3% de Tween-20 y se revelaron con sustrato CSPD (Roche) diluido 1/100 en 0,1 M Tris-Cl pH 9,5 y 0,1 M NaCl. Las membranas se expusieron a películas Kodak durante tiempos entre 1 min y 120 min.

#### **3.8.2.2. Análisis de siRNA**

Se cargaron 20 µg de RNA de bajo peso molecular en geles de poliacrilamida al 15% (acrilamida/bisacrilamida en proporción 37,5:1) con 7 M de urea y 0,5x de TBE. Las muestras de RNA se calentaron previamente a 95 °C en 40% de formamida y 0,1 volúmenes de tampón de carga. La electroforesis se hizo en TBE 0,5x a 180 V durante 2-3 horas. Los geles se tiñeron durante 5-10 min en TBE 0,5x con 1 µg/ml de bromuro de etidio para fotografiar la posición de los marcadores de peso molecular. Como marcadores se emplearon oligonucleótidos de DNA de 25 y 20 nucleótidos.

Se transfirió el RNA a membranas de nylon cargado positivamente (Roche) mediante electrotransferencia con el aparato Trans-blot Semi-dry Transfer Cell (Bio-Rad), en tampón TBE 0,5x. Las membranas se irradiaron con ultravioleta en un aparato Stratalinker 1800 (Stratagene) para fijar el RNA.

Las membranas se prehibridaron a 38 °C en tampón PerfectHyb plus (Sigma) durante 1-2 horas y a continuación se hibridaron durante 16-20 horas en estas condiciones con  $1-3 \times 10^6$  cpm/ml de sonda de DNA marcada con  $^{32}\text{P}$ -dCTP. Las membranas se lavaron para eliminar el exceso de sonda a 50 °C 2 veces de 20 min en 2x SSC, 0,1% SDS y otras 2 veces de 20 min en 0,1x SSC, 0,1% SDS. Las membranas se expusieron durante 24-48 horas a películas fotográficas utilizando pantallas intensificadoras a -80 °C.

### 3.8.2.3. Sondas empleadas

Las sondas de RNA marcadas con digoxigenina (sondas dig), se sintetizaron mediante transcripción *in vitro*. Las reacciones típicas incluyeron 1 µg de plásmido linearizado, tampón de transcripción (40 mM Tris HCl pH 8,0, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl, 10 mM DTT, 2 mM espermidina), 0,5 mM de ATP, CTP y GTP, 0,33 mM de UTP y 0,16 mM de DIG-11-UTP, 1,5 U/µl de RNasin (Promega) y 1-2 U/µl de RNA polimerasa (T3, T7 o SP6).

Para la detección de RNA viral de PPV se usó una sonda dig de RNA complementaria a la secuencia HC-Pro, que se sintetizó mediante transcripción con T7 de pT3T7-HCT linearizado con *Xba*I.

Para la detección de PVX y las quimeras derivadas de PVX se empleó una sonda dig de RNA complementaria al gen de la proteína CP, que se sintetizó mediante transcripción T3 de p402 linearizado con *Stu*I. Para la detección del virus quimérico PVX-HCT también se empleó la sonda complementaria a HC-Pro de PPV citada en el párrafo anterior. Para la detección de PVX-p29 también se empleó una sonda dig de RNA complementaria al gen p29, sintetizada mediante transcripción SP6 de pGEM-p29 linearizado con *Cla*I.

Para la detección de mRNA del transgén HC-Pro y de mRNA del gen *gusA*, se empleó una sonda dig de RNA complementaria a la secuencia *gusA*, que se sintetizó mediante transcripción SP6 de pGG153GUS (Simón-Buela *et al.*, 1997) linearizado con *Nco*I. El transcrito resultante contiene la secuencia *gusA* más una porción de aproximadamente 400 nt del extremo 3' de PPV. Ocasionalmente se empleó una sonda dig de RNA correspondiente a la porción 5' del gen *gusA* (posiciones 13 a 860), sintetizada mediante transcripción SP6 de pGEM-GUS5' linearizado con *Sph*I.

Para la detección de mRNA del gen de la proteína 54-kDa de PMMoV, se empleó una sonda dig de RNA complementaria (posición 3411 a la 4388 de PMMoV), sintetizada mediante transcripción T7 de pT3T7/54kDa (Tenllado *et al.*, 1995) linearizado con *Sal*I.

Para la detección del rRNA 18S, las membranas ya hibridadas se rehibridaron con una sonda dig de RNA complementaria al rRNA 18S, sintetizada mediante transcripción T7 de pBKS-18SRNA (Ruiz-García *et al.*, 1997) linearizado con *Hind*III.

Para la detección de siRNA derivados del transgén HC-Pro, se utilizó una sonda de DNA correspondiente a la secuencia *gusA*, sintetizada mediante polimerización con cebadores aleatorios y marcada con  $^{32}\text{P}$ -dCTP. Las reacciones de síntesis de sonda incluyeron 25-50 ng de un fragmento de DNA correspondiente al gen *gusA*, que se desnaturaliza a 95 °C antes de añadir los demás componentes, 50 mM Tris-Cl pH 7,4, 1,7 mM de acetato de magnesio, hexanucleótidos aleatorios (Roche), 0,05 mM de dATP, dGTP y dTTP, 50 µCi  $^{32}\text{P}$ -dCTP y 5 unidades de DNA polimerasa

Klenow (exo -) (NEbiolabs) en 20 µl de volumen final. El producto de las reacciones se purificó en columnas Micro Bio-Spin P-30 (Bio-Rad) para eliminar el <sup>32</sup>P-dCTP no incorporado.

### **3.8.3 Análisis de RNA mediante RT-PCR**

Para la detección de PPV las reacciones de retrotranscripción (RT) se realizaron empleando 1 µg de RNA total como molde, 50 mM Tris HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT y 0,5 mM espermidina, 0,4 mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 1 µM de cebador GTCGACATTGGACTCCACTTG (posición 9199 de la secuencia de PPV), 1 U/µl de RNasin y 0,15 U/µl de AMV transcriptasa reversa (Promega), durante 2 horas a 43 °C, en un volumen final de 20 µl. Para la PCR se emplearon 3 µl de la reacción RT como molde y los cebadores CTGCAGTCACGTCAGCAACAAC (posición 8722 de la secuencia de PPV) y GTCGACATTGGACTCCACTTG (posición 9199 de la secuencia de PPV) que amplifican una porción de 490 nt correspondiente al gen de la CP, en un volumen final de 50 µl y con el resto de componentes tal como se describe en el apartado 3.3

Para la detección de mRNAs expresados transitoriamente correspondientes a la p29 de CHV1 y al HC-Pro de PPV, las preparaciones de RNA extraídas con el RNeasy Plant Mini kit se trataron con DNasa I en tampón 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>. Las reacciones de retrotranscripción se realizaron con 0,1 µg de RNA tratado y los cebadores p29Xmal3' para p29 o HCTdown para HC-Pro (apartados 3.5.1 y 3.4.1). Las reacciones de PCR se realizaron con los cebadores p29Nco15' y p29Xmal3' para p29, y con los cebadores HCTup y HCTdown para HC-Pro.

## **3.9. ANÁLISIS DE DNA GENÓMICO**

### **3.9.1 Extracción de DNA**

Para el análisis del DNA genómico mediante Southern blot, se trituraron 1,5-2 g de tejido vegetal en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y evitando su descongelación. Se añadieron 6 ml de tampón de extracción (100 mM de Tris HCl pH 8,0, 2,5% de CTAB, 1,4 M de NaCl, 0,2% de β-mercaptoetanol, 1% de PVP-10 y 20 mM de EDTA) precalentado a 60 °C y se incubó el homogeneizado 30 min a esta temperatura. Se añadió 3 ml de cloroformo y se centrifugó 30 min, dos veces, hasta obtener una fase acuosa translúcida. Se precipitó el ácido nucleico con 4 ml de isopropanol y se centrifugó brevemente. El precipitado se dejó toda la noche en 76% de etanol y 10 mM de acetato de amonio, tras lo cual se centrifugó y se dejó secar brevemente. Se resuspendió en 3 ml de TE (10 mM Tris HCl pH 7,4 y 1 mM de EDTA) con 3 mg/ml de RNasaA, donde se dejó durante 1-2 horas y se precipitó el DNA con 2 ml de acetato de amonio 5 M pH 7,7 y 5 ml de etanol 100%. Tras centrifugar, el precipitado se lavó con etanol 70%, se dejó secar al aire y se resuspendió en 200-300 µl de tampón TE.

### **3.9.2 Digestión del DNA**

Se digirieron 10 µg de DNA genómico con 150 U de *Bam*HI, en tampón de digestión (10 mM de Tris HCl pH 7,9, 150 mM de NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de DTT y 0,1 mg/ml de BSA) a 37 °C 16-20 horas, en un volumen de 100 µl.

Para la preparación de un control de digestión en preparaciones de DNA genómico (Ver capítulo 4.4.2), se digirió el plásmido pBI-HCT con *EcoRI* durante 16-20 horas y se desactivó *EcoRI* 20 min a 65 °C. Se añadió plásmido pBI-HCT linearizado con *EcoRI* a una preparación de DNA genómico de planta y se digirió con *BamHI*. El resultado de la digestión de pBI-HCT en la preparación de DNA genómico se observó mediante Southern blot.

### **3.9.3 Análisis del DNA mediante Southern blot**

Las preparaciones de DNA digerido se redujeron hasta 30 µl mediante precipitación etanólica o desecado al vacío en SpeedVac, y se cargaron en geles de TBE con 1% de agarosa y 0,2 µg/ml de bromuro de etidio. La electroforesis se llevó a cabo durante 16-20 horas a 60-70 V en tampón TBE 0,5x.

Los geles se fotografiaron con una regla a lo largo para situar la posición de los marcadores de peso molecular. Como marcadores se utilizaron DNA de fago λ digerido con *HindIII* y la mezcla de DNA comercial 1kb ladder (NEbiolabs). A continuación los geles se trataron 30 min con 0,25 M de HCl para fragmentar parcialmente el DNA, luego dos veces durante 20 min con 1,5 M NaCl y 0,5 M NaOH para desnaturalizar las dobles hebras de DNA y finalmente dos veces de 20 min con 1,5 M NaCl y 0,5 M de Tris HCl pH 7,0 para neutralizar el pH del gel. Tras ello el DNA de los geles se transfirió a membranas de nylon cargadas positivamente utilizando el aparato VacuGene XL y tampón SSC 20x (3 M NaCl y 0,3 M citrato de sodio pH 7,0). Las membranas se irradiaron con ultravioleta en un Stratalinker (Stratagene) para fijar el DNA.

Las membranas se prehibridaron 2 horas a 65 °C en tampón PerfectHyb Plus suplementado con 0,1 mg/ml de DNA de testículo de salmón. A continuación se hibridaron durante 16-20 horas en las mismas condiciones con  $1-3 \times 10^6$  cpm/ml de sonda de DNA marcada con  $^{32}\text{P}$ -dCTP, correspondiente a la secuencia *gusA*. Las sondas se sintetizaron mediante polimerización con cebadores aleatorios como se describe en el apartado 3.8.2.3. Tras ello las membranas se lavaron para eliminar el exceso de sonda a 65 °C 2 veces de 20 min en 2x SSC, 0,1% SDS y otras 2 veces de 20 min en 0,1x SSC, 0,1% SDS. Las membranas se expusieron durante 1-5 días a películas fotográficas utilizando pantallas intensificadoras a -80 °C.



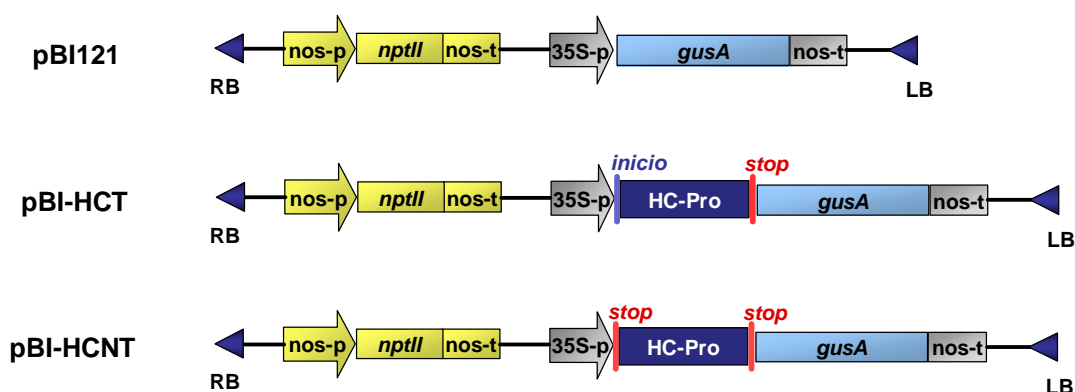
## ***4. RESULTADOS***



#### 4.1. TRANSFORMACIÓN DE *NICOTIANA BENTHAMIANA* CON CONSTRUCCIONES TRADUCIBLE (HCT) Y NO TRADUCIBLE (HCN) DEL GEN HC-PRO DE PPV 5.15

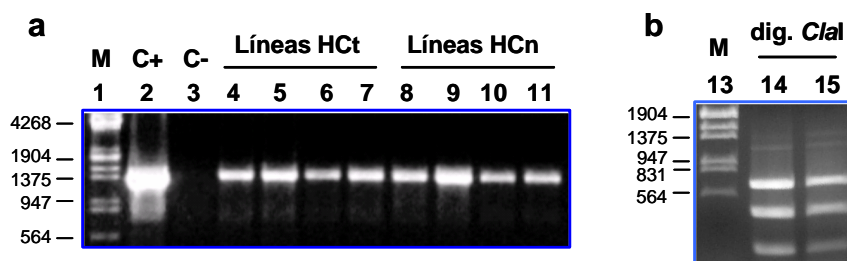
La estrategia de expresión génica de los potyvirus consiste en la producción de una poliproteína, que se procesa en diversos puntos por la acción de actividades proteasa, para dar como resultado las proteínas funcionales del virus (Figura 1.2). Para expresar aisladamente en plantas la proteína HC-Pro de PPV, es necesario añadir a la secuencia codificante del gen codones de iniciación y de terminación. Para la obtención de la construcción denominada HC-Pro traducible (HCT), se añadieron, mediante PCR, un codón de iniciación ATG al comienzo de la secuencia codificante del gen HC-Pro y un codón de terminación TAA al final. Este producto se introdujo en el vector de transformación de plantas pBI121, bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y por delante de la secuencia codificadora del gen *gusA*. Esta construcción se denominó pBI-HCT (Figura 4.1), y esta diseñada para producir un mRNA que comprende la secuencia HC-Pro más la secuencia *gusA*, permitiendo la traducción de la proteína HC-Pro.

Para la obtención de la construcción HC-Pro no traducible (HCn), se añadieron mediante PCR dos codones de terminación TGA-TAG al comienzo de la secuencia codificante del gen HC-Pro e igualmente un codón de terminación TAA al final. Al igual que en la anterior construcción, este producto se introdujo en pBI121 entre el promotor 35S y la secuencia *gusA*. La construcción resultante se denominó pBI-HCNT (Figura 4.1). Su diseño permite la expresión de un mRNA que comprende la secuencia HC-Pro más la secuencia *gusA*, pero sin embargo no permite la traducción de la proteína HC-Pro.



**Figura 4.1.** Esquema de las construcciones empleadas para transformar *N. benthamiana*. pBI121 contiene un gen neomicina fosfotransferasa (*nptII*) que confiere resistencia a kanamicina en plantas ( $Km^R$ ), bajo el control del promotor y terminador del gen nopalina sintasa (*nos-p*, *nos-t*). Contiene además el gen *gusA* codificante de la proteína  $\beta$ -Glucuronidasa, bajo el control del promotor 35S de CaMV. En pBI-HCT se ha introducido la secuencia codificante de HC-Pro con codones de iniciación y terminación, para permitir la traducción de proteína HC-Pro. En pBI-HCNT la secuencia codificante de HC-Pro contiene un codón de terminación al comienzo para impedir su traducción.

Se obtuvieron entre 20 y 30 plantas transformadas con cada una de las construcciones pBI-HCT (líneas HCt) y pBI-HCn (líneas HCn), y con pBI121 (líneas C) que sirvieron de control para algunos experimentos. Los tres vectores contienen un gen de resistencia a kanamicina (*nptII*), que permite la selección de plantas transformadas. La presencia de los distintos transgenes se determinó además mediante PCR y digestión del producto de PCR de algunas líneas HCt y HCn con *Clal* (Figura 4.2). El tamaño del producto de PCR fue el esperado (1401 nt), al igual que el tamaño de los fragmentos resultantes de la digestión con *Clal* (693, 461, 247 nt), lo que confirma la presencia del transgén HC-Pro. Solo líneas en las que se confirmó mediante PCR la presencia del transgén fueron utilizadas en sucesivos experimentos. Las líneas transgénicas no mostraron alteraciones morfológicas ni del desarrollo.



**Figura 4.2.** (a) Determinación de la presencia del transgén en líneas HCt (carriles 4-7) y HCn (8-11) mediante PCR. Como control positivo (C+) se empleó el plásmido pBI-HCT. Como control negativo (C-) se empleó DNA total de planta transformada con pBI121. Como marcador de tamaño (carriles 1, 13) se empleó DNA de fago lambda digerido con *EcoRI* y *HindIII*. (b) Digestión del producto de PCR de una línea HCt (carril 14) y de una línea HCn (carril 15) con *Clal*.

A partir de cada planta transformada (generación  $R_0$ ) se obtuvieron semillas por autofecundación, cuya germinación da lugar a plantas  $R_1$  de cada línea. Estas plantas  $R_1$ , y en algunos casos su progenie  $R_2$ , fueron las empleadas en sucesivos experimentos. La germinación de las semillas en kanamicina, permite además conocer la segregación de este carácter y estimar con ello el número de insertos del transgén en cada planta. Según esta estimación, las líneas HCt y HCn empleadas en este trabajo contienen entre 1 y 4 insertos (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1.** Segregación de la resistencia a kanamicina en plántulas R<sub>1</sub> y estimación del número de insertos del transgén.

Líneas	Segregación Km <sup>R</sup> /Km <sup>S</sup> (a)				Total	Segr. (b)	$\chi^2$ (c)	Prob.	Nº Loci
HCt1	156/57				156/57	2,7:1	0,35 (3:1)	0,55	1
HCt2	185/6	162/5	130/2	130/5	607/18	33,7:1	7,05 (63:1)	0,01	3
HCt3	145/36				145/36	4,0:1	2,52 (3:1)	0,11	1
HCt13	30/1	95/7			125/8	15,6:1	0,01 (15:1)	0,91	2
HCt15	188/46	54/20			242/66	3,7:1	2,10 (3:1)	0,15	1
HCt18	170/70	48/13			218/83	2,6:1	1,06 (3:1)	0,30	1
HCt20	166/46	70/25			236/71	3,3:1	0,57 (3:1)	0,45	1
HCn1	220/88	24/4			244/92	2,7:1	1,02 (3:1)	0,31	1
HCn5	171/123				171/123	1,4:1	44,45 (3:1)	0,00	1
HCn7	186/49	120/37			306/86	3,6:1	1,96 (3:1)	0,16	1
HCn9	395/14	140/2	80/1		615/17	36,2:1	5,22 (63:1)	0,02	3
HCn10	90/7				90/7	12,9:1	0,15 (15:1)	0,69	2
HCn11	363/2	140/0	98/0		601/2	300,5:1	0,05 (255:1)	0,82	4
HCn15	141/53				141/53	2,7:1	0,56 (3:1)	0,46	1
HCn16	160/0				160/0		2,54 (63:1)	0,11	3
HCn17	166/34				166/34	4,9:1	6,83 (3:1)	0,01	1

(a) Número de plántulas resistentes/número de plántulas susceptibles a kanamicina, observadas en varios experimentos.

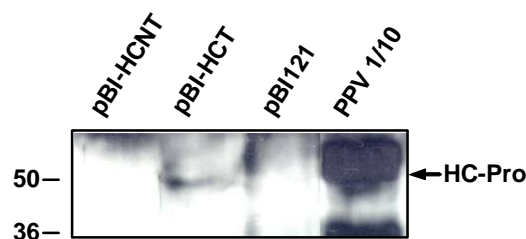
(b) Segregación observada entre plántulas resistentes y susceptibles a kanamicina.

(c) Prueba  $\chi^2$  y probabilidad asociada con 1 grado de libertad para la segregación teórica indicada entre paréntesis. Con probabilidades > 0,05 ( $\chi^2 < 3,84$ ) se acepta que las diferencias entre los datos observados y los teóricos sean debidas al azar y que la segregación observada se ajusta a la teórica.

## 4.2. DETECCIÓN DE PROTEÍNA HC-PRO EN LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS

### 4.2.1 Detección de proteína HC-Pro mediante expresión transitoria

Con el fin de determinar la capacidad de expresión de proteína HC-Pro de la construcción pBI-HCT (Figura 4.1), empleada para transformar plantas, se hicieron ensayos de expresión transitoria por agroinfiltración. Las construcciones pBI-HCT, pBI-HCNT y pBI121 se agroinfiltraron en hojas de *N. benthamiana*. Se analizó la acumulación de proteína HC-Pro mediante Western blot a 7 días tras la agroinfiltración. Se detectó una proteína de aproximadamente 50 kDa en la muestra de hoja agroinfiltrada con pBI-HCT, que no aparece en las muestras de hojas agroinfiltradas con pBI-HCNT o con pBI121 (Figura 4.3). El tamaño de esta proteína es similar a la detectada en una muestra de hoja infectada con PPV, por lo que probablemente se trate de proteína HC-Pro. Según el Western blot mostrado (Figura 4.3) y otros de similares características no mostrados, se estimó que la cantidad de proteína HC-Pro producida mediante expresión transitoria de pBI-HCT es próxima a 1/100 de la producida en infecciones con PPV,

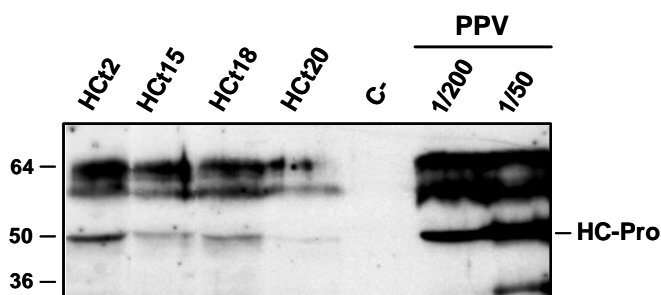


**Figura 4.3.** Expresión transitoria de proteína HC-Pro a partir de las construcciones utilizadas en la transformación de plantas. Se empleó como control positivo una planta infectada con PPV cuyo extracto se diluyó 1/10 en extracto de *N. benthamiana* no infectada. Se indica la posición de los marcadores de peso molecular (en kilo Daltons).

La expresión transitoria mediante agroinfiltración, aporta información sobre la capacidad de la construcción pBI-HCT de expresar proteína HC-Pro, independientemente de factores relativos a cada línea transformada, como el número de copias del transgén incorporadas o el sitio de integración en el genoma.

#### 4.2.2 Detección de proteína HC-Pro en plantas transgénicas HCt

Para determinar la expresión de proteína HC-Pro en las plantas transgénicas, se analizó su acumulación en varias líneas HCt mediante Western blot. Se detectó una proteína de aproximadamente 50 kDa en las líneas HCt, que probablemente corresponde a proteína HC-Pro, ya que no aparece en la planta control (*N. benthamiana* transformada con pBI121) y se corresponde en tamaño con la proteína HC-Pro detectada en plantas infectadas con PPV (Figura 4.4).



**Figura 4.4.** Detección de proteína HC-Pro en diferentes líneas de plantas transgénicas HCt. Como control negativo (C-) se empleó una planta transformada con pBI121. Como control positivo se empleó una planta infectada con PPV cuyo extracto se diluyó 1/50 o 1/200 en extracto de *N. benthamiana* no infectada. Tamaño indicado en kilo Daltons.

Los niveles de acumulación de proteína HC-Pro varían entre distintas líneas HCt, pero en cualquier caso son inferiores a 1/200 de la cantidad de proteína HC-Pro producida en una infección de PPV.

### **4.2.3 Detección de actividad de la proteína HC-Pro relacionada con supresión de PTGS**

La detección de proteína HC-Pro en las plantas transgénicas no implica necesariamente que la proteína sea activa. La proteína podría necesitar de otros factores virales, podría no adoptar la conformación apropiada o simplemente su nivel de acumulación podría ser insuficiente. Para determinar la actividad de la proteína HC-Pro, se estudiaron efectos relacionados con la supresión de silenciamiento génico postranscripcional (PTGS), tales como sinergismo y supresión de protección antiviral conferida por la expresión de dsRNA con homología a un virus.

#### **4.2.3.1. Sinergismo en infecciones con PVX**

La infección con PVX en presencia de proteína HC-Pro, produce una exacerbación de los síntomas causados por PVX, a lo que se conoce como 'sinergismo' (Vance *et al.*, 1995). En *N. benthamiana* la exacerbación de síntomas de PVX conlleva necrosis del tejido infectado y generalmente muerte de la planta (González Jara, 2002; González-Jara *et al.*, 2004). Además, este fenómeno se produce independientemente de la fuente de expresión de HC-Pro, ya sea por una infección mixta PVX/potyvirus (Gonzalez Jara, 2002; González-Jara *et al.*, 2004), por la introducción del gen HC-Pro en PVX (Sáenz *et al.*, 2001; González-Jara *et al.*, 2005), o por la expresión de HC-Pro a partir de un transgén en las plantas infectadas por PVX (Pruss *et al.*, 1997).

Se inocularon plantas de diferentes líneas transgénicas HCt y HCn con PVX, con el fin de observar la aparición de síntomas característicos de sinergismo PVX/HC-Pro. La aparición de estos síntomas sería diagnóstico de actividad HC-Pro.

Como control positivo, se inocularon plantas de líneas control transformadas con pBI121 (línea C3), HCn y HCt con la combinación PPV/PVX. Tras 7 días después de la inoculación, estas plantas mostraron síntomas de aclaramiento de venas. A 12-15 dpi, las plantas mostraron necrosis del tejido infectado y posterior muerte de la planta (Tabla 4.2).

Se inocularon con PVX plantas de líneas control (C3), HCn y HCt. Todas las plantas mostraron síntomas de aclaramiento de venas, aproximadamente a 7 dpi, y más adelante síntomas de mosaico. Los síntomas fueron muy similares entre las plantas que no expresan proteína HC-Pro (C3 y HCn) y las que si expresan HC-Pro (HCt), y en ningún caso las plantas mostraron necrosis generalizada del tejido infectado típica de sinergismo (Tabla 4.2), lo que sugiere que la proteína HC-Pro expresada por el transgén no tiene capacidad de inducir sinergismo en infecciones con PVX.

Virus	Líneas	Nº plantas	Síntomas Locales	Síntomas Sistémicos
PPV + PVX	C3	2	LLN +++	NS +++
	HCn7	1	LLN +++	NS +++
	HCn15	1	LLN +++	NS +++
	HCT1	1	LLN +++	NS +++
PVX	C3	2	LLN -	NS +/-
	HCn7	2	LLN -	NS +
	HCn11	2	LLN -	NS +
	HCn15	3	LLN +/-	NS +/-
	HCT1	1	LLN+	NS -
	HCT2	7	LLN +	NS +
	HCT3	3	LLN -	NS -
	HCT13	3	LLN +	NS +
	HCT15	6	LLN +	NS +
	HCT18	3	LLN -	NS -
HCT20	3	LLN -	NS -	

**Tabla 4.2.** Síntomas desarrollados por las plantas transgénicas en infecciones con PVX. Síntomas locales: LLN +++: Lesiones locales necróticas que ocupan la mayor parte de la superficie de la hoja inoculada. LLN +: Lesiones locales necróticas esporádicas que ocupan una superficie minoritaria. LLN -: Sin lesiones locales necróticas. Síntomas sistémicos: NS +++: Necrosis sistémica severa y muerte de la planta. NS +: Puntos esporádicos de necrosis, sin muerte de la planta. NS -: Sin necrosis sistémica.

#### 4.2.3.2. Supresión de protección antiviral

Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que la expresión transitoria mediante agroinfiltración de la construcción pBI/IR-54, que produce un RNA de doble cadena (dsRNA) inductor de PTGS con homología al virus PMMoV, era capaz de proteger a la planta frente a una infección con PMMoV (Tenllado *et al.*, 2003). Igualmente la expresión transitoria de pBI/IR-54 junto con pBI-HCT no resultaba en protección frente a PMMoV, indicando que la proteína HC-Pro producida por pBI-HCT era capaz de interferir con la protección mediada por la construcción pBI/IR-54 (Tenllado *et al.*, 2003).

Para comprobar si la proteína HC-Pro, expresada por las plantas HCT, tiene capacidad para interferir con la protección frente a PMMoV, llevamos a cabo la expresión transitoria de la construcción pBI/IR-54 y posterior inoculación con PMMoV en plantas de varias líneas HCT.

Como control de infectividad de PMMoV en estas condiciones, se agroinfiltraron plantas HCT y HCn con pBI121, construcción que no tiene homología con PMMoV y que no protege frente a la infección viral. Tras la inoculación con PMMoV de las hojas agroinfiltradas, se observó que algunas hojas se necrosaron prematuramente, resultando infectadas 8 de las 14 plantas (Tabla 4.3). Esto indica que el método de agroinfiltración seguido de inoculación mecánica es perjudicial para la infectividad del virus, lo que va a limitar parcialmente la capacidad de los sucesivos ensayos.

Como control de protección frente a PMMoV mediada por la construcción pBI/IR-54, plantas que no expresan proteína HC-Pro (HCn15 y *N. benthamiana* no transgénicas) se agroinfiltraron con pBI/IR-54 y se inocularon con PMMoV. Ninguna de ellas mostró síntomas de infección (0/10), lo que indica que la protección mediada por pBI/IR-54 frente a la infección por PMMoV es efectiva (Tabla 4.3).

Para comprobar si la proteína HC-Pro producida por el transgén es capaz de suprimir la protección mediada por pBI/IR-54, se agroinfiltraron con pBI/IR-54 plantas de las líneas HCt1, HCt2 y de dos líneas R<sub>2</sub>, la HCt2.2b y la HCt2.20. Estas dos últimas líneas se eligieron por ser líneas donde el transgén HC-Pro no está silenciado (Ver capítulo 4.4 y tabla 4.8) y se estima una acumulación de proteína HC-Pro de las más altas entre las líneas HCt. Tras la inoculación con PMMoV, ninguna de las plantas mostró síntomas de infección viral (0/13), lo que indica que en ningún caso la proteína HC-Pro expresada por el transgén fue capaz de interferir con la protección mediada por pBI/IR-54 (Tabla 4.3).

	Exp. 1			Exp. 2			Exp. 3		
	Líneas	Agroinfiltr. <sup>(a)</sup>	Inf. <sup>(b)</sup>	Líneas	Agroinfiltr.	Inf.	Líneas	Agroinfiltr.	Inf.
C.I.	HCn15	pBI121	0/1	HCt2.2b	pBI121	3/4	HCt2.20	pBI121	2/5
	HCt1	pBI121	2/2						
	HCt2	pBI121	1/2						
C.P.	HCn15	pBI/IR-54	0/1	Nb <sup>(c)</sup>	pBI/IR-54	0/4	Nb	pBI/IR-54	0/5
S.P.	HCt1	pBI/IR-54	0/2	HCt2.2b	pBI/IR-54	0/4	HCt2.20	pBI/IR-54	0/5
		HCt2	pBI/IR-54						

**Tabla 4.3.** Ensayo de supresión de la protección frente a PMMoV mediada por pBI/IR-54 en plantas transgénicas. (a) construcción agroinfiltrada en las plantas. (b) número de plantas infectadas con PMMoV/número de plantas inoculadas. (c) plantas de *N. benthamiana* no transgénicas. C.I.: grupo de plantas controles de infectividad. C.P.: grupo de plantas controles de protección. S.P.: grupo de plantas donde observar supresión de la protección.

Según estos resultados, la proteína HC-Pro expresada por el transgén en plantas HCt no presenta actividad relacionada con la supresión de PTGS, como son la inducción de sinergismo en infecciones de PVX y la supresión de la protección frente a PMMoV mediada por pBI/IR-54. Esto podría ser debido a algún tipo de alteración de la proteína o más probablemente al bajo nivel de acumulación, que podría estar por debajo de lo necesario para mostrar este tipo de actividad.

## 4.3. RESISTENCIA A PPV 5.15 EN PLANTAS TRANSGÉNICAS HCT Y HCN

### 4.3.1 Preparación del inóculo de PPV 5.15

En otros trabajos, se ha mostrado que la resistencia a virus observada en plantas transgénicas puede depender en gran medida del tipo de inóculo empleado (Maiti *et al.*, 1993; Guo y García, 1997). El empleo de extracto de planta infectada, virus purificado o RNA viral, así como la infectividad del inóculo podrían hacer variar la proporción de plantas resistentes y susceptibles. Para reducir en lo posible tal inconveniente, de manera que todos los experimentos de resistencia a PPV en las plantas transgénicas HC-Pro fueran comparables entre sí, es necesario normalizar el

tipo de inóculo y su infectividad. Para ello se preparó, de una sola vez, una gran cantidad de extracto de planta infectada con PPV 5.15, que se almacenó a -80 °C en alícuotas de un solo uso.

La infectividad de este inóculo estándar se probó en el huésped hipersensible a PPV *Chenopodium foetidum*. Se asume que cada punto de entrada e infección de una partícula viral de PPV en la hoja inoculada, produce en este huésped una lesión clorótica, de manera que el número de lesiones es indicativo de la infectividad del inóculo. Se probaron distintas diluciones del inóculo en *C. foetidum* y también se probó cual es la dilución límite del inóculo capaz de infectar el 100% de plantas de *N. benthamiana* no transgénicas (Tabla 4.4). Como se observa en la tabla, el inóculo empleado es capaz de infectar el 100% de plantas de *N. benthamiana* al menos hasta una dilución 1/2, mientras que a diluciones 1/4 o superiores la infectividad es insuficiente para infectar al 100% de las plantas inoculadas.

**Tabla 4.4.** Determinación del número de lesiones producidas por PPV 5.15 en hojas de *C. foetidum* y dilución límite en *N. benthamiana*.

Dilución inóculo	Número de lesiones por hoja en <i>C. foetidum</i>								Media N° lesiones	Desv. estand.	N° infectadas / N° inoculadas <i>N. benthamiana</i>
1/1	7	10	8	1	8	10	2	9	6,88	3,48	5/5
1/5	0	4	1	0	0	8	2		2,14	2,97	3/5
1/25	0	0	0	1	2				0,60	0,89	1/5
1/125	0	0	0	0	0	0	0		0,00	0,00	0/5
1/1	3	3	3	3	2	6			3,33	1,37	19/19
1/2	3	8	0	5	1				3,40	3,21	9/9
1/4	0	0	1	0	0				0,20	0,45	8/10
1/8	2	0	0	0					0,50	1,00	9/10

Otro factor a tener en cuenta es la estabilidad de un inóculo de este tipo durante su utilización. Para comprobar esto, se comparó el número de lesiones del inóculo en la mitad de una hoja a distintos tiempos, con el número de lesiones del inóculo a tiempo 0 en la otra mitad. Tras 30 minutos en hielo la infectividad se reduce aproximadamente a la mitad, mientras que tras 15 minutos a temperatura ambiente (20-24 °C) la infectividad se reduce aproximadamente a la cuarta parte (Figura 4.5).



	Control 0'		15' hielo		Control 0'		30' hielo		Control 0'		15' T° ambiente	
N° de lesiones por hoja	14	7	13	14	3	1	3	1	8	5	5	1
	23	23	11	11	9	10	9	4	2	15	1	0
					19	19	3	3				
Media N°	14,67	7,00	12,67	11,00	8,40	10,50	4,00	3,00	7,50	15,00	1,75	0,00
Desviación	8,02	8,02	1,53	1,53	7,06	7,06	3,00	3,00	5,57	5,57	2,22	2,22
Relación	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>0,86</b>	<b>0,86</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>0,48</b>	<b>0,48</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>0,23</b>	<b>0,23</b>

**Figura 4.5.** Lesiones típicas de PPV en una hoja de *C. foetidum* y determinación de la estabilidad del inóculo de PPV 5.15 empleado en los experimentos de resistencia.

En los experimentos de resistencia a PPV realizados posteriormente, para evitar una pérdida significativa de infectividad del inóculo durante la inoculación de las plantas, cada alícuota de inóculo de PPV 5.15, una vez descongelada, se mantuvo en hielo y se utilizó en menos de 30 minutos.

#### 4.3.2 Identificación de líneas HCT y HCn con resistencia a PPV 5.15

Se inocularon con PPV 5.15 plantas de diversas líneas HCT y HCn con el fin de determinar los posibles fenómenos de resistencia a PPV 5.15. Como control de la infectividad del inóculo de PPV 5.15, en cada uno de los experimentos se inocularon grupos de plantas control transformadas con pBI121, que no contiene secuencias derivadas de PPV 5.15, y/o plantas de *N. benthamiana* no transgénicas.

Todas las plantas control inoculadas con PPV 5.15 mostraron síntomas de infección viral entre 10 y 12 días postinoculación (Figura 4.6). Los síntomas mostrados consistieron en aclaramiento de venas en las primeras hojas infectadas sistémicamente y mosaico en las hojas aparecidas posteriormente.



**Figura 4.6.** Aspecto de una planta de *N. benthamiana* no transgénica infectada con PPV 5.15 (izquierda) y de una planta no inoculada (derecha).

La mayoría de líneas HCT y HCn mostraron en todas sus plantas síntomas similares a los de las plantas control, tanto en aspecto como en tiempo de aparición. Sin embargo, algunas de las líneas mostraron un número variable de plantas sin síntomas. En concreto las líneas HCT2, HCT13, HCn9 y HCn11 mostraron una alta proporción de plantas sin síntomas (Tabla 4.5). El resto de las plantas de estas cuatro líneas mostraron síntomas similares a los de las plantas control, con la excepción de un pequeño número de plantas (<5% del total) con retraso de 3-5 días en la aparición de los síntomas.

Las plantas asintomáticas, permanecieron libres de síntomas durante todo su ciclo de vida (3-4 meses). Las plantas HCT y HCn susceptibles mostraron una ligera disminución en la intensidad de los síntomas a medida que las plantas envejecían, aunque esta fue similar a lo observado en las plantas control, por lo que no llevó a pensar en la existencia de un fenotipo de recuperación como el observado en otros trabajos (Lindbo *et al.*, 1993; Guo y García, 1997).

**Tabla 4.5.** Susceptibilidad de las líneas HCt y HCn a PPV

Líneas	Plantas infectadas PPV 5.15 <sup>(c)</sup>						Total
Control <sup>(a)</sup>	6/6	10/10	8/8	7/7	10/10	8/8	49/49
Nb <sup>(b)</sup>	7/7		4/4				11/11
HCt1	10/10						10/10
HCt2	3/10	3/10	4/10	1/10	16/37		27/77
HCt3	10/10						10/10
HCt13	0/7	3/10	2/13				5/30
HCt15	6/7	18/18					24/25
HCt18	8/8						8/8
HCt20	8/8						8/8
HCn1	10/10						10/10
HCn5	10/10						10/10
HCn7	6/7	10/10					16/17
HCn9	8/10	3/10	12/14				23/34
HCn10	5/6	9/9					14/15
HCn11	3/7	1/10	11/18				15/35
HCn15	8/8						8/8
HCn16	8/8						8/8
HCn17	8/8						8/8

(a) Plantas control transformadas con pBI121.

(b) Plantas de *N. benthamiana*.

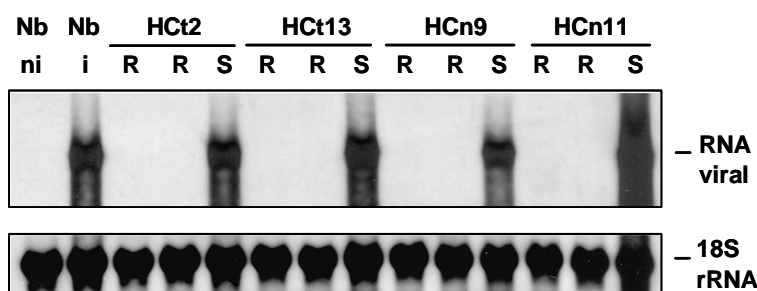
(c) número de plantas con síntomas de infección/número de plantas inoculadas, en varios experimentos.

La existencia de resistencia en líneas HC-Pro no traducibles (HCn) indica que la expresión de proteína HC-Pro no es necesaria, por lo que la resistencia al menos en las líneas HCn, está probablemente mediada por el mRNA del transgén. En las líneas HC-Pro traducibles (HCt) probablemente opera el mismo mecanismo, aunque no es descartable que la resistencia sea mediada por la expresión de la proteína HC-Pro. Para comprobarlo, en los sucesivos experimentos se analizaron en estas plantas propiedades típicas de la resistencia mediada por RNA, como la acumulación del virus, la especificidad de resistencia frente a otros virus o la acumulación de mRNA del transgén HC-Pro

### 4.3.3 Análisis molecular de las plantas resistentes y susceptibles a PPV 5.15

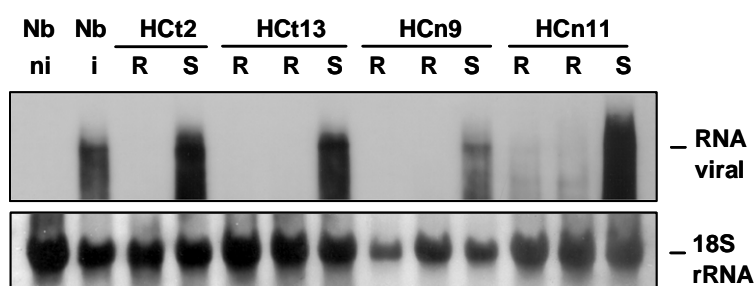
Se analizó la acumulación de RNA viral de PPV 5.15 en las hojas sistémicas de plantas con síntomas y sin sintomáticas de las líneas HCt2, HCt13, HCn9 y HCn11 mediante Northern blot, con el fin de observar la correspondencia entre la acumulación viral y la presencia o ausencia de síntomas. Las plantas susceptibles a PPV 5.15 de las líneas HCt2, HCt13, HCn9 y HCn11 mostraron acumulación de RNA

viral, a un nivel similar al de la planta control. En las plantas resistentes sin embargo, no se detectó acumulación de RNA viral de PPV 5.15 (figura 4.7).



**Figura 4.7.** Detección mediante Northern blot del RNA viral de PPV 5.15 en hojas sistémicas de plantas susceptibles (**S**) o de plantas resistentes (**R**). Como control se emplearon muestras de *N. benthamiana* no inoculada (**Nb ni**) o de *N. benthamiana* infectada con PPV 5.15 (**Nb i**). Para la detección del RNA viral se empleó una sonda complementaria a la región HC-Pro de PPV 5.15. Panel inferior: Detección del RNA ribosómico 18S como control de carga de RNA.

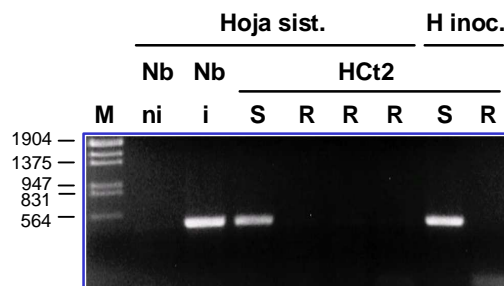
La acumulación de RNA viral de PPV 5.15 también se analizó en las hojas inoculadas (Figura 4.8) con el fin de estimar en que momento se produce el bloqueo de la infección viral. Los niveles de acumulación en las plantas susceptibles HCt2, HCt13, HCn9 y HCn11 fueron similares al de la planta control. No se detectó RNA viral en las plantas resistentes de las líneas HCt2, HCt13 y HCn9. Sin embargo en las muestras correspondientes a las plantas resistentes HCn11, se observa unas bandas de hibridación tenues que no aparecen en el control (*N. benthamiana* no inoculada; Nb ni) y que podrían corresponder a bajos niveles de acumulación de RNA viral, aunque no es totalmente descartable que estas bandas correspondan a RNA del trangén HC-Pro.



**Figura 4.8.** Detección mediante Northern blot del RNA viral de PPV 5.15 en hojas inoculadas de plantas susceptibles (**S**) o resistentes a PPV 5.15 (**R**) y en *N. benthamiana* no inoculada (**ni**) o infectada con PPV 5.15 (**i**). La detección se llevó a cabo con una sonda complementaria a la región HC-Pro de PPV 5.15. Panel inferior: Detección del RNA ribosómico 18S como control de carga.

La acumulación de RNA viral se estudió con más detalle en la línea HCt2 (por ser esta la línea más avanzada en la experimentación). Se empleó RT-PCR por su mayor sensibilidad, para analizar la posible presencia de RNA viral por debajo del límite de detección del Northern blot en las plantas resistentes. En las muestras de plantas susceptibles, tanto de hojas sistémicas como de hojas inoculadas aparece

un producto de PCR del tamaño esperado, utilizando 1 µg de RNA total como molde (figura 4.9). Este producto aparece incluso utilizando 1,6 ng de RNA total como molde (no mostrado). Sin embargo en las muestras de plantas resistentes no se observa tal producto de PCR, lo que indica una ausencia total de PPV o una acumulación por debajo del umbral de detección.



**Figura 4.9.** Detección mediante RT-PCR del RNA viral de PPV 5.15 en hojas sistémicas e inoculadas de plantas susceptibles (**S**) o resistentes a PPV 5.15 (**R**) y en *N. benthamiana* no inoculada (**ni**) o infectada con PPV 5.15 (**i**). Los cebadores empleados amplifican una porción del gen CP de PPV 5.15 de 490 nt.

Por tanto, la ausencia de síntomas en estas plantas se correlaciona con la ausencia de acumulación viral detectable en hojas sistémicas e inoculadas, por lo que el bloqueo de la infección viral se produce en un estadio temprano. Sin embargo no es descartable la presencia de bajos niveles de acumulación de PPV en las plantas asintomáticas de la línea HCn11.

#### 4.3.4 Especificidad de la resistencia

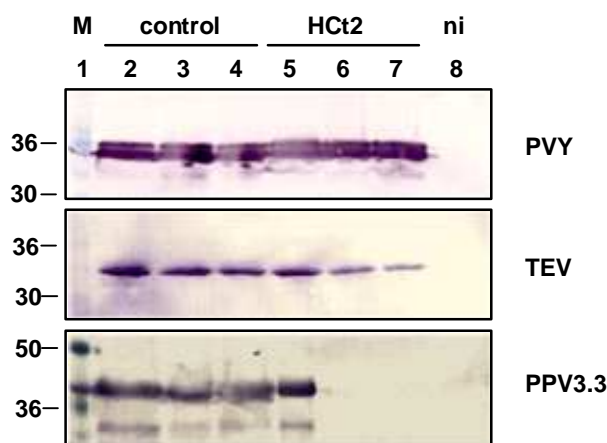
Se comprobó la especificidad del mecanismo que promueve la resistencia, mediante la inoculación de las líneas resistentes a PPV 5.15 con varios potyvirus con distinto grado de homología de secuencia con el transgén. PPV 3.3 cuya homología de secuencia nucleotídica con el transgén HC-Pro es aproximadamente del 99%. PVY y TEV cuya homología con el transgén es aproximadamente del 55%. A la vez se inocularon plantas control para comprobar la infectividad del inóculo. Todas las plantas control inoculadas con cada uno de los virus mostraron síntomas de infección. Igualmente, todas las plantas de las líneas HCt2, HCn9 y HCn11 inoculadas con PVY o TEV también mostraron síntomas. Sin embargo un alto número de plantas de estas líneas inoculadas con PPV 3.3 no mostraron síntomas de infección (Tabla 4.6), de manera similar a lo observado en el apartado anterior con PPV 5.15.

**Tabla 4.6.** Especificidad de la resistencia frente a varios potyvirus.

Líneas	PPV 3.3	PVY	TEV
HCt2	3/10 <sup>(a)</sup>	10/10	10/10
HCn9	7/11	7/7	7/7
HCn11	9/17	7/7	7/7
control	6/6	5/5	6/6

(a) Número de plantas infectadas/número de plantas inoculadas.

Se analizó la acumulación de los tres virus en las plantas control y HCt2 inoculadas mediante la detección de proteína CP por Western blot. PVY y TEV se acumulan de forma similar en plantas control y en plantas HCt2 infectadas. En el caso de PPV 3.3 la acumulación es similar entre plantas control y una planta HCt2 infectada, mientras que no se detecta acumulación de CP en las plantas HCt2 que no mostraron síntomas virales (figura 4.10).



**Figura 4.10.** Detección de la proteína CP de PVY, TEV o PPV 3.3. Plantas control inoculadas con cada uno de los virus (carriles 2-4). Plantas HCt2 inoculadas con PVY, TEV o PPV 3.3 que mostraron síntomas (carriles 5-7 paneles superior y medio; carril 5 panel inferior) o que no mostraron síntomas (carriles 6-7 panel inferior). Plantas control no inoculadas (ni; carril 8). Marcador de peso molecular (M; carril 1) en kDa.

El hecho de que la resistencia no sea efectiva frente a PVY y TEV, pero sí frente a un virus homólogo al transgén HC-Pro, sugiere que la resistencia está basada en un mecanismo dependiente de homología de secuencia entre el transgén y el RNA viral.

Se comprobó también la influencia de la infectividad del inóculo y del estadio de desarrollo de las plantas en la manifestación de la resistencia. Se inocularon plantas HCt2, HCn9 y HCn11 con un inóculo fresco de PPV 5.15 más infectivo que el empleado hasta el momento. Este inóculo fresco produjo una media de 21 lesiones por hoja de *C. foetidum*, en un ensayo en paralelo con el inóculo estándar que produjo una media de 7 lesiones por hoja. Una proporción de las plantas de las tres líneas analizadas no mostraron síntomas, de manera similar a lo ocurrido con el inóculo estándar empleado en el apartado anterior (Tabla 4.7).

En otros trabajos se ha constatado que en algunas líneas transgénicas la proporción de plantas resistentes puede variar dependiendo de la edad de las plantas, siendo inferior en plantas más jóvenes (Sonoda y Nishiguchi, 2000). Se comprobó si la utilización de plantas más jóvenes tiene efecto sobre la proporción de plantas resistentes en la línea HCt2. Para ello se inocularon con inóculo estándar de PPV 5.15 plantas HCt2 de 5 semanas de crecimiento, en lugar de plantas de 6 semanas usadas en los demás experimentos. La proporción de plantas HCt2 que no mostraron síntomas de PPV fue similar a la observada en los anteriores experimentos (Tabla 4.7).

**Tabla 4.7.** Influencia de la infectividad del inóculo y del desarrollo de las plantas sobre la resistencia.

Líneas	PPV 5.15 fresco <sup>(a)</sup>	Plantas jóvenes <sup>(b)</sup>
HCt2	1/9 <sup>(c)</sup>	3/9
HCn9	4/6	
HCn11	5/6	
control	5/5	6/6

(a) Inóculo de PPV 5.15 de mayor infectividad.

(b) Plantas de 5 semanas de crecimiento.

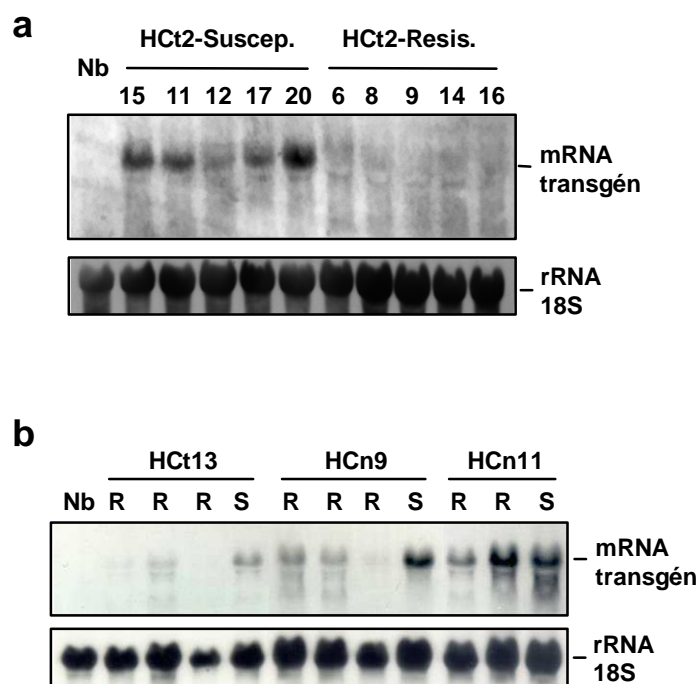
(c) Número de plantas infectadas/número de plantas inoculadas.

Por tanto parece que la resistencia a PPV no está condicionada en gran medida por la infectividad del inóculo empleado ni por el estadio de desarrollo de las plantas, aunque el número de plantas empleado en estos ensayos es algo reducido para obtener conclusiones sólidas.

#### **4.3.5 Caracterización de los niveles de mRNA del transgén HC-Pro en las líneas resistentes a PPV**

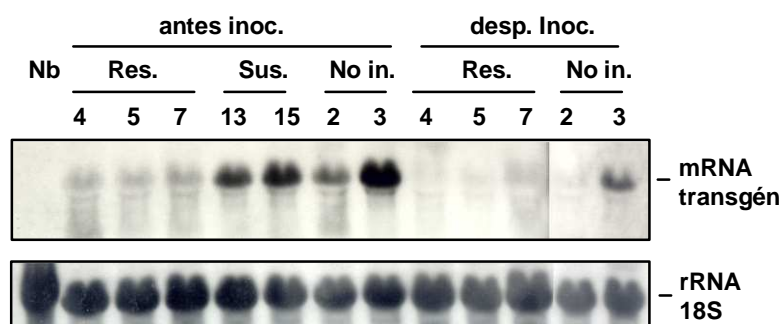
Las características de la resistencia observada en algunas de las plantas transgénicas HC-Pro indican que es dependiente de homología de secuencia entre el transgén y el virus, está poco influenciada por la infectividad del inóculo y al menos en las líneas transgénicas HCn no requiere de expresión de proteína HC-Pro. Estas propiedades sugieren un mecanismo de resistencia basado en silenciamiento génico postranscripcional (PTGS). Además, la ausencia total de síntomas sugiere un mecanismo de PTGS inducido por el propio transgén y por tanto preestablecido en el momento de inoculación del virus, a diferencia de un mecanismo de PTGS inducido por el virus, que normalmente requiere establecimiento de la infección viral para inducir PTGS, que mas tarde restringe la acumulación de virus y de mRNA del transgén en las hojas superiores de la planta.

Para comprobar si la resistencia a PPV es mediada por PTGS, se observaron los niveles de mRNA del transgén HC-Pro en muestras recogidas previamente a la inoculación con PPV en plantas transgénicas HCt y HCn. A continuación se inocularon las plantas para observar su fenotipo de resistencia o susceptibilidad a PPV. En plantas HCt2, se observó una banda del tamaño esperado correspondiente al mRNA del transgén HC-Pro. La acumulación del mRNA fue sensiblemente menor (de 2 a 8 veces menos) en las plantas resistentes a PPV respecto a las plantas susceptibles (Figura 4.11a), lo que sugiere con fuerza que el transgén HC-Pro se encuentra silenciado postranscripcionalmente en las plantas resistentes a PPV. Las líneas HCt13 y HCn9 también mostraron menor acumulación de mRNA del transgén en las plantas resistentes, por lo que es posible que también opere un mecanismo de PTGS frente al transgén. La línea HCn11 sin embargo, no mostró diferencias consistentes (Figura 4.11b), lo que junto con los datos de acumulación de RNA viral (Figura 4.8), sugiere que el mecanismo de resistencia a PPV en esta línea podría diferir de alguna manera respecto a las otras líneas.



**Figura 4.11.** Detección del mRNA del transgén HC-Pro en líneas resistentes a PPV. **(a)** Detección del mRNA en plantas HCt2 susceptibles o resistentes a PPV. A cada planta analizada se le asignó un número identificativo. **(b)** Detección de mRNA en plantas HCt13, HCn9 o HCn11 resistentes (R) o susceptibles (S) a PPV. La detección en ambos casos se realizó con una sonda complementaria a la región *gusA* del transgén. Se muestra la detección de rRNA como control de carga.

Se comparó, en la línea HCt2, la acumulación de mRNA del transgén antes de la inoculación con PPV y dos semanas después de la inoculación. Además de la diferencia de acumulación de mRNA entre plantas resistentes y susceptibles a PPV, se observó una disminución en la acumulación después de la inoculación. Sin embargo, esta disminución se observó también en plantas no inoculadas muestreadas a los mismos tiempos, lo que sugiere que tal disminución en la acumulación de mRNA no es producida por efecto de la inoculación con PPV (Figura 4.12) sino probablemente, por cambios del nivel de expresión durante el desarrollo.



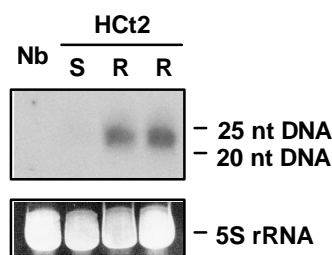
**Figura 4.12.** Detección del mRNA del transgén HC-Pro en plantas HCt2 resistentes, susceptibles o no inoculadas con PPV, antes de la inoculación o 2 semanas después del momento de la inoculación. A cada planta analizada se le asignó un número identificativo. La detección se realizó con una sonda complementaria a la región *gusA* del transgén. Se muestra la detección de rRNA como control de carga.

A la vista de estos resultados, la resistencia a PPV parece estar causada por un fenómeno de PTGS inducido por el transgén HC-Pro, que se produce en algunas de las plantas de estas líneas. Por tanto, es poco probable que la proteína HC-Pro expresada por el transgén en las plantas HCt tenga algún papel en la resistencia a PPV.

#### 4.3.6 Análisis de siRNA derivados del transgén HC-Pro en plantas resistentes a PPV

Una de las principales marcas de identidad del PTGS es la acumulación de pequeños RNAs de 21-24 nt (siRNA) derivados del RNA silenciado. Por tanto, con el fin de confirmar el PTGS del transgén HC-Pro, se analizó la presencia de siRNAs derivados del transgén en plantas resistentes o susceptibles a PPV en muestras previas a la inoculación del virus.

En plantas HCt2 resistentes a PPV, se detectaron siRNAs de entre 21 y 24 nt de tamaño aproximado (Figura 4.13). Sin embargo, no se detectaron siRNAs derivados del transgén en plantas que resultaron susceptibles a PPV.



**Figura 4.13.** Detección de siRNAs derivados del transgén HC-Pro en plantas susceptibles (**S**) o resistentes a PPV (**R**). Para la detección se empleó una sonda de DNA marcada con  $^{32}\text{P}$  específica para la región *gusA* del transgén. Como marcadores de peso molecular se emplearon oligonucleótidos de DNA. Como control de carga se muestra una tinción de bromuro de etidio del rRNA.

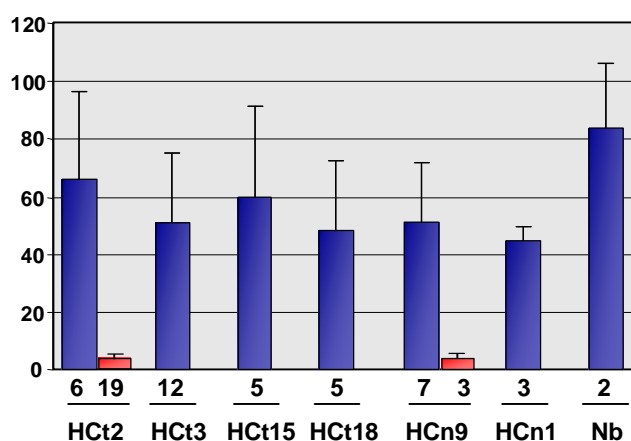
Este resultado, por tanto, confirma que el transgén HC-Pro se encuentra silenciado postranscripcionalmente en las plantas HCt2 resistentes a PPV, lo que apoya que la resistencia a PPV es dependiente de RNA y está causada por un fenómeno de PTGS inducido por el transgén HC-Pro.

#### 4.3.7 Silenciamiento de un gen *GUS* con homología de secuencia con el transgén HC-Pro

La existencia de un mecanismo de resistencia a PPV basado en silenciamiento del transgén HC-Pro implicaría que cualquier RNA con suficiente homología al transgén HC-Pro (no solo el RNA viral de PPV) podría ser diana del silenciamiento. Para comprobarlo expresamos transitoriamente mediante agroinfiltración un gen *gusA*, que es homólogo a la porción 3' del transgén HC-Pro (Figura 4.1).

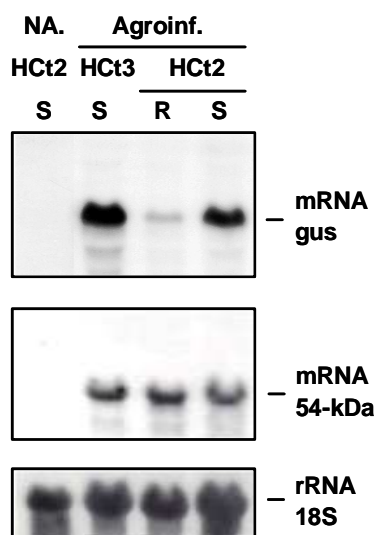
Las plantas de *N. benthamiana* no transgénicas y plantas transgénicas HCt y HCn susceptibles a PPV (HCt3, HCt15, HCt18 y HCn1) mostraron altos niveles de proteína  $\beta$ -Glucuronidasa (GUS) cuando se agroinfiltraron con la construcción pBI121, que contiene el gen *gusA*. En las líneas HCt2 y HCn9 una porción de las plantas mostró niveles de expresión de proteína GUS similares a los observados en líneas sin resistencia a PPV. Sin embargo un alto número de plantas mostró niveles de expresión de proteína GUS mucho menores (aproximadamente 20 veces menos) de los observados en el resto de las plantas (Figura 4.14).

Tras la inoculación de estas plantas con PPV, se observó que las plantas que mostraron una baja expresión de proteína GUS resultaron ser resistentes a PPV, mientras que las plantas con alta expresión de proteína GUS resultaron ser susceptibles, lo que indica que la reducción de la expresión de proteína GUS es probablemente causada por el mismo mecanismo que produce la resistencia a PPV.



**Figura 4.14.** Actividad de proteína GUS en plantas HCt y HCn resistentes a PPV (barras rojas) o susceptibles a PPV (barras azules). La actividad GUS está expresada como nanogramos de proteína GUS/miligramos de tejido agroinfiltrado. El número de plantas analizadas en cada caso se indica debajo de cada barra.

Además, se observó el efecto sobre el mRNA del gen *gusA* en plantas agroinfiltradas con una mezcla de *Agrobacterium* portando pBI121 y pBI/54-kDa, construcción ésta última que expresa una porción del gen de la proteína 54-kDa del virus PMMoV y que no tiene homología significativa con el gen *gusA*. La acumulación del mRNA del gen *gusA* en una planta HCt2 resistente a PPV fue aproximadamente 10 veces inferior a la observada en plantas susceptibles. Sin embargo la acumulación del mRNA del gen de la proteína 54-kDa, fue similar en plantas resistentes o susceptibles a PPV (Figura 4.15), lo que confirma que la reducción en la expresión del gen *gusA* es dependiente de homología y por tanto causada por PTGS.



**Figura 4.15.** Niveles de acumulación de mRNA del gen *gusA* y del gen de la proteína 54-kDa expresados transitoriamente en plantas susceptibles (S) o resistentes (R) a PPV. NA.: No agroinfiltrada. Para la detección se emplearon sondas complementarias de RNA marcadas con digoxigenina. Se muestra la detección del rRNA como control de carga.

El hecho de que otro RNA homologó al transgén HC-Pro y distinto de PPV pueda ser diana del silenciamiento y que esto se produzca fuera del contexto de la infección viral, indican que PPV es prescindible en la inducción de PTGS. Por tanto esto confirma que el silenciamiento y la resistencia a PPV observados, son inducidos por el transgén HC-Pro.

#### 4.4. FACTORES DETERMINANTES DE LA RESISTENCIA A PPV EN LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS HC-PRO

Se procedió a estudiar qué factores determinan que las plantas transgénicas HC-Pro estén o no silenciadas y, por tanto, sean resistentes o susceptibles a PPV.

Para tal fin se eligió la línea HCt2, que contiene plantas resistentes y susceptibles a PPV y constituye la línea mejor caracterizada en cuanto al mecanismo de resistencia a PPV basado en PTGS del transgén HC-Pro.

##### 4.4.1 Resistencia a PPV en la progenie de plantas HCt2 resistentes o susceptibles a PPV

Para determinar si los fenotipos de resistencia o susceptibilidad a PPV están regidos mayoritariamente por factores ambientales o por factores genéticos, se observó la herencia de tales caracteres en la progenie ( $R_2$ ) de las plantas  $R_1$  caracterizadas en los anteriores experimentos. Igualmente se observó la segregación de la resistencia a kanamicina en las plantas  $R_2$ , con el fin de estimar el número de loci del transgén en los parentales  $R_1$  y observar su relación con los fenotipos de resistencia o susceptibilidad (Tabla 4.8).

Tabla 4.8. Resistencia a PPV en la generación R<sub>2</sub>.

Líneas R <sub>2</sub>	Km <sup>R</sup> /Km <sup>S</sup> (a)	Segr. (b)	$\chi^2$ (c)	Prob. $\chi^2$	Nº Loci (d)	Parent. (e)	Plantas inf (Km <sup>R</sup> ) (f)	Plantas inf (sin selec) (g)
HCt2.1b	191/17	11,2:1	1,31 (15:1)	0,25	2	S	15/15	
HCt2.2b	253/0	HO			-	S	15/15	
HCt2.4b	184/1	184,0:1	1,26 (63:1)	0,26	3	R	2/15	
HCt2.5b	187/0	HO			-	R	8/15	
HCt2.4	153/4	38,3:1	0,99 (63:1)	0,31	3	R	13/18	
HCt2.5	180/52	3,5:1	0,83 (3:1)	0,36	1	R	2/17	0/15
HCt2.6	230/0	HO			-	R	0/39	
HCt2.7	230/24	9,6:1	4,44 (15:1)	0,03	2	R	5/18	
HCt2.8	270/21	12,9:1	0,46 (15:1)	0,49	2	R	6/19	
HCt2.9	225/63	3,6:1	1,50 (3:1)	0,22	1	R	4/15	3/20
HCt2.11	215/17	12,6:1	0,46 (15:1)	0,49	2	S	20/20	
HCt2.13	110/33	3,3:1	0,28 (3:1)	0,59	1	S	19/19	
HCt2.14	455/23	19,8:1	1,69 (15:1)	0,19	2	R	10/18	
HCt2.15	160/15	10,7:1	1,61 (15:1)	0,20	2	S	18/18	
HCt2.16	230/60	3,8:1	2,87 (3:1)	0,09	1	R	3/18	0/17
HCt2.18	240/60	4,0:1	4,00 (3:1)	0,04	1	R	5/20	5/20
HCt2.19	445/61	7,3:1	29,10 (15:1)	0,00	2	R	4/18	
HCt2.20	230/0	HO			-	S	19/19	
HCt2.21	400/79	5,1:1	18,49 (3:1)	0,00	1	R	9/15	

- (a) Número de plántulas resistentes/número de plántulas susceptibles a kanamicina.
- (b) Segregación observada entre plántulas resistentes y susceptibles a kanamicina. Las líneas en las que no se observó ninguna plántula Km<sup>S</sup> se consideraron homocigotas (HO).
- (c) Prueba  $\chi^2$  y probabilidad asociada con 1 grado de libertad para la segregación teórica indicada entre paréntesis. Con probabilidades  $> 0,05$  ( $\chi^2 < 3,84$ ) se acepta que las diferencias entre los datos observados y los teóricos sean debidas al azar y que la segregación observada se ajusta a la teórica.
- (d) Estimación del número de loci del transgén HC-Pro en la planta parental R<sub>1</sub>. (-): No aplicable.
- (e) Fenotipo resistente a PPV (R) o susceptible (S) de la planta parental R<sub>1</sub>.
- (f) Número de plantas seleccionadas en kanamicina infectadas con PPV/número de plantas inoculadas.
- (g) Número de plantas no seleccionadas en kanamicina infectadas con PPV/número de plantas inoculadas.

Todas las líneas R<sub>2</sub> progenie de plantas R<sub>1</sub> susceptibles a PPV fueron 100% susceptibles a PPV (líneas HCt2.1b, HCt2.2b, HCt2.11, HCt2.13, HCt2.15, HCt2.20). En cambio, todas las líneas progenie de plantas resistentes a PPV fueron 100% resistentes a PPV (línea HCt2.6) o presentaron una proporción de plantas resistentes y susceptibles similar a la observada en la línea parental HCt2. Estos datos indican que el carácter de resistencia o susceptibilidad a PPV es heredable y que por tanto está determinado mayoritariamente por factores genéticos y no por factores ambientales.

Como factores genéticos que determinan la resistencia o susceptibilidad a PPV se podrían considerar el número total de loci del transgén, el estado de homocigosis de cualquiera de los loci o la presencia/ausencia de uno o varios loci concretos.

Según la segregación de la resistencia a kanamicina (Tabla 4.8), las plantas  $R_1$  susceptibles a PPV contenían entre 1 y 2 loci en heterocigosis o al menos 1 locus en homocigosis, mientras que las plantas  $R_1$  resistentes a PPV contenían entre 1 y 3 loci en heterocigosis o al menos 1 locus en homocigosis (Tabla 4.8). No hay una correlación aparente entre el número de loci del transgén y los fenotipos de resistencia o susceptibilidad a PPV. Por tanto el carácter de resistencia o susceptibilidad a PPV no parece estar determinado por el número total de loci del transgén.

Igualmente, no parece existir correlación entre el estado en homocigosis de alguno de los loci y la resistencia o susceptibilidad a PPV, ya que entre las plantas  $R_1$  con al menos 1 locus en homocigosis hubo tanto progenies resistentes (HCt2.5b y HCt2.6) como susceptibles (HCt2.2b y HCt2.20) a PPV. Por tanto el estado en homocigosis de cualquiera de los loci no parece determinar el carácter de resistencia o susceptibilidad a PPV.

La existencia de plantas  $R_1$  resistentes a PPV en las que se estima la presencia de un solo locus del transgén HC-Pro sugiere que un solo locus es suficiente para inducir el carácter de resistencia a PPV. Igualmente, las plantas  $R_1$  susceptibles a PPV observadas contienen hasta dos loci del transgén. Esto sugiere que de los tres loci del transgén HC-Pro estimados en la línea HCt2, dos de ellos no tienen capacidad para inducir el carácter de resistencia, mientras que el locus restante podría ser el que determina el carácter de resistencia a PPV. La presencia o ausencia de este locus determinaría los caracteres de resistencia o susceptibilidad a PPV respectivamente. Igualmente el estado de homocigosis o heterocigosis de este locus determinaría un 100% de plantas resistentes en la generación  $R_2$  (línea HCt2.6) o la segregación de la resistencia (resto de líneas  $R_2$  con resistencia a PPV).

Si la resistencia a PPV en la línea HCt2 está determinada por un solo locus, como sugieren las anteriores observaciones, sería de esperar una proporción 3:1 entre plantas resistentes y susceptibles a PPV en la generación  $R_1$ . Sin embargo, la segregación de la resistencia a PPV observada según los datos de la tabla 4.5 (27 plantas infectadas en un total de 77 inoculadas) es 1,8:1, lejos de la esperada 3:1 (prob.  $\chi^2 = 0,04 < 0,05$ ). Para comprobar con más fiabilidad si la proporción entre plantas resistentes y susceptibles en HCt2 se aproxima a 3:1, se inoculó con PPV un total de 96 plantas  $R_1$  HCt2, en esta ocasión no seleccionadas en kanamicina para incluir toda la población. Se observaron 20 plantas susceptibles a PPV entre un total de 96 plantas inoculadas, lo que supone una proporción 3,8:1 entre plantas resistentes y susceptibles a PPV, poco desviada de la teórica 3:1 (prob.  $\chi^2 = 0,35 > 0,05$ ), lo que apoya la hipótesis de resistencia a PPV determinada por un solo locus.

Para analizar la resistencia o susceptibilidad a PPV en las líneas  $R_2$ , se emplearon plantas seleccionadas en kanamicina. Esto supone un problema en las líneas con resistencia a PPV en las que se estima un único locus del transgén (segregación 3:1). En estas líneas, es de esperar que este único locus sea el determinante de la resistencia a PPV. De esta manera, la selección en kanamicina eliminaría todas las plantas en las que falta este locus determinante de la resistencia a PPV, lo que provocaría que estas líneas pareciesen 100% resistentes a PPV. Por esta razón, para estas líneas el análisis se realizó también en plantas no seleccionadas en kanamicina, de manera que se puede observar la segregación de la resistencia a PPV.

En contra de lo esperado, en varias líneas  $R_2$  en las que se estima un único locus del transgén (HCt2.5, HCt2.9, HCt2.16 y HCt2.18; Tabla 4.8), se observó segregación de la resistencia a PPV tanto en plantas seleccionadas en kanamicina como en algunas de las plantas no seleccionadas. La aparición de segregación de la resistencia a PPV en plantas seleccionadas en kanamicina, sugiere que los caracteres de resistencia a kanamicina y de resistencia a PPV no están ligados.

Las líneas HCt2.5 y HCt2.16 no muestran plantas susceptibles a PPV cuando se utilizan plantas no seleccionadas en kanamicina, mientras que si lo hacen con plantas seleccionadas en kanamicina. Tal situación es poco verosímil, puesto que dentro de la población de plantas sin selección, está incluida toda la población de plantas resistentes a kanamicina, donde sí aparecen plantas susceptibles a PPV. Por tanto la ausencia de plantas susceptibles a PPV en el grupo de plantas no seleccionadas en kanamicina, es probablemente debida al azar y propiciada por la utilización de un bajo número de plantas. De hecho, la probabilidad de que las diferencias observadas entre ambos grupos de plantas sea al azar, es ligeramente superior a 0,05 ( $\chi^2$ , 1 grado de libertad; HCt2.5 prob.= 0,16; HCt2.16 prob.= 0,07). Aun así, no se puede descartar la posibilidad de que la germinación de semillas con selección en kanamicina (*in vitro*) o sin selección (en tierra), tengan algún efecto sobre el fenotipo de resistencia a PPV.

Para confirmar la posibilidad de que los caracteres de resistencia a kanamicina y de resistencia a PPV no se encuentren ligados, se recogieron semillas de plantas HCt2.18 no seleccionadas en kanamicina, resistentes o susceptibles a PPV. Estas semillas, correspondientes a la generación  $R_3$ , se germinaron en kanamicina para observar la segregación y estimar la presencia del gen de resistencia a kanamicina en las plantas  $R_2$ . Como se puede observar en la Tabla 4.9 no existe correlación entre la resistencia a PPV y la presencia del gen de resistencia a kanamicina, de manera que ambos caracteres segregan independientemente, al menos en la línea HCt2.18.

**Tabla 4.9.** Segregación de la resistencia a kanamicina en generación  $R_3$

Línea $R_3$	Parental <sup>(a)</sup>	Km <sup>R</sup> /Km <sup>S</sup> <sup>(b)</sup>	Segr. <sup>(c)</sup>	Carácter <sup>(d)</sup>
HCt2.18.1	S	63/0	-	HO
HCt2.18.2	S	52/0	-	HO
HCt2.18.3	S	23/6	3,8:1	he
HCt2.18.4	S	0/75	-	nul
HCt2.18.5	S	78/25	3,1:1	he
HCt2.18.6	R	65/10	6,5:1	he
HCt2.18.7	R	0/57	-	nul
HCt2.18.8	R	0/64	-	nul
HCt2.18.9	R	78/0	-	HO
HCt2.18.10	R	82/19	4,3:1	he
HCt2.18.11	R	72/14	5,1:1	he

(a) Fenotipo de la planta parental resistente (R) o susceptible (S) a PPV.

(b) Número de plántulas resistentes a kanamicina/número de plántulas susceptibles a kanamicina.

(c) Proporción observada entre plántulas resistentes y susceptibles a kanamicina.

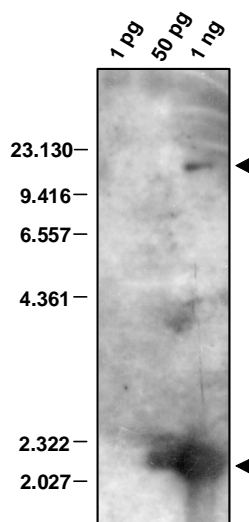
(d) Estimación del carácter de resistencia a kanamicina en la planta parental. HO: en homocigosis; he: en heterocigosis; nul: no presente.

Este hecho sugiere que el locus o los loci del transgén HC-Pro que determinan la resistencia a PPV, no expresan el gen *nptII* de resistencia a kanamicina, por lo que se podría tratar de un inserto parcial, que contenga el gen HC-Pro pero no el gen *nptII*.

#### 4.4.2 Análisis molecular del número de copias del transgén HC-Pro en la línea HCt2

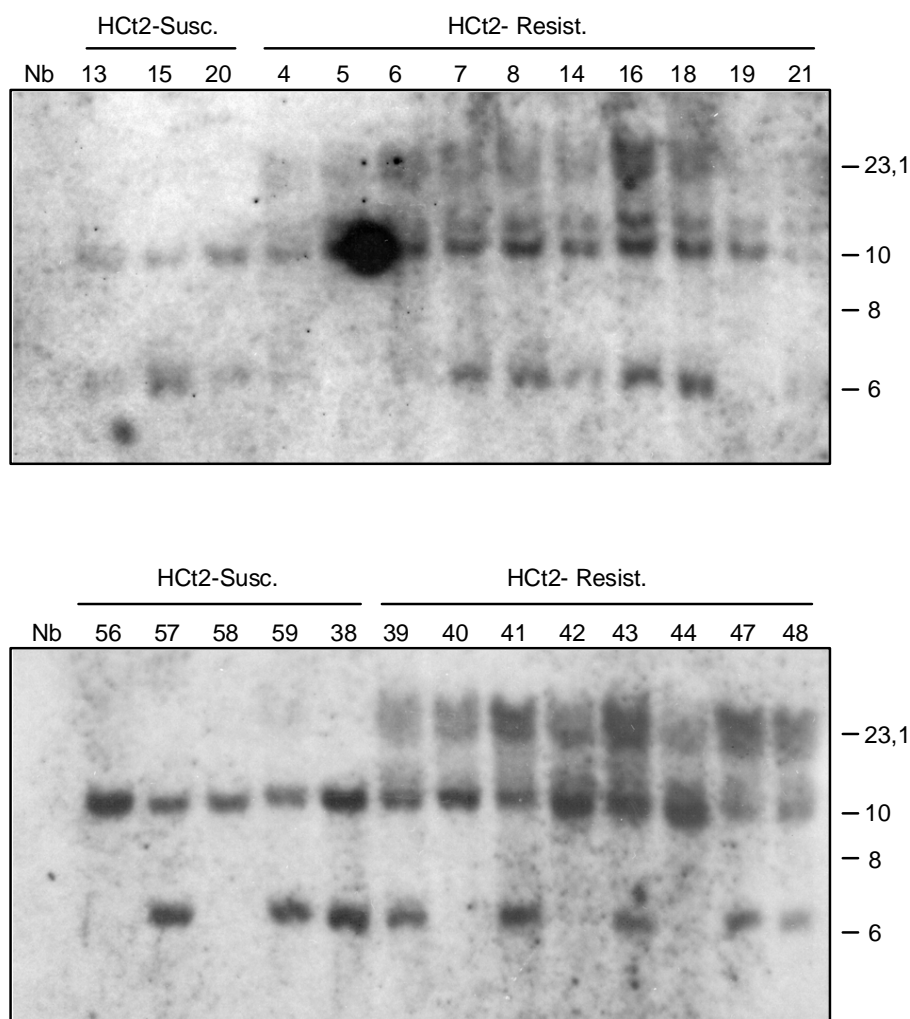
La segregación de la resistencia a kanamicina proporciona una estimación del número de loci del transgén presentes en la planta parental, aunque ofrece varias limitaciones. Únicamente informa del número de loci, de manera que no se puede conocer cuales loci en concreto se encuentran presentes. La presencia de uno de los locus en homocigosis no permite estimar el número total de loci. Tampoco da información sobre el número de copias del T-DNA insertas en una misma posición ya que se comportarían como un solo locus. Además, la estimación se limita a loci en los que el gen de resistencia a kanamicina esté activo. En la transformación pueden integrarse porciones del T-DNA que incluyan el gen de resistencia a kanamicina pero no el transgén HC-Pro o viceversa, tal y como parece observarse en el apartado anterior. Para suplir gran parte de estas carencias, se realizó un análisis molecular mediante Southern blot con una sonda que detecta directamente el transgén HC-Pro, lo que permite detectar porciones del genoma de la planta en los que está integrada esta secuencia y valorar el número de copias del transgén presentes en la planta.

Uno de los factores críticos en este tipo de análisis es la digestión completa del DNA genómico con la enzima de restricción utilizada, en este caso *Bam*HI, ya que las preparaciones de DNA genómico pueden contener inhibidores de algunas enzimas, como polisacáridos. Para comprobar previamente la eficacia de la digestión, se añadió sobre una preparación de DNA genómico de *N. benthamiana* no transgénica plásmido pBI-HCT previamente linearizado con *Eco*RI, y se procedió a digerir la mezcla con *Bam*HI, que tiene una única diana de corte en pBI-HCT. En el ensayo Southern blot se detecta mayoritariamente el fragmento de pBI-HCT producto de la digestión con *Bam*HI (2.161 nt) (Figura 4.16), mientras que solo se detectan trazas de pBI-HCT no digerido (16.142 nt). Por tanto la digestión con *Bam*HI en una preparación de DNA genómico es eficiente.



**Figura 4.16.** Digestión con *Bam*HI de una preparación de DNA genómico de *N. benthamiana* no transgénica al que se han añadido diferentes cantidades de pBI-HCT previamente linearizado con *Eco*RI. Las cantidades correspondientes a 1 pg, 50 pg y 1 ng de pBI-HCT se separaron en un gel y se detectaron los fragmentos derivados de pBI-HCT con una sonda RNA marcada con digoxigenina complementaria a la región *gusA*.

Se procedió a la digestión de DNA genómico de plantas R<sub>1</sub> de la línea HCt2, y posterior análisis de los fragmentos que contienen la secuencia del transgén HC-Pro mediante Southern blot. Se obtuvo un patrón complejo de bandas, de entre 6 y más de 23 Kb (Figura 4.17). No se observa una correlación evidente entre el número de bandas que aparecen en el Southern blot y el número de loci estimados mediante la segregación de la resistencia a kanamicina (Tabla 4.8), lo que corrobora las limitaciones antes expuestas sobre tal método de estimación. Sin embargo, se observan al menos tres bandas, por encima de 10 kb, que están solo presentes en las plantas resistentes a PPV y no en las plantas susceptibles. Este hecho, apoya la hipótesis de que es la presencia de uno o varios loci concretos del transgén HC-Pro, la que induce el PTGS y la consiguiente resistencia a PPV.



**Figura 4.17.** Detección de fragmentos de DNA genómico que contienen la secuencia del transgén HC-Pro. El DNA genómico de plantas R<sub>1</sub> de la línea HCt2 resistentes o susceptibles a PPV, fue digerido con *Bam*HI y sometido a Southern blot. Para la detección se empleó una sonda de DNA marcada con <sup>32</sup>P correspondiente a la región *gusA*. Sobre cada carril se indica el número asignado a cada planta. Las muestras del panel superior proceden de las plantas parentales de las líneas indicadas en la Tabla 4.8. En el margen se indica la posición de los marcadores de peso molecular, en kilobases.

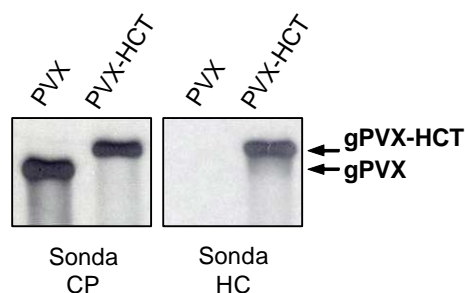
La existencia de bandas exclusivas en las plantas HCT2 resistentes a PPV indica que hay uno o varios loci del transgén HC-Pro asociados al carácter de resistencia a PPV, lo que refuerza que es la presencia o ausencia de este/estos loci lo que determina el estado silenciado del transgén HC-Pro y la resistencia o susceptibilidad a PPV.

#### **4.5. RESISTENCIA A PVX-HCT EN PLANTAS TRANSGÉNICAS HCT Y HCN**

Una de las características de la resistencia a virus mediada por silenciamiento génico postranscripcional, es su capacidad de reconocer como secuencias diana otros virus que presenten un alto grado de homología con el transgén inductor de la resistencia. Esta característica se ha utilizado en diversas ocasiones para probar que la resistencia observada es dependiente de homología de secuencia entre el transgén y el virus (Sijen *et al.*, 1996; Sonoda *et al.*, 1999).

Se comprobó si la resistencia a virus observada en las plantas transgénicas HC-Pro es eficiente frente al virus PVX-HCT, un virus quimérico basado en PVX al que se le ha añadido la secuencia codificante de la proteína HC-Pro de PPV, por lo que debería ser diana del silenciamiento génico inducido por el transgén HC-Pro. Además, este virus es capaz de expresar la proteína HC-Pro, por lo que causa síntomas sinérgicos, caracterizados por necrosis del tejido infectado (ver apartado 4.2.3.1). Como control en los experimentos de resistencia, también empleamos PVX-CP, virus quimérico que contiene la secuencia codificante de la proteína CP de PPV y que no tiene homología con el transgén HC-Pro, por lo que no debería ser diana del PTGS.

Para la producción de gran cantidad de inóculo de PVX-HCT y PVX-CP, necesario para los experimentos de resistencia, se infectaron plantas con transcritos infectivos de estos virus y se prepararon extractos de hojas sistémicas con síntomas. La utilización de estos virus quiméricos tiene como inconveniente que durante el proceso de infección las secuencias añadidas tienden a deleccionarse, de manera que surgen poblaciones virales que han perdido total o parcialmente el inserto. Por tanto, existe la posibilidad de que en el inóculo haya virus deleccionados que hayan perdido completamente el inserto HCT, y que no serían diana del PTGS inducido por el transgén HC-Pro. Para reducir la probabilidad de que esto suceda, el inóculo se obtuvo a partir de las primeras hojas infectadas sistémicamente, en las que es poco probable la presencia de formas deleccionadas de los virus quiméricos, como se ha podido comprobar en trabajos previos de nuestro laboratorio (González Jara, 2002). Se analizó mediante Northern blot la acumulación del RNA genómico de PVX-HCT en tejido equivalente al empleado para preparar el inóculo (Figura 4.18). Se detectó una sola banda correspondiente al RNA genómico de PVX-HCT, mientras que no se detectó ningún RNA de tamaño inferior atribuible a PVX con el inserto HCT deleccionado.



**Figura 4.18.** Análisis del RNA genómico de PVX-HCT en tejido equivalente al utilizado para preparar inóculo. Se utilizó una muestra con PVX como referencia de tamaño. El RNA viral se detectó con sondas de RNA marcadas con digoxigenina complementarias al gen de la proteína CP de PVX o a la secuencia HCT.

#### 4.5.1 Análisis de la resistencia a PVX-HCT

Se inocularon con PVX-CP o con PVX-HCT plantas  $R_1$  de líneas HCn y HCT que mostraron fenotipo de resistencia o susceptibilidad frente a PPV 5.15, y plantas control transformadas con pBI121.

Todas las plantas inoculadas con PVX-CP, independientemente de que pertenecieran a líneas con resistencia a PPV o no, mostraron síntomas de infección viral a 6 días después de la inoculación. Los síntomas consistieron en aclaramiento de venas en las primeras hojas infectadas sistémicamente y mosaico en las hojas surgidas posteriormente.

En cuanto a las plantas inoculadas con PVX-HCT, todas las plantas control (línea C12), HCn15 y HCT1 mostraron síntomas de infección viral, como era de esperar atendiendo a su fenotipo de susceptibilidad a PPV. Los síntomas consistieron en aclaramiento de venas a 6 días después de la inoculación, que derivaron en necrosis del tejido infectado y muerte de la planta a 12 días después de la inoculación. El comportamiento fue distinto en las líneas HCT2, HCT13, HCn9 y HCn11 (Figura 4.19). Una proporción de plantas de cada línea mostró síntomas de infección viral que derivaron en necrosis y muerte de la planta, de manera similar a lo observado en las líneas C12, HCn15 y HCT1, por lo tanto estas plantas pueden considerarse susceptibles a PVX-HCT. Otra proporción de plantas de cada línea mostró síntomas consistentes en aclaramiento de venas y mosaico, que no derivó en necrosis severa del tejido infectado, y por último el resto de plantas no mostró síntomas de infección viral (Figura 4.19). Ambos casos difieren de lo observado en las plantas control, por lo que pueden considerarse manifestaciones de resistencia a PVX-HCT.

Por tanto, estos resultados confirman que la resistencia a virus en las plantas HC-Pro es efectiva frente a un virus quimérico con homología al transgén HC-Pro, lo que confirma que la resistencia es específica de homología de secuencia. A diferencia de la resistencia a PPV, que se manifiesta como ausencia total de síntomas, la resistencia a PVX-HCT se manifiesta de dos maneras, la ausencia total de síntomas o la ausencia de síntomas necróticos característicos del virus PVX-HCT.

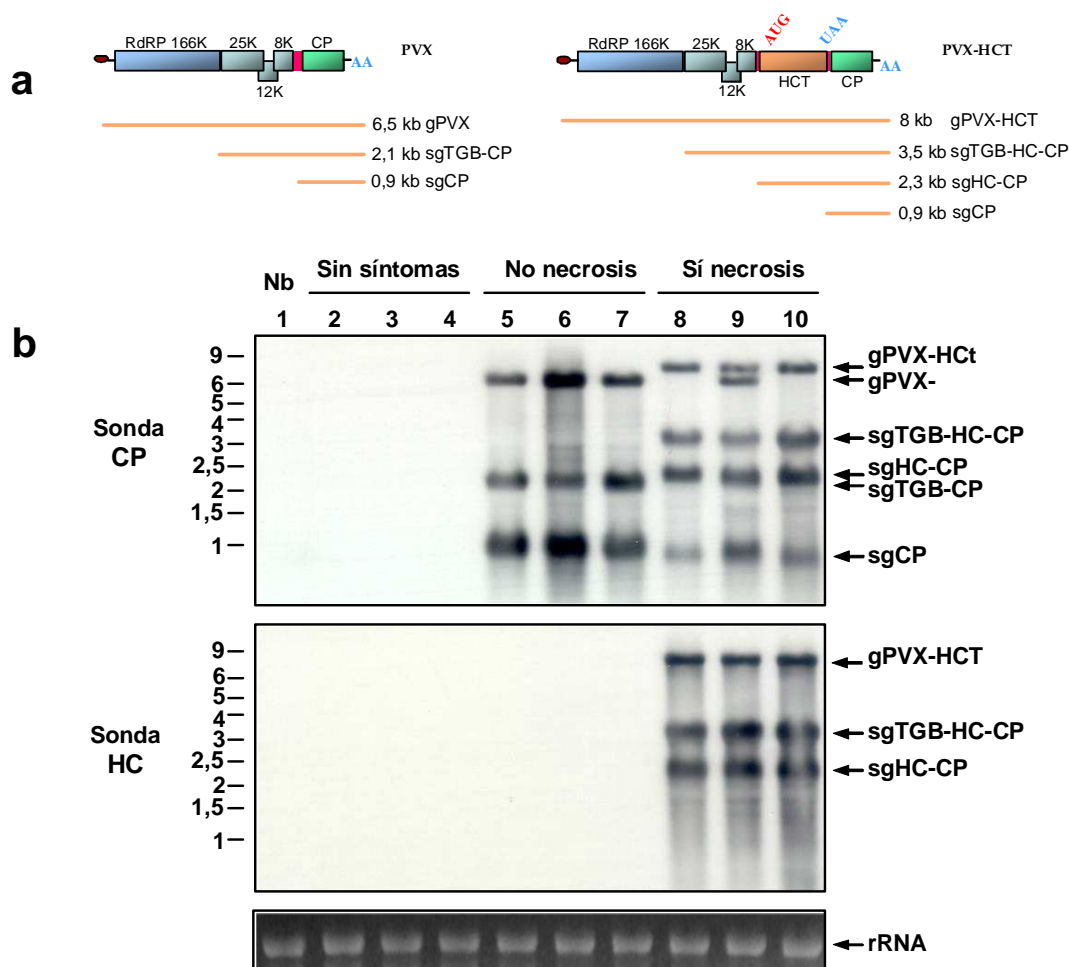
	PVX-CP		PVX-HCT		
	Nº sin síntomas	Nº con síntomas	Nº sin síntomas	Nº no necrosis	Nº sí necrosis
C12	0	3	0	0	3
HCT1	0	3	0	0	3
HCn15	0	3	0	0	3
HCT2	0	5	2	6	2
HCT13	0	5	2	5	2
HCn9	0	5	1	7	2
HCn11	0	5	1	8	1

**Figura 4.19.** Número de plantas seleccionadas en kanamicina e inoculadas con PVX-CP o PVX-HCT que mostraron cada tipo de síntoma.

#### 4.5.2 Análisis molecular de PVX-HCT

Para determinar cual es la causa de la aparición de las dos formas de resistencia a PVX-HCT descritas en el apartado anterior, se analizó la acumulación de RNA viral de PVX-HCT en plantas HCT2 que no mostraron síntomas de infección, mostraron síntomas sin necrosis o mostraron síntomas con necrosis generalizada (Figura 4.20). Se utilizó una sonda complementaria al gen de la proteína CP que detecta todos los RNA derivados del virus, tanto genómicos (g) como subgenómicos (sg), y también una sonda complementaria al gen HC-Pro que detecta todos menos el subgenómico de la proteína CP. En las plantas asintomáticas no se observó acumulación viral con ninguna de las dos sondas, lo cual es consistente con la ausencia total de síntomas (Fig. 4.20b, carriles 2-4). En las plantas que mostraron necrosis se observó con la sonda CP el RNA genómico y los tres RNAs subgenómicos con los tamaños esperados para PVX-HCT, lo que concuerda con los síntomas de necrosis generalizada, que requieren la presencia del inserto HCT completo para la expresión de proteína HC-Pro (Fig. 4.20b, carriles 8-10). En una de las muestras se observó además un RNA extra de tamaño inferior al genómico de PVX-HCT, que por su tamaño podría corresponder a PVX con la secuencia HCT delecionada (Fig. 4.20b, carril 9). Con la sonda HC-Pro, en estas plantas se observaron el RNA genómico de PVX-HCT y los subgenómicos correspondientes a TGB-HCT-CP y a HCT-CP (Fig. 4.20b, carriles 8-10). En las plantas que mostraron síntomas pero sin necrosis, con la sonda CP se observaron tres RNAs que por tamaño podrían corresponder al RNA genómico de PVX y subgenómicos TGB-CP y CP en los que se ha delecionado la secuencia HCT (Figura 4.20b, carriles 5-7). Con la sonda HC-Pro no se detectaron RNAs del virus en estas plantas lo que confirma la pérdida de la secuencia HCT. Por tanto, el fenotipo de síntomas sin necrosis parece ser causado por la pérdida de la secuencia HCT en la quimera PVX-HCT y la consiguiente falta de proteína HC-Pro responsable de los síntomas necróticos.



**Figura 4.20.** (a) Organización genómica de los virus PVX y PVX-HCT, y tamaño de los RNAs genómicos (g) y subgenómicos (sg). La proteína 166K es la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP) encargada de la replicación viral. Las proteínas 25K, 12K y 8K están implicadas en el movimiento del virus célula a célula y a larga distancia, y constituyen el 'bloque de genes triple' (TGB). CP es la proteína de la cápsida. (b) Análisis de la acumulación de RNAs genómicos (g) y subgenómicos (sg) de PVX-HCT en plantas Hct2 sin síntomas de infección viral, con síntomas sin necrosis y con síntomas necróticos. Las muestras de tejido se tomaron antes de la aparición de necrosis. Se usaron sondas de RNA marcadas con digoxigenina complementarias al gen de la proteína CP (sonda CP) o a la secuencia HCT (sonda HC). Se indica la posición de los marcadores de peso molecular (en kilobases) y a cual de los RNA de PVX-HCT corresponde cada banda según su tamaño. Como control de carga se muestra una tinción con bromuro de etidio de rRNA.

El fenotipo de síntomas con necrosis observado en algunas plantas Hct2, Hct13, Hcn9 y Hcn11 es similar al que se produce en las plantas control y se corresponde con la acumulación del virus completo, por lo que se pueden considerar como susceptibles a la infección por PVX-HCT. Estas plantas probablemente corresponden a plantas sin PTGS del transgén HC-Pro y equivalentes a las susceptibles a PPV. Los otros dos fenotipos, difieren del observado en las plantas control, por tanto se pueden considerar manifestaciones de resistencia. Estas, probablemente corresponden a plantas con PTGS del transgén HC-Pro, equivalentes a las resistentes a PPV. Sin embargo, algunas de estas plantas presentan una ausencia total de síntomas y de acumulación viral, mientras que el resto de plantas únicamente presentan ausencia de síntomas necróticos y acumulación de virus con pérdida del inserto HCT.

### **4.5.3 Factores determinantes de la resistencia a PVX-HCT**

Se plantearon que factores podrían determinar la aparición de plantas sin síntomas o con síntomas no necróticos. La aparición de uno u otro fenotipo podría estar condicionada por factores genéticos, tales como el número de copias del transgén o el estado en homocigosis o en heterocigosis del supuesto locus que determina la resistencia. Alternativamente la aparición de uno u otro fenotipo podría estar condicionada por factores ambientales de las plantas, o bien por factores relativos al inóculo empleado.

La proporción observada de plantas sin síntomas, con síntomas no necróticos y con síntomas necróticos en las cuatro líneas que muestran resistencia, es próxima a 1/4, 2/4 y 1/4 respectivamente. Esta proporción coincide con la esperada para un carácter determinado por un único locus, lo que invita a plantear una hipótesis basada en el estado de homocigosis o heterocigosis del locus inductor de la resistencia. En el supuesto de que el locus inductor de la resistencia pudiera inducir un mecanismo de resistencia más potente al estar en homocigosis, el fenotipo sin síntomas podría darse en las plantas homocigotas para este locus y estar causado por un bloqueo total de la infección con PVX-HCT. La aparición de síntomas no necróticos podría darse en las plantas heterocigotas para el locus inductor de la resistencia y estar causado por un bloqueo solo parcial de la infección por PVX-HCT, lo que podría permitir la aparición de variantes de PVX sin inserto HC-Pro. Por último, el fenotipo de síntomas necróticos se daría en las plantas donde falta el locus determinante de la resistencia y por tanto la infección por PVX-HCT sigue su curso normal. Si esta hipótesis es cierta, implicaría que las plantas progenie de plantas sin síntomas serían todas homocigotas y presentarían todas el fenotipo sin síntomas, mientras que la progenie de plantas con síntomas no necróticos presentarían los tres fenotipos, debido a la segregación del locus determinante de la resistencia.

Para confirmar o discriminar esta hipótesis, se analizó la resistencia a PVX-HCT y a PPV 5.15 en la progenie ( $R_2$ ) de plantas HCt2 sin síntomas o con síntomas no necróticos. Las líneas HCt2.5p y HCt2.7p, progenie de plantas con síntomas no necróticos, mostraron segregación de la resistencia a PVX-HCT, (Tabla 4.10) aunque en la línea HCt2.7p se observaron abundantes plantas con susceptibilidad a PVX-HCT y ninguna sin síntomas. Ambas líneas mostraron igualmente segregación de la resistencia a PPV. Las líneas HCt2.1p y HCt2.2p, progenie de plantas sin síntomas, también mostraron segregación de la resistencia a PVX-HCT, apareciendo los tres fenotipos posibles. También se observó segregación de la resistencia a PPV en HCt2.2p, aunque no en HCt2.1p. La segregación de la resistencia en estas dos líneas, HCt2.1p y HCt2.2p, indica que el locus determinante de la resistencia no estaba necesariamente en homocigosis en la planta parental, y por tanto desmiente la hipótesis planteada en base a la homocigosis o heterocigosis del locus. En el caso de plantas con síntomas necróticos no fue posible el análisis de la progenie  $R_2$ , debido a la necrosis y muerte que sufren las plantas antes de su floración.

**Tabla 4.10.** Resistencia a PVX-HCT y a PPV 5.15 en plantas de líneas R<sub>2</sub> no seleccionadas en kanamicina.

Línea R <sub>2</sub>	Parental <sup>(a)</sup>	Km <sup>R</sup> / Km <sup>S</sup> <sup>(b)</sup>	Prob. $\chi^2$ <sup>(c)</sup>	PPV 5.15	PVX-HCT		
				Inf./total <sup>(d)</sup>	Nº sin síntomas	Nº no necrosis	Nº si necrosis
HCt2.1p	Sin sint.	170/1	0,30 (63:1)	0/18	5	2	2
HCt2.2p	Sin sint.	193/15	0,57 (15:1)	7/20	5	2	3
HCt2.5p	No necro.	133/7	0,54 (15:1)	5/20	4	2	5
HCt2.7p	No necro.	68/23	0,95 (3:1)	7/19	0	6	9

- (a) Fenotipo de la planta parental tras la inoculación con PVX-HCT, sin síntomas o con síntomas no necróticos.
- (b) Número de plantas resistentes a kanamicina/número de plantas susceptibles a kanamicina.
- (c) Probabilidad asociada a la prueba  $\chi^2$  para la segregación teórica indicada entre paréntesis. Con probabilidades >0,05 se acepta que las diferencias entre la segregación observada y la teórica sean debidas al azar.
- (d) Número de plantas susceptibles a PPV 5.15/número de plantas inoculadas.

Otra posible causa determinante de la aparición de los fenotipos sin síntomas o con síntomas no necróticos podría ser la heterogeneidad del inóculo. Como ya se ha citado anteriormente, durante la infección los virus PVX quiméricos tienden a perder el gen insertado. En el análisis mostrado en la figura 4.18, no se detecta claramente acumulación de virus con el inserto HCT deleccionado, sin embargo no se puede descartar que esté presente en muy baja proporción. Si el inóculo de PVX-HCT empleado contiene una población del virus que ha perdido el inserto HCT, tales virus no serían diana del mecanismo de resistencia y podrían infectar la planta a pesar del silenciamiento del transgén HC-Pro. En tal caso, la aparición de plantas sin síntomas o con síntomas no necróticos podría estar condicionada por la probabilidad de que la planta recibiera o no en la inoculación una partícula viral con el inserto HCT deleccionado. Para probar esta hipótesis se diluyó el inóculo empleado, de forma que el número total de puntos de entrada de partículas virales en la hoja inoculada se redujera, y por tanto, la probabilidad de que en una hoja inoculada caiga una partícula viral con el inserto HCT deleccionado sea menor.

Para ello, se inocularon plantas HCt2 con el inóculo de PVX-HCT empleado en los anteriores experimentos (1/1) y con una dilución 1/10 de este. También se inocularon plantas *N. benthamiana* no transgénicas para confirmar la capacidad de estas diluciones de infectar la totalidad de las plantas. Todas las plantas *N. benthamiana* inoculadas con la dilución 1/1 o la 1/10 resultaron infectadas, mostrando necrosis, por tanto la dilución 1/10 del inóculo es capaz de infectar un 100% de las plantas. En plantas HCt2 inoculadas con PVX-HCT 1/1 se obtuvo una proporción de plantas con los tres fenotipos similar a la observada en los anteriores experimentos (Tabla 4.11). Sin embargo, con el inóculo PVX-HCT 1/10 la proporción de plantas sin síntomas fue sensiblemente mayor, en detrimento del número de plantas con síntomas no necróticos. La probabilidad de que las diferencias entre los resultados con PVX-HCT 1/1 y con PVX-HCT 1/10 sean al azar es de 0,01 ( $\chi^2$ , 2 grados de libertad), inferior a 0,05, lo que apoya que hay diferencias reales no debidas al azar. Por tanto estos resultados apoyan la hipótesis planteada de que el fenotipo de síntomas no necróticos podría ser consecuencia de la existencia en el inóculo de una población minoritaria de PVX con el inserto HCT deleccionado.

**Tabla 4.11.** Efecto de la dilución del inóculo PVX-HCT en la proporción de plantas con cada fenotipo de resistencia.

	Inoc. PVX-HCT	Nº sin síntomas	Nº sin necrosis	Nº con necrosis
Nb	1/1	0	0	9
HCT2	1/1	6	8	5
Nb	1/10	0	0	9
HCT2	1/10	11	2	7

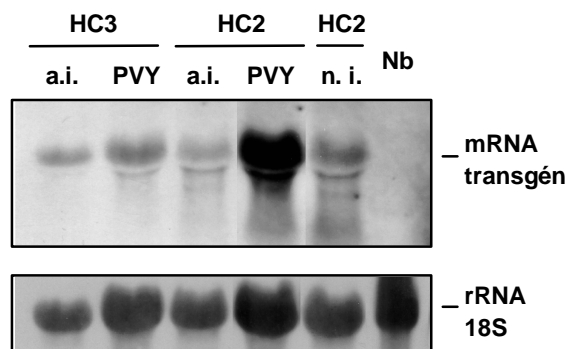
#### 4.6. SUPRESIÓN DE PTGS Y RESISTENCIA A PPV MEDIANTE INFECCIÓN CON OTROS VIRUS

En las plantas transgénicas HCt presentadas en este trabajo, la proteína HC-Pro de PPV expresada por el transgén no mostró actividad relacionada con la supresión de silenciamiento génico (Ver capítulo 4.2.3). Además, se establece PTGS del transgén HC-Pro en algunas de las líneas HCt, lo que indica que la proteína HC-Pro codificada por el transgén no interfiere con el PTGS inducido por el propio transgén. Se probó si la expresión de altos niveles de proteína HC-Pro a partir de una infección viral con otro potyvirus distinto de PPV tiene capacidad para interferir con el PTGS del transgén HC-Pro y con la resistencia a PPV. Para ello utilizamos PVY, que no es diana de la resistencia mediada por el transgén HC-Pro de PPV y por tanto puede infectar normalmente las plantas transgénicas (Ver Tabla 4.6).

##### 4.6.1 Supresión de PTGS mediante infección con PVY

Se infectaron con PVY plantas de la línea HCt2 con el fin de observar supresión del PTGS en tejido infectado. Para utilizar únicamente plantas silenciadas de la línea HCt2 se seleccionaron plantas provenientes de los experimentos de expresión transitoria del gen *gusA* que presentaron baja expresión de proteína GUS (capítulo 4.3.7). Se analizó la acumulación de mRNA del transgén HC-Pro en plantas HCt2 silenciadas antes y después de la infección con PVY. Igualmente se analizó la variación en la acumulación del mRNA en plantas HCt3 no silenciadas y en plantas HCt2 no infectadas con PVY.

En plantas HCt2 silenciadas se observó un incremento de aproximadamente 5 veces en la acumulación de mRNA tras la infección con PVY (Figura 4.21). En plantas HCt3 no silenciadas no se observó tal incremento tras la infección con PVY. Igualmente plantas HCt2 no infectadas con PVY pero muestreadas al mismo tiempo que las infectadas, tampoco mostraron incremento en la acumulación de mRNA, lo que indica que tal incremento es efectivamente causado por la infección con PVY y que solo se produce en plantas previamente silenciadas.



**Figura 4.21.** Análisis de la acumulación de mRNA del transgén HC-Pro en plantas antes de la inoculación con PVY (a.i.), después de la infección con PVY (PVY) o no infectadas (n.i.). Para la detección del mRNA del transgén se empleó una sonda de RNA marcada con digoxigenina complementaria a la porción *gusA* del transgén. Como control de carga se muestra la detección de rRNA.

Por tanto, estos resultados indican que la infección con PVY es capaz de suprimir el silenciamiento del transgén HC-Pro de PPV.

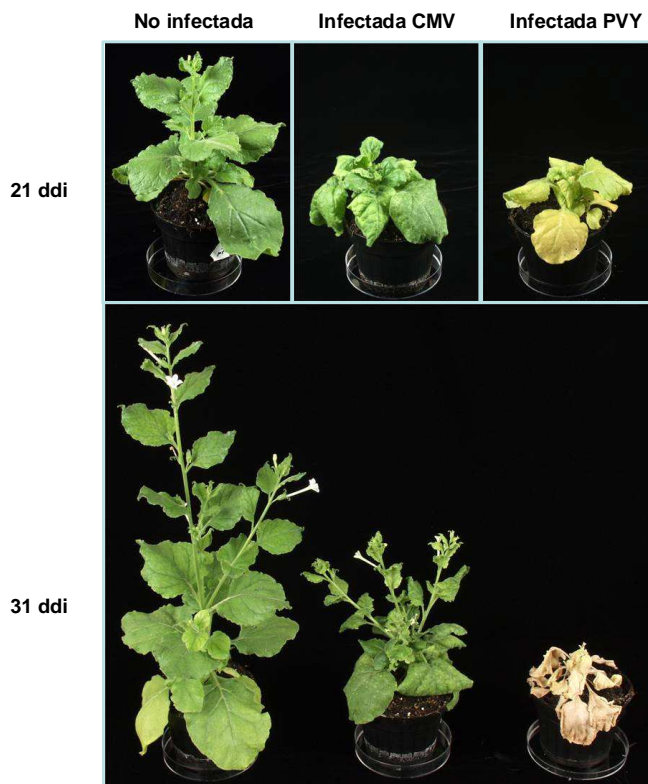
Tras estos resultados sería de esperar que la infección con PVY interfiriese con la resistencia frente a PPV. Para determinarlo, se inocularon con PPV plantas HCt2 y HCt3, a 6 días después de la inoculación con PVY. En ninguna de las plantas inoculadas de ambas líneas se detectó consistentemente PPV, mediante RT-PCR en hojas inoculadas o mediante ELISA en tejido sistémico (no mostrado). Puesto que la línea HCt3 no es resistente a PPV, la no detección del virus indica que la infección previa con PVY dificulta la posterior infección con PPV.

Las plantas infectadas con PVY muestran una atrofia del tejido infectado (Figura 4.22), lo que podría dificultar el transporte de PPV desde las hojas inoculadas hacia las hojas sistémicas. Además, las hojas infectadas con PVY se deterioraron sensiblemente en pocos días tras la inoculación con PPV. Por ello, para determinar si la resistencia a PPV se ve comprometida en las plantas transgénicas HC-Pro tras la infección con un virus supresor de PTGS, se utilizó el virus CMV que no produce una sintomatología en las plantas infectadas tan severa como PVY.

#### 4.6.2 Supresión de PTGS mediante infección con CMV

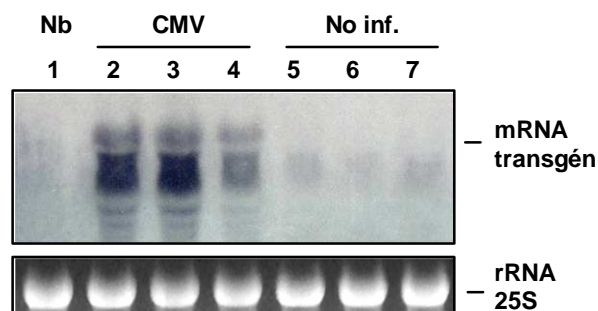
La infección con CMV produce una sintomatología menos severa que la observada en PVY (Figura 4.22), de manera que las plantas continúan desarrollándose una vez infectadas.

A diferencia del HC-Pro de potyvirus, la proteína supresora de PTGS de CMV, denominada 2b, no es capaz de suprimir el PTGS en el tejido ya silenciado cuando llega el virus, sino que solo es capaz de evitar el establecimiento de PTGS en el tejido que surge *de novo*, una vez infectada la planta (Brigneti *et al.*, 1998).



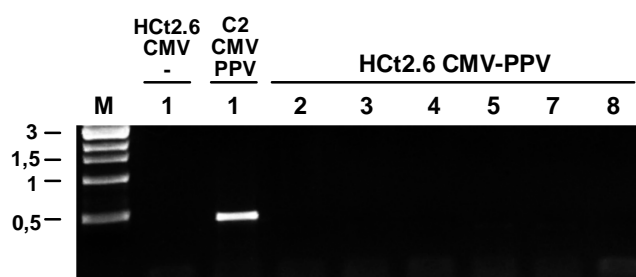
**Figura 4.22.** Aspecto de plantas de *N. benthamiana* no infectada, infectada con CMV o infectada con PVY a 21 o 31 días después de la inoculación de los virus.

Para comprobar la supresión de PTGS por parte de CMV, se compararon los niveles de mRNA del transgén HC-Pro en plantas infectadas y no infectadas con CMV. En esta ocasión se utilizó la línea Hct2.6, en la que se ha comprobado que hay un 100% de resistencia a PPV con un elevado número de plantas. Los primeros síntomas sistémicos de infección con CMV aparecieron a 6 dpi. Las muestras de tejido se tomaron a 10 dpi a partir de hojas sistémicas superiores a las primeras que mostraron síntomas. Las plantas infectadas con CMV acumularon, aunque con variaciones, mayor cantidad de mRNA del transgén que las plantas no infectadas (Figura 4.23), lo que confirma que la infección sistémica de CMV es capaz de revertir el estado silenciado del transgén HC-Pro en hojas superiores, probablemente por mediación de la proteína 2b.



**Figura 4.23.** Análisis de la acumulación de mRNA del transgén HC-Pro en plantas infectadas con CMV o sin infectar. Las muestras se tomaron a 10 dpi de tejido sistémico desarrollado después de la aparición de los primeros síntomas a 6 dpi. La detección del mRNA del transgén se realizó con una sonda de RNA marcada con digoxigenina, complementaria a la mitad 5' de la región *gusA* del transgén.

Se inocularon con PPV 5.15 plantas infectadas con CMV, en hojas equivalentes a las utilizadas para analizar los niveles de mRNA. Además de las plantas HCt2.6, se emplearon plantas control transformadas con el vector pBI121 (línea C2). Tras 15 días después de la inoculación con PPV (25 dpi con CMV), se analizó la presencia de PPV en las hojas inoculadas mediante RT-PCR. Se detectó un producto de PCR del tamaño esperado (447 nt) en la muestra de planta C2 inoculada con PPV (Figura 4.24), lo que indica que PPV es capaz de acumularse en la hoja inoculada de una planta no resistente a PPV previamente infectada con CMV. Sin embargo no se observó tal producto de PCR en las muestras de plantas HCt2.6 inoculadas con PPV. Esto sugiere una ausencia de acumulación viral a niveles detectables en las hojas inoculadas de estas plantas, aunque no es totalmente seguro ya que en ningún caso se empleó todo el tejido inoculado para la extracción de RNA y posterior análisis de la presencia de CMV.



**Figura 4.24.** Detección de PPV en hojas inoculadas mediante RT-PCR. Las plantas infectadas con CMV a 10 dpi se inocularon con PPV. Se analizó la presencia de PPV tras 15 dpi en hoja inoculada de plantas HCt2.6 o C2. Como control negativo se empleó una planta HCt2.6 infectada con CMV y no inoculada con PPV. Se indica el tamaño de los marcadores de peso molecular en kilobases.

A continuación, se analizó la acumulación de PPV en tejido sistémico en estas mismas plantas mediante ELISA, a 21 y 35 días después de la inoculación con PPV. Se detectó acumulación de PPV en tejido sistémico en 2 de 4 plantas C2 inoculadas, lo que indica que la infección con CMV dificulta la infección posterior con PPV (Figura 4.25a). Sin embargo, en caso de infectar la planta, los niveles de acumulación de PPV son similares a los alcanzados en una planta no infectada previamente con CMV. Por tanto la infección por CMV parece afectar a la eficiencia de inoculación con PPV. Igualmente se detectó acumulación de PPV en tejido sistémico en 1 de 9 plantas HCt2.6 infectadas con CMV e inoculadas con PPV. Los niveles de acumulación de PPV alcanzados en esta planta son similares o ligeramente inferiores a los observados en plantas C2 no resistentes a PPV (Figura 4.25a). En esta misma planta no se detectó presencia de PPV en las hojas inoculadas (Figura 4.24, muestra HCt2 CMV-PPV 2), probablemente debido a que en el análisis solo se empleó parte del tejido inoculado. Teniendo en cuenta que la línea HCt2.6 con bastante probabilidad es 100% resistente a PPV (ver Tabla 4.8, 0 plantas susceptibles de 39 inoculadas con PPV), la aparición de esta planta HCt2.6 infectada sugiere que la infección con CMV ha sido capaz de interferir con la resistencia a PPV.

Para confirmar este resultado se realizó un segundo experimento, en las mismas condiciones que el anterior, pero con un mayor número de plantas. Mediante ELISA se analizó la acumulación de PPV en tejido sistémico. A 21 días después de la inoculación con PPV, 5 de 6 plantas C2 resultaron infectadas. En el caso de plantas



## 4.7. ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD SUPRESORA DE PTGS DE LA PROTEÍNA P29 DE CHV1 EN PLANTAS

La proteína p29 del virus de hongos CHV1 es un factor de patogenicidad implicado en la determinación de los síntomas virales, y necesario para que se produzca una correcta acumulación del RNA viral (Suzuki *et al.*, 2003). Estas propiedades son comunes entre los supresores de PTGS de virus de plantas, lo que sugiere que la proteína p29 podría desempeñar estas funciones mediante supresión de PTGS. Además, esta proteína tiene una alta homología con parte de las secuencias amino acídicas de las proteínas HC-Pro de diversos potyvirus, lo que apoya la posibilidad de que se trate de un supresor de PTGS.

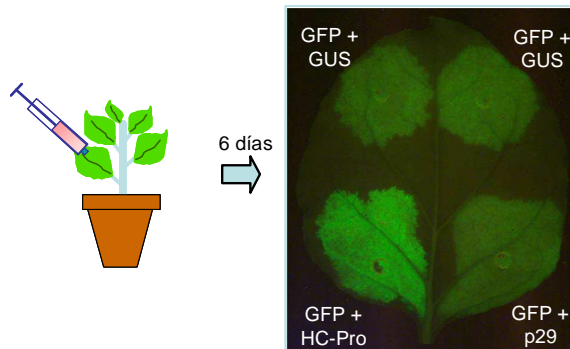
Por lo tanto, se consideró interesante investigar la capacidad supresora de PTGS de la proteína p29 de CHV1 en plantas. Para ello, se observó su capacidad de suprimir el silenciamiento de la proteína GFP expresada transitoriamente, y su capacidad de inducir sinergismo en una infección con PVX, como se describe a continuación.

### 4.7.1 Supresión del PTGS de la proteína GFP

La expresión transitoria de proteína GFP mediante agroinfiltración se ha utilizado en numerosas ocasiones para caracterizar supresores de PTGS en plantas, debido a su sencillez de uso y rapidez (Johansen y Carrington, 2001; Dunoyer *et al.*, 2002; Qu *et al.*, 2003). La expresión transitoria de GFP alcanza su máximo a 2-3 días después de la agroinfiltración y a partir de entonces su expresión comienza a decaer como consecuencia del silenciamiento dirigido frente a su mRNA. Sin embargo en presencia de un supresor de PTGS, la expresión de GFP se mantiene estable durante más tiempo (Johansen y Carrington, 2001).

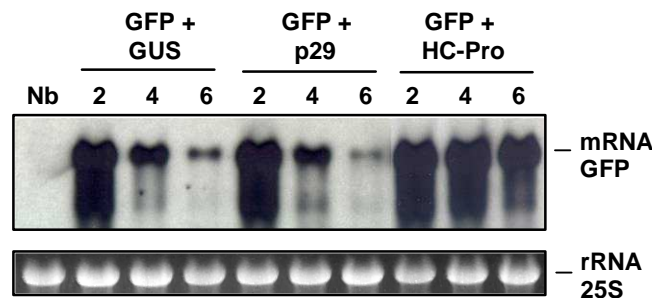
Para realizar este tipo de ensayo, se clonó el gen de la proteína p29 de CHV1 en un vector para expresión transitoria en plantas. La construcción generada, denominada pCAM-p29, contiene la secuencia codificadora de la proteína p29, con un codón de iniciación de la traducción ATG al inicio y un codón de terminación TAA al final, bajo el control del promotor 35S de CaMV y la región 5' no traducible de TEV. El ensayo se realizó paralelamente con una construcción denominada pEG5'PPV, que expresa la porción 5' del genoma de PPV que incluye el gen de la proteína P1, la HC-Pro y parte de la P3, y que expresa elevados niveles de proteína HC-Pro.

Se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con la construcción pSLJ-GFP más las construcciones pCAM-p29, pEG5'PPV o pCAMBIA1305.1 que codifica para la proteína GUS y que sirvió como control negativo. A partir de 1-2 días tras la agroinfiltración se comenzó a observar luminiscencia de la proteína GFP en las áreas agroinfiltradas, con una intensidad similar en las tres combinaciones ensayadas. A partir del 3-4 día la intensidad de la luminiscencia en las áreas agroinfiltradas con GFP más pCAMBIA1305.1 o con GFP más pCAM-p29 no aumentó sensiblemente, siendo similar en los dos casos. La intensidad de la luminiscencia en las áreas agroinfiltradas con GFP más pEG5'PPV sin embargo, siguió aumentando ligeramente hasta el 5-6 día en que la intensidad fue sensiblemente mayor a la observada en las otras dos combinaciones (Figura 4.26).



**Figura 4.26.** Expresión transitoria mediante agroinfiltración de proteína GFP, en combinación con las construcciones pCAMBIA1305.1 (GUS), pCAM-p29 (p29) y pEG5'PPV (HC-Pro). Cada combinación se infiltró en una o varias áreas de hojas de *N. benthamiana*. La foto mostrada corresponde a 6 días después de la agroinfiltración.

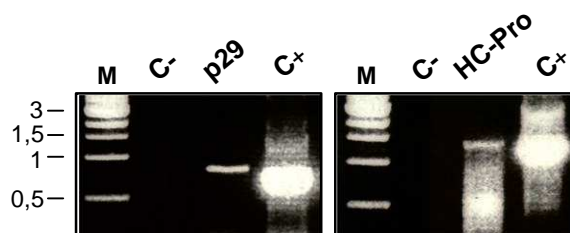
Además, se analizó el patrón de expresión de GFP a nivel de mRNA a 2, 4 y 6 días después de la agroinfiltración. En tejido agroinfiltrado con la construcción GFP más pCAMBIA1305.1, la acumulación de mRNA de GFP alcanza su máximo a 2 días y va disminuyendo gradualmente a los 4 y 6 días (Figura 4.27). El mismo patrón se observa en tejido agroinfiltrado con GFP más pCAM-p29. En tejido agroinfiltrado con GFP más pEG5'PPV, la acumulación de mRNA de GFP es similar a la observada en las otras combinaciones a 2 días, aunque a diferencia de estas, apenas disminuye a 4 y 6 días.



**Figura 4.27.** Análisis de la acumulación de mRNA de GFP en tejido agroinfiltrado con la construcción GFP más pCAMBIA1305.1 (GUS), pCAM-p29 (p29) o pEG5'PPV (HC-Pro), a 2, 4 y 6 días después de la agroinfiltración. La detección del mRNA de GFP se realizó con una sonda complementaria de RNA marcada con digoxigenina.

Los resultados de estos experimentos indican que la construcción pEG5'PPV es capaz de suprimir el silenciamiento de la GFP. Sin embargo la construcción pCAM-p29 no varía el patrón de expresión normal de GFP, lo que sugiere que la proteína p29 de CHV1 no tiene capacidad para suprimir el silenciamiento génico de la construcción GFP.

Se comprobó si las construcciones pCAM-p29 y pEG5'PPV se expresan correctamente en la planta. En el caso de la proteína p29, no se dispone de un anticuerpo capaz de detectar la proteína. Por tanto se analizó la presencia de mRNAs de ambas construcciones mediante RT-PCR. En ambos casos se detectan productos de RT-PCR del tamaño esperado (Figura 4.28). Tales productos de PCR no se detectaron en los controles negativos (sin RT), por lo que el producto de PCR proviene de transcritos de RNA y no de restos de DNA en las muestras. Por tanto ambas construcciones se expresan en la planta.

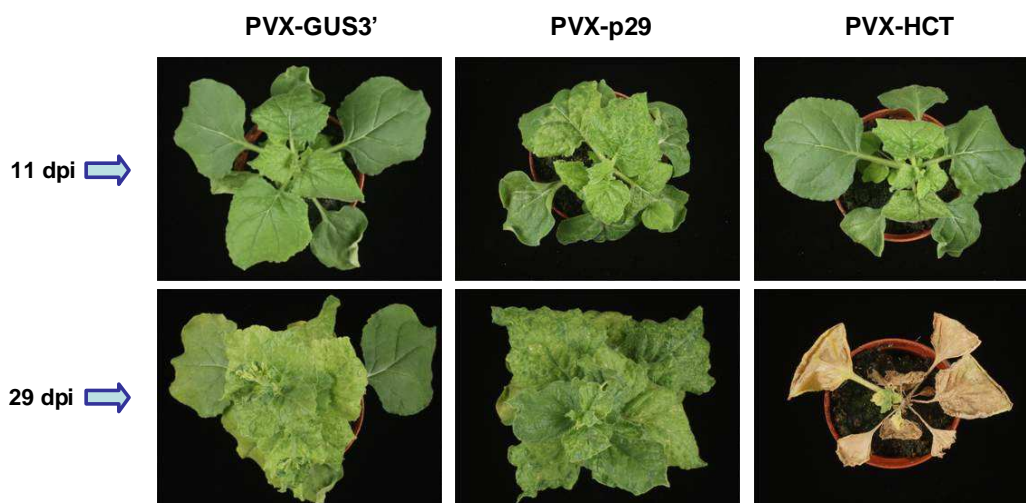


**Figura 4.28.** Detección mediante RT-PCR de transcritos de la construcción pCAM-p29 (p29) o de pEG5'PPV (HC-Pro) en tejido agroinfiltrado. Las extracciones de RNA total se trataron con DNasa I, y se usaron 0,1  $\mu$ g de RNA total para la RT. C-: controles de falso positivo por contaminación con restos de DNA: muestras donde se realizó todo el procedimiento menos la RT. C+: control positivo de la PCR; se utilizó como molde un plásmido que porta la secuencia p29 o HC-Pro. Se indica el tamaño de los marcadores de peso molecular en kilobases.

#### 4.7.2 Sinergismo en infección con PVX

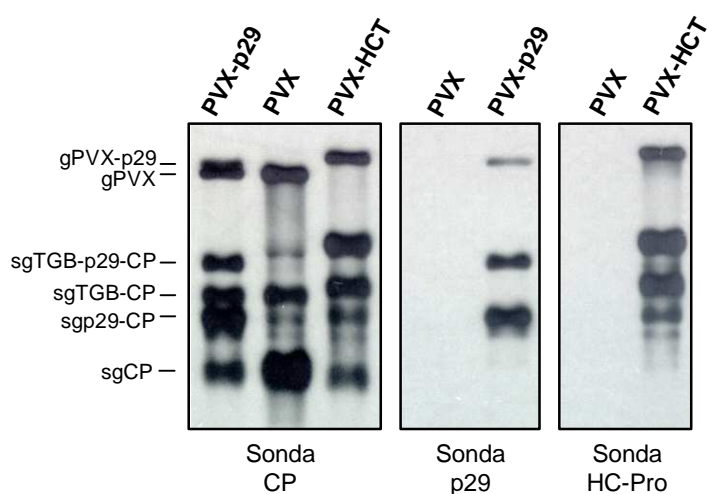
Como se ha descrito anteriormente (Capítulos 1.1.5 y 4.2.3.1), la exacerbación de síntomas o sinergismo en infecciones con PVX, es otra propiedad habitual de los supresores de PTGS en plantas. Para comprobar si la proteína p29 de CHV1 es capaz de inducir sinergismo en infecciones con PVX, se introdujo el gen de p29 en PVX para su expresión durante la infección, produciendo el virus quimérico PVX-p29.

Se inocularon plantas de *N. benthamiana* con transcritos de PVX-p29. Como controles se inocularon plantas con transcritos de PVX-HCT que expresa proteína HC-Pro de PPV y produce síntomas sinérgicos, y con PVX-GUS3' que contiene una porción del gen de la proteína GUS y que no produce sinergismo. Las plantas inoculadas mostraron inicialmente síntomas consistentes en aclaramiento de venas y mosaico en las hojas sistémicas, a 6-7 días postinoculación. A partir de 15 dpi, las plantas inoculadas con PVX-HCT (3 plantas) mostraron síntomas típicos de sinergismo con necrosis del tejido infectado y muerte de la planta, mientras que las plantas inoculadas con PVX-GUS3' (2 plantas) o con PVX-p29 (4 plantas) no mostraron necrosis extensa del tejido infectado (Figura 4.29), lo que parece indicar que la proteína p29 no es capaz de inducir sinergismo en infecciones con PVX.



**Figura 4.29.** Síntomas mostrados por las plantas de *N. benthamiana* inoculadas con PVX-GUS3', PVX-p29 o PVX-HCT a 11 y 29 dpi.

Así mismo, se analizó la acumulación de RNA viral en las plantas inoculadas con PVX-p29 o con PVX-HCT (Figura 4.30). Como referencia de tamaño de los RNAs se utilizó una muestra de planta infectada con PVX. En la muestra procedente de planta infectada con PVX-p29, se detectaron RNA virales con la sonda complementaria al gen de la CP de PVX y con la sonda complementaria al gen de la p29, que por tamaño podrían corresponder al RNA genómico de PVX-p29, RNA subgenómico TGB-p29-CP y RNA subgenómico p29-CP. Otros RNAs se detectaron solo con la sonda CP y por tamaño podrían corresponder a RNAs gPVX, sgTGB-CP donde se ha delecionado la secuencia p29, y sgCP. En la muestra procedente de planta infectada con PVX-HCT se detectaron RNAs que por tamaño podrían corresponder a gPVX-HCT, sgTGB-HCT-CP y sgHCT-CP, detectables con sondas CP y HC-Pro, y sgCP detectable con sonda CP. Sin embargo no se detectaron otros RNAs que pudieran corresponder a PVX con la secuencia HCT delecionada.



**Figura 4.30.** Detección de RNAs virales de PVX, PVX-p29 y PVX-HCT con sondas complementarias al gen de la proteína CP de PVX, a la secuencia p29 de CHV1 y a la secuencia HC-Pro de PPV.

Estos resultados indican que la quimera PVX-p29 mantiene, al menos parcialmente, el gen de la proteína p29 durante la infección, por lo que se puede asumir que la proteína p29 se acumula en tejido infectado. Por tanto la no aparición de síntomas sinérgicos parece confirmar que la proteína p29 de CHV1 no tiene capacidad para suprimir el PTGS en plantas.

## *5. DISCUSIÓN*



## 5.1. ESTUDIO DE LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS HCT Y HCN

### 5.1.1 Resistencia a PPV mediada por PTGS

La transformación de plantas con secuencias derivadas de virus para la generación de resistencia a infecciones virales es una estrategia ampliamente utilizada y que ha demostrado tener éxito frente a numerosos virus y en diversas especies de plantas (Beachy, 1997; Goldbach *et al.*, 2003). Las propiedades de la resistencia generada son variables, dependiendo de la secuencia viral empleada y el mecanismo que entre en juego, lo que tiene importancia para su aplicación práctica. La resistencia mediada por proteínas, fundamentalmente proteínas de la cubierta (CP) y proteínas de movimiento (MP), tiende a generar resistencia frente a una mayor gama de virus que la resistencia mediada por silenciamiento génico postranscripcional (PTGS), que es más específica debido a que requiere una alta homología de secuencia entre el virus y el transgén. Como contrapartida, la resistencia mediada por PTGS suele ser de una alta eficiencia y además, es de esperar que cualquier secuencia viral tenga potencial para inducirla, lo que la convierte en una herramienta de gran versatilidad en la protección de cultivos frente a enfermedades virales.

En la generación de resistencia a potyvirus, se han empleado gran variedad de secuencias derivadas de diversos potyvirus: P1 y P3 (Moreno *et al.*, 1998), HC-Pro (Mlotshwa *et al.*, 2002a; Savenkov y Valkonen, 2002), CI (Wittner *et al.*, 1998), NIa (Maiti *et al.*, 1993), NIb (Guo y García, 1997; Jones *et al.*, 1998) y CP (Lindbo y Dougherty, 1992a; Ravelonandro *et al.*, 1993a). En el presente trabajo hemos caracterizado la resistencia frente a PPV, un virus de gran impacto en el cultivo de árboles frutales, mediada por el gen HC-Pro de PPV en *N. benthamiana*. Nuestro trabajo (Barajas *et al.*, 2004) es, junto con los de Savenkov *et al.* (2002) y Mlotshwa *et al.* (2002), uno de los primeros en describir resistencia a un potyvirus empleando el gen HC-Pro. En nuestras plantas transgénicas, la resistencia se produce con similares características tanto en líneas que expresan la proteína HC-Pro (HCT), como en líneas que no (HCN), por lo que la proteína HC-Pro expresada por el transgén no parece mediar ningún efecto sobre la resistencia. Las plantas resistentes de la línea HCT2 presentan bajos niveles de mRNA del transgén antes de la inoculación con PPV, acumulan siRNAs derivados del mRNA del transgén y son capaces de silenciar un transgén homólogo independientemente de la infección con PPV. Por tanto, estos resultados indican que la resistencia observada en esta línea es mediada por PTGS inducido por el transgén HC-Pro. En las líneas HCT13, HCN9 y HCN11 a diferencia de la línea HCT2, las pruebas aportadas son menos consistentes, sin embargo es muy probable que la resistencia sea mediada por PTGS de la misma forma que en HCT2.

La expresión transitoria mediante agroinfiltración es un método rápido y sencillo para probar si una secuencia génica es diana de silenciamiento (English *et al.*, 1997; Llave *et al.*, 2000). Al igual que los virus, los genes expresados transitoriamente mediante agroinfiltración pueden ser diana del PTGS, pero no de silenciamiento génico transcripcional (TGS) (English *et al.*, 1997). Mediante la expresión transitoria de un gen *gusA* homólogo al transgén HC-Pro, hemos aportado una prueba adicional, e independiente de la resistencia a PPV, sobre el PTGS del transgén HC-Pro. Además, de ambos se extrae como conclusión que el silenciamiento afecta

tanto a la porción 5' del transgén, correspondiente a la secuencia HC-Pro, como a la porción 3' correspondiente a la secuencia *gusA*. Esto contrasta con algunos otros trabajos en que el silenciamiento solo afecta a la porción 3' del transgén, de manera que la resistencia es efectiva frente a virus que portan secuencias homólogas a la porción 3' del transgén pero no frente a virus con homología a la región 5' (English *et al.*, 1996; Sijen *et al.*, 1996; Sonoda *et al.*, 1999). En cualquier caso, de nuestros resultados no se puede descartar que entre nuestras plantas transgénicas haya alguna línea no identificada en la que se establezca silenciamiento solo de la región 3' correspondiente a la secuencia *gusA*, ya que la identificación de líneas silenciadas se hizo en base a la resistencia a PPV, que solo es sensible al silenciamiento que afecte a la porción HC-Pro del transgén.

Además de observar resistencia a PPV en las plantas HC-Pro, también se ha observado resistencia a PVX-HCT, un vector viral derivado de PVX que porta la secuencia HC-Pro de PPV, lo cual apoya que la resistencia es dependiente de homología y basada en PTGS. Tradicionalmente, se han empleado vectores virales para demostrar si un caso de resistencia derivada del patógeno está basado en PTGS, ya que normalmente los vectores virales empleados están poco relacionados filogenéticamente con el virus del que procede el transgén, de manera que un mecanismo de resistencia causado por la proteína de origen viral tiene poca probabilidad de afectar al vector viral. En cambio, si la resistencia está basada en PTGS, afectará a cualquier vector viral que porte secuencias homólogas al transgén. Además, la secuencia introducida en el vector no es necesaria para su supervivencia, lo que permite probar como diana del PTGS genes no funcionales, diferentes porciones de un gen (Sonoda *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2001) o incluso genes no virales (English *et al.*, 1996).

Uno de los principales inconvenientes de la utilización de vectores virales, es que la secuencia introducida tiende a deleccionarse durante la infección viral, ya que al no ser necesaria para la supervivencia del virus no hay una presión selectiva para su mantenimiento (Chapman *et al.*, 1992; Guo *et al.*, 1998; Rabindran y Dawson, 2001; González Jara, 2002). En experimentos de resistencia a virus, normalmente se inocula un gran número de plantas, lo que requiere una importante cantidad de inóculo, por lo que se suele utilizar extracto de plantas infectadas. En el caso de emplearse vectores virales esto supone un riesgo, debido a que durante su replicación en la planta que sirve para producir el inóculo pueden producirse delecciones del inserto que porta. En tal caso, los virus que hayan perdido el inserto no serán susceptibles al PTGS inducido por un transgén homólogo a tal inserto. Esto puede pasar inadvertido y provocar que se contabilicen como susceptibles plantas que en realidad son resistentes. En nuestro caso, el vector PVX-HCT y el vector que ha deleccionado el inserto HCT producen síntomas distintos, con y sin necrosis respectivamente, lo que nos ha permitido observar y estudiar la repercusión de este fenómeno en el análisis de la resistencia a virus. Hemos confirmado que la aparición de plantas sin síntomas o con síntomas no necróticos no parece estar determinada por la dosis génica del transgén HC-Pro. También hemos observado que la aparición de síntomas no necróticos en plantas transgénicas, se debe a la proliferación de formas del virus que han perdido el inserto HCT, por lo que probablemente está relacionada con la presencia en el inóculo empleado de virus PVX que ha perdido el inserto HCT. El hecho de que al diluir el inóculo empleado disminuya notablemente la proporción de plantas con síntomas no necróticos y aumente la de plantas sin síntomas, apoya la existencia de PVX sin inserto HCT en el inóculo, a pesar de que

no se detecta mediante Northern blot en la planta de la este se preparó. Según estos resultados, la conclusión más plausible es que existe en el inóculo una pequeña proporción de PVX sin inserto, de tal manera que las plantas en las que aparecen síntomas no necróticos son aquellas en las que por probabilidad ha entrado una o más partículas de PVX sin inserto, en la inoculación. Al diluir el inóculo se reduce el número de partículas virales que entran en la hoja inoculada, por lo que disminuye la probabilidad de que entre una partícula de PVX sin inserto.

Una posibilidad alternativa a la presencia de PVX sin inserto HCT en el inóculo, que no es descartable según los resultados, es que la delección de PVX-HCT se produzca en las propias plantas transgénicas HC-Pro inoculadas. Para ello sería necesario que hubiese replicación de PVX-HCT en las plantas transgénicas silenciadas y que surgiesen formas de PVX que hubieran perdido el inserto HCT antes de que el silenciamiento bloquease completamente a PVX-HCT. En otros sistemas similares con plantas que contienen un transgén GUS silenciado y son resistentes a PVX-GUS, en las hojas inoculadas con PVX-GUS se observan puntos donde se expresa GUS, que son indicativos de infección y replicación de PVX (English *et al.*, 1996). Aunque el número y tamaño de los puntos con expresión de GUS es muy inferior al observado en plantas no resistentes, su presencia indica que se pueden dar bajos niveles de replicación viral en la hoja inoculada de plantas resistentes. Experimentos preliminares realizados en nuestro sistema, en los que se inocularon plantas transgénicas con transcritos de PVX-HCT, de manera que no hay posibilidad de que haya formas deleccionadas de PVX en el inóculo, apuntan esta posibilidad, ya que en una población de plantas 100% resistentes a PPV, una pequeña proporción de las plantas inoculadas con transcritos de PVX-HCT mostraron síntomas no necróticos. Por tanto la aparición del fenotipo de síntomas no necróticos podría no estar causada únicamente por la presencia en el inóculo de PVX sin inserto HCT, sino también por la delección de PVX-HCT durante las fases iniciales de replicación en las hojas inoculadas de las plantas transgénicas HC-Pro.

### **5.1.2 Bases moleculares de la resistencia a PPV**

Desde el descubrimiento de los fenómenos de silenciamiento génico en plantas, se han propuesto varios modelos que trataban de explicar que factores desencadenan que en algunas plantas transformadas se produzca silenciamiento del transgén mientras que en otras no (revisado en Waterhouse *et al.*, 1999). La importancia de desentramarlo radicaba en el interés de diseñar transgenes con mayor capacidad de inducir PTGS, para sus aplicaciones en resistencia a virus y en el estudio de la función de genes, mediante 'knock out' por silenciamiento. Igualmente, el conocimiento de los factores desencadenantes de silenciamiento, también es importante para evitar los efectos dañinos del silenciamiento en la producción a gran escala de proteínas y otros compuestos de interés biotecnológico en plantas.

Uno de los hechos observados con más frecuencia en trabajos de silenciamiento génico en plantas, es la relación entre el silenciamiento génico y la presencia en las plantas de múltiples copias del transgén (Smith *et al.*, 1994; Goodwin *et al.*, 1996; Muskens *et al.*, 2000). En concordancia con tales trabajos, la resistencia a PPV en nuestras plantas transgénicas se observa en líneas que contienen múltiples loci del transgén HC-Pro, según lo estimado por la segregación de la resistencia a kanamicina. Así, en las líneas HCt13 y HCn11 se estima la presencia de dos y

cuatro loci respectivamente. En las líneas HCt2 y HCn9 se estima la presencia de tres loci, aunque la probabilidad de ajuste es menor. La segregación de la resistencia a kanamicina en estas dos líneas, más baja que la esperada para tres loci, podría indicar la existencia de un ligamiento parcial entre varios de los loci que redujese la probabilidad de recombinación entre ambos. Además, los resultados presentados en la tabla 4.9, indican que en la línea HCt2 hay más loci de los estimados por la segregación de la resistencia a kanamicina.

Se analizaron los factores que determinan que el PTGS y la resistencia a PPV se induzcan en algunas de las plantas de estas líneas HC-Pro mientras que en otras no, con el fin de aportar nuevos datos sobre la inducción de PTGS por transgenes. Nuestros resultados indican que la presencia de plantas resistentes y susceptibles a PPV en la línea HCt2 no es aleatoria, sino que está determinada genéticamente por la presencia de uno o varios loci concretos del transgén HC-Pro. Algunas líneas R<sub>2</sub> susceptibles a PPV contienen hasta dos loci del transgén según lo estimado por la segregación de la resistencia a kanamicina, lo que sugiere que esos dos loci son prescindibles para la inducción de PTGS. Mediante el estudio a nivel molecular por Southern blot se detectaron una serie de bandas de hibridación en las plantas resistentes a PPV, indicativas de porciones de DNA que contienen la secuencia HC-Pro, que no aparecen en las plantas susceptibles, lo que confirma que la resistencia a PPV está determinada por la presencia de un/unos loci concretos del transgén. Estos resultados concuerdan con los de otros trabajos, en los que también se ha determinado que la resistencia a virus mediada por PTGS está causada por un locus concreto, en plantas que contienen múltiples loci del transgén (van den Boogaart *et al.*, 2001).

En la actualidad se conoce que el dsRNA es un excelente inductor de PTGS (Fire *et al.*, 1998; Kennerdell y Carthew, 1998; Waterhouse *et al.*, 1998), por lo que los modelos que tratan de explicar la inducción de silenciamiento por transgenes se centran en las causas que pueden conllevar la producción de dsRNA por parte del transgén (Sijen y Kooter, 2000). En aquellos trabajos en que se ha estudiado con detalle la estructura y disposición de transgenes en plantas silenciadas, se ha comprobado que el silenciamiento se produce con frecuencia en plantas que contienen algún loci formado por varias copias del transgén en disposición IR (Stam *et al.*, 1997; Wang y Waterhouse, 2000). La integración de varias copias del transgén enfrentadas una a otra como repetición invertida (IR), podría producir dsRNA en caso de que se produjese fallo en la terminación de la transcripción con cierta frecuencia (Ver figura 1.1). En el caso de las plantas HC-Pro silenciadas, es de esperar que el locus del transgén HC-Pro que determina el PTGS y la resistencia a PPV, tenga algunas características que conlleve la producción de dsRNA. Mediante los experimentos de Southern blot, se han intentado discernir algunas de estas características. Las bandas de hibridación exclusivas de plantas HCt2 resistentes a PPV, detectadas mediante Southern blot, corresponden a fragmentos de DNA de más de 10 kb, lo que no ofrece pistas sobre la posible disposición de las copias de T-DNA. En otros trabajos, el tamaño de algunas bandas de hibridación en Southern blot es tal, que permite afirmar que el locus detectado corresponde a una repetición invertida 'perfecta' (Stam *et al.*, 1997; Wang y Waterhouse, 2000), es decir dos copias del transgén con los bordes del T-DNA adyacentes, sin DNA de la planta interpuesto entre ambas copias. En el transgén HC-Pro, la distancia desde la diana de corte *Bam*HI y el borde izquierdo del T-DNA (LB) es de aproximadamente 2.821 nt, con lo que una repetición invertida perfecta generaría una banda en Southern blot

de aproximadamente 5.642 nt, que queda lejos de las bandas de mas de 10 kb atribuibles al locus inductor de PTGS. Por tanto, la estructura del locus del transgén HC-Pro inductor del PTGS, no es tan sencilla como una IR perfecta. Además la presencia de múltiples bandas en Southern blot atribuibles a este locus, sugiere que se trate de un locus de estructura compleja, compuesto por múltiples copias del transgén HC-Pro con porciones de DNA interpuestas. En otros trabajos, algunos de los loci caracterizados constan de múltiples copias completas o parciales del T-DNA, junto con DNA del vector de transformación de plantas (Stam *et al.*, 1997).

### **5.1.3 Papel de la proteína HC-Pro expresada por el transgén**

Uno de los aspectos de este trabajo ha sido determinar la posible influencia de la proteína HC-Pro codificada por el transgén sobre la consecución de PTGS y resistencia a virus. Según los resultados obtenidos, la resistencia a virus se produce con similares características tanto en líneas que no tienen capacidad de expresar proteína HC-Pro (HCn) como en líneas que si tienen esa capacidad (HCt), lo que sugiere que la proteína HC-Pro expresada por el transgén no media ningún efecto sobre la resistencia a virus. Además, la resistencia en las líneas HCt esta mediada por PTGS inducido por el transgén HC-Pro, a pesar de que este codifica para la proteína HC-Pro supresora de silenciamiento. Esto podría ser debido a que la proteína HC-Pro producida por el transgén se acumula a niveles inferiores a los necesarios para suprimir PTGS, o bien a que el PTGS del transgén HC-Pro se establece con rapidez antes de que la proteína HC-Pro se pueda acumular. Una vez establecido el PTGS del transgén HC-Pro, los niveles de mRNA y de proteína HC-Pro se reducirían notablemente, con lo que es menos probable que esta pudiera mediar algún efecto.

Para determinar si la proteína HC-Pro expresada por el transgén tiene capacidad supresora de PTGS, se realizaron dos tipos de ensayos relacionados con esta propiedad, como son la inducción de sinergismo en infecciones con PVX y la supresión de la protección frente a PMMoV mediada por la construcción pBI/IR-54. Para ello se emplearon preferentemente líneas HCt en las que se estimó que el transgén HC-Pro no estaba silenciado y que la acumulación de proteína HC-Pro era de las más altas entre las líneas HCt. En los ensayos de sinergismo, no se observaron síntomas típicos de este fenómeno que pudieran denotar actividad de la proteína HC-Pro. La proteína HC-Pro de PPV expresada en otros contextos sí es capaz de inducir sinergismo, como se observa en los experimentos con PVX-HCT. La cantidad de proteína HC-Pro producida a partir de PVX-HCT es próxima a la producida en una infección con PPV. Sin embargo la cantidad de proteína HC-Pro producida a partir del transgén es, en cualquiera de las líneas HCt analizadas, inferior a 1/200 a la producida en una infección con PPV. Por tanto la ausencia de sinergismo en plantas HCt infectadas con PVX es probablemente consecuencia de la baja acumulación de proteína HC-Pro expresada por el transgén. Por otro lado, en plantas de *N. tabacum* que expresan la porción 5' de TVMV y acumulan una cantidad de proteína HC-Pro correspondiente a 1/100 de una infección viral, se produce sinergismo al infectar con PVX (Vance *et al.*, 1995), lo que sugiere que los niveles de acumulación de proteína HC-Pro en algunas de las plantas HCt podría no estar muy lejos de lo necesario para mediar efecto sinérgico. Sin embargo la cantidad de HC-Pro necesaria para inducir sinergismo no tiene por que ser la misma con el HC-Pro de TVMV y el de PPV, ni en plantas de *N. tabacum* y *N. benthamiana*.

En cuanto a los ensayos de supresión de protección frente a PMMoV mediada por la pBI/IR-54, resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que la expresión transitoria por agroinfiltración de pBI-HCT, la misma construcción usada en las plantas HCt, es capaz de interferir con la protección mediada por la construcción pBI/IR-54 (Tenllado *et al.*, 2003). La expresión transitoria de la construcción pBI/IR-54 produce un dsRNA homólogo al gen de la proteína 54-kDa de PMMoV capaz de inducir PTGS que causa resistencia a PMMoV. La coexpresión de pBI-HCT junto con pBI/IR-54, interfiere con el PTGS lo suficiente como para permitir la infección de PMMoV (Tenllado *et al.*, 2003). Estos mismos ensayos realizados en plantas HCt no han mostrado capacidad, por parte del HC-Pro producido por el transgén, de interferir con la resistencia a PMMoV causada por pBI/IR-54. La causa se podría achacar probablemente a una mayor producción de proteína HC-Pro en expresión transitoria (próxima a 1/100 a la observada en infecciones con PPV) que en expresión estable a partir el transgén HCt.

En las líneas transgénicas HCt en las que no se observa resistencia a PPV, no es posible saber si no se establece PTGS porque el transgén en tales líneas no tiene capacidad de inducir PTGS, o si por lo contrario no se establece PTGS porque la proteína HC-Pro expresada por el transgén lo suprime. Esta segunda posibilidad parece la menos probable, a la vista de los resultados expuestos anteriormente sobre la incapacidad de la proteína HC-Pro de inducir sinergismo o suprimir la protección antiviral conferida por dsRNA. En cualquier caso, para que esto pudiese ocurrir sería requisito que el PTGS del transgén HC-Pro se iniciase tardíamente, de manera que hubiese tiempo de que se produjese proteína HC-Pro a partir del mRNA del transgén. En otros trabajos se ha demostrado que la proteína HC-Pro de TEV es capaz de suprimir eficientemente el PTGS inducido por inductores 'débiles', como algunos mRNAs o RNAs con pequeñas porciones de estructura secundaria, mientras que no es capaz de suprimir completamente el PTGS inducido por inductores 'fuertes', como virus o dsRNAs (Johansen y Carrington, 2001). Las pruebas realizadas en nuestras plantas transgénicas para determinar la capacidad supresora de PTGS de la proteína HC-Pro expresada por el transgén, utilizan inductores de PTGS que pueden ser considerados 'fuertes' como la infección viral con PVX en el caso de las pruebas de sinergismo, o la producción de dsRNA en el caso de las pruebas de supresión de protección antiviral. En este sentido, no es descabellado pensar que la proteína HC-Pro producida por el transgén pudiera tener cierta capacidad supresora de PTGS frente a inductores 'débiles'.

Otros trabajos aparecidos durante la realización de esta tesis, describen el efecto de transgenes HC-Pro, de dos potyvirus distintos, sobre la infección con sus respectivos virus homólogos (Mlotshwa *et al.*, 2002a; Savenkov y Valkonen, 2002). Las plantas transgénicas empleadas en estos trabajos expresan mayores cantidades de proteína HC-Pro que las plantas utilizadas en nuestro caso. Una de las líneas transgénicas descritas en Mlotshwa *et al.*, mostró PTGS del transgén HC-Pro y resistencia al virus homólogo. Sin embargo, el resto de las líneas resultaron inicialmente susceptibles a la infección con el respectivo virus homólogo al transgén HC-Pro, aunque más adelante mostraron recuperación, con la consiguiente reducción de acumulación viral y silenciamiento del transgén HC-Pro. La recuperación, como manifestación de PTGS inducido por la infección viral, se produjo en presencia de la proteína HC-Pro producida por el virus y por el transgén, lo que indica que la fuerte inducción de PTGS producida por la infección viral fue capaz de superar la supresión de PTGS mediada por altas cantidades de proteína

HC-Pro. Sin embargo, el PTGS inducido por los virus en estas líneas mostró ciertos rasgos de inestabilidad, a diferencia de lo observado en otros casos de recuperación (Lindbo *et al.*, 1993; Guo y García, 1997). En un caso (Savenkov y Valkonen, 2002), las plantas recuperadas no fueron resistentes a una segunda inoculación con el virus, lo que discrepa con lo observado en otros trabajos (Marathe *et al.*, 2000). En el otro caso (Mlotshwa *et al.*, 2002a), las plantas recuperadas mostraron reaparición de síntomas más adelante. Estas observaciones sugieren que el PTGS inducido por los virus en estas plantas no se mantiene estable, lo que sugiere que la proteína HC-Pro producida por el transgén es capaz de interferir con el PTGS una vez que la cantidad de virus inductor del silenciamiento ha decaído tras la recuperación. Estos resultados sugieren, que la capacidad de la proteína HC-Pro de potyvirus de suprimir eficientemente PTGS depende de la potencia del inductor de PTGS, de manera que el resultado final podría depender de la cantidad relativa de inductor de PTGS frente a la de proteína supresora de PTGS.

La supresión de la defensa de la planta basada en PTGS y la consiguiente mayor acumulación del virus y alteración del metabolismo de la planta, probablemente supone un perjuicio para la planta huésped, lo que a la larga redundaría en detrimento del virus, que depende del organismo huésped. Esta premisa sugiere que los supresores de PTGS de los virus, probablemente se han adaptado hasta alcanzar un nivel de supresión de PTGS óptimo para la interacción virus-planta huésped. Los casos de sinergismo, en los que se cree que la causa de la exacerbación de síntomas es una mayor supresión de la defensa antiviral de la planta, sirven para ilustrar las posibles consecuencias de una excesiva supresión de PTGS. En este sentido, el virus BWYV codifica un supresor de PTGS denominado P0 cuya producción durante la infección viral es baja debido a un codón de iniciación subóptimo. Además, el virus está sometido a una presión selectiva que mantiene la producción de P0 en bajos niveles (Pfeffer *et al.*, 2002), lo que sugiere que una excesiva expresión de P0 podría ser perjudicial para el virus. Las causas que podrían causar perjuicio para el virus en caso de sobreexpresión de P0 son diversas, pero un daño excesivo a la planta huésped podría ser una de ellas. Algunos supresores de PTGS como el propio HC-Pro, además de suprimir PTGS a varios niveles, son capaces de interferir con la regulación de la expresión génica mediada por miRNAs, lo que causa graves alteraciones en el desarrollo de la planta huésped (Kasschau *et al.*, 2003; Chapman *et al.*, 2004; Dunoyer *et al.*, 2004). Actualmente no se conoce si la interferencia de ciertos supresores de PTGS con el metabolismo de miRNAs es una consecuencia colateral de la supresión de PTGS, o si por el contrario los supresores han evolucionado activamente para interferir con los miRNAs porque suponga cierta ventaja para los virus. En caso de ser un efecto colateral, tales supresores podrían haber evolucionado para modular a la baja su capacidad supresora de PTGS, con el fin de reducir los efectos perniciosos que la interferencia con los miRNAs tiene sobre la planta huésped.

#### **5.1.4 Supresión de PTGS mediante infección con PVY o CMV**

Una de las consecuencias lógicas de la supresión de PTGS de un transgén, es la inhibición de la resistencia frente a virus homólogos al transgén. La supresión de silenciamiento del transgén, se puede producir mediante la infección de la planta con ciertos virus. Esto se ha citado como uno de los puntos débiles para la aplicación en agricultura de resistencia a virus mediada por PTGS (Mitter *et al.*, 2001), ya que la infección de las plantas con otros virus suprimiría la resistencia. Entre los virus que

se ha probado que tienen capacidad de suprimir PTGS y resistencia a virus, se encuentran PVY (Savenkov y Valkonen, 2001a), CMV (Mitter *et al.*, 2003; Simón-Mateo *et al.*, 2003) y PVX (Di Serio *et al.*, 2002). Excepcionalmente se ha descrito que TVMV suprime el PTGS de un transgén pero no la resistencia al virus homólogo (Simón-Mateo *et al.*, 2003).

En este trabajo hemos analizado la influencia de infecciones virales sobre el PTGS del transgén HC-Pro de PPV, empleando PVY y CMV. Ambos virus son capaces de suprimir el PTGS del transgén HC-Pro, como se puede deducir del aumento de acumulación de mRNA del transgén observado en las plantas infectadas con uno u otro virus. PVY fue empleado en experimentos preliminares para observar si la supresión de PTGS causaba inhibición de la resistencia a PPV en plantas HCt2. Para asegurar que PPV se inoculaba en tejido donde el PTGS está suprimido, se inoculó sobre hojas que mostraban síntomas de PVY. En ningún caso se detectó consistentemente PPV, ni siquiera en plantas que no son resistentes a PPV, lo que sugiere que la infección previa con PVY dificulta la infección posterior con PPV. En varios de los trabajos citados anteriormente se ha constatado que la infección previa de las plantas reduce notablemente la infectividad de un segundo virus, reduciendo hasta el 50-70% el número de plantas control infectadas con el segundo virus (Di Serio *et al.*, 2002; Simón-Mateo *et al.*, 2003). En otro trabajo, la infección con PVY de plantas de *N. benthamiana* resistentes a PVA, es capaz de suprimir el PTGS y la resistencia a PVA en todas las plantas analizadas (Savenkov y Valkonen, 2001a), de lo que se deduce que PVY no impide la posterior infección con PVA. La diferencia entre tales resultados y los nuestros, podría deberse a distintas condiciones de crecimiento de las plantas o al empleo de variedades de PVY diferentes (PVY-UK en el trabajo de Savenkov y Valkonen, frente a PVY-0-AT en el nuestro). En este sentido, en el trabajo de Savenkov y Valkonen la acumulación de PVA se pudo medir hasta 65 días después de su inoculación (80 días después de la inoculación de PVY), de lo que se deduce que los síntomas causados por la infección con PVY y PVA en estas plantas no son tan acusados como los observados en nuestro trabajo con PVY, cuya infección causó una parada severa del crecimiento de las plantas y su muerte en aproximadamente 31 días después de la inoculación. Entre las causas de la reducción de la infectividad del segundo virus, podrían estar: a) la deformación de las hojas infectadas por PVY, lo que dificulta la posterior inoculación mecánica de otro virus, b) la estimulación de los mecanismos de defensa inespecífica de la planta, lo que reduce la susceptibilidad a patógenos en general, o c) la competencia entre ambos virus por los factores de la planta necesarios para la infección viral. En el trabajo citado de Savenkov y Valkonen, las plantas infectadas por PVY pierden la resistencia a PVA, sin embargo la acumulación de PVA en estas plantas es inferior a la observada en plantas no infectadas con PVY, lo que sugiere que hay competencia entre ambos virus (Savenkov y Valkonen, 2001a).

Para tratar de sobrepasar los inconvenientes producidos por PVY, los siguientes experimentos se realizaron con CMV, que produce alteraciones menos severas que PVY, de manera que las plantas continúan su desarrollo una vez infectadas. La infección con CMV también causa una reducción en la infectividad de PPV, de manera que solo se infectan un 50-80% de plantas control. Sin embargo esta infectividad fue suficiente para demostrar que la infección con CMV suprime la resistencia a PPV. La proporción de plantas en las que se suprime la resistencia a PPV tras la infección con CMV ronda el 10-30% (1 de 9 y 12 de 35; capítulo 4.6.2),

lo que parece significativamente inferior a la proporción de plantas control infectadas con PPV (50-80%), por lo que se puede pensar que la supresión de la resistencia a PPV mediante infección con CMV no es efectiva al cien por cien. En las plantas en las que se suprime efectivamente la resistencia los niveles de acumulación de PPV alcanzados son variables, aunque en la mayoría de las plantas son próximos a los observados en plantas no infectadas previamente con CMV. Este hecho sugiere que CMV y PPV no compiten por los mismos factores de la planta, lo que podría ser debido a estrategias de replicación muy diferentes, lo que se refleja en su pertenencia a familias distintas (*Bromoviridae* y *Potyviridae* respectivamente).

## 5.2. LA PROTEÍNA P29 DE HIPOVIRUS COMO SUPRESOR DE PTGS

En plantas está ampliamente aceptado que una de las funciones del silenciamiento génico postranscripcional es la de servir como defensa antiviral. Esta teoría está sustentada por múltiples observaciones, entre las que destaca la existencia de proteínas virales supresoras de PTGS. El posible papel del silenciamiento como defensa antiviral en otros organismos es más incierto, sin embargo existen indicios que lo sugieren. En insectos, la infección con FHV induce una respuesta de silenciamiento frente al virus, que limita su acumulación. Además la proteína B2 de FHV tiene capacidad supresora de silenciamiento y es esencial para la acumulación de FHV (Li *et al.*, 2002). Otras proteínas de virus que afectan a mamíferos también han mostrado capacidad de supresión de silenciamiento, como son la NS1 del virus de la gripe y la E3L del virus vaccinia (Li *et al.*, 2004). Esto sugiere que en insectos y mamíferos el silenciamiento génico podría tener un papel en la defensa antiviral. Las proteínas B2 de FHV y NS1 del virus de la gripe además son capaces de suprimir PTGS en plantas (Li *et al.*, 2002; Delgadillo *et al.*, 2004), lo que apoya que el mecanismo de silenciamiento está bastante conservado entre distintos organismos.

En hongos no se ha determinado si el silenciamiento génico está implicado en la defensa frente a virus, pero dada la conservación del mecanismo de PTGS es de esperar que tenga un papel similar al observado en otros organismos, por lo que sí podría estar implicado en defensa. Por esta razón sería de esperar que los virus de hongos tuviesen proteínas capaces de interferir con el silenciamiento. La proteína p29 de hipovirus es un candidato ideal, ya que es necesaria para la correcta acumulación del RNA viral pero no es esencial para la replicación, propiedades que son comunes entre los supresores de PTGS. Los hipovirus además se acumulan en la célula en forma de dsRNA (Dawe y Nuss, 2001) por lo que es de esperar que sean fuertes inductores de PTGS y que requieran un supresor de silenciamiento para establecer la infección viral. Además, la proteína p29 es capaz de inducir por sí sola algunos de los síntomas atribuibles a la infección viral (Suzuki *et al.*, 2003), de manera similar a lo observado con supresores capaces de interferir con el metabolismo de miRNAs en plantas (Chapman *et al.*, 2004; Dunoyer *et al.*, 2004). Por último la proteína p29 tiene homología parcial con la proteína HC-Pro de varios potyvirus (Koonin *et al.*, 1991).

En este trabajo hemos realizado dos pruebas independientes para investigar si la proteína p29 de CHV1 tiene capacidad supresora de PTGS en plantas. La primera prueba se basa en la supresión de PTGS de GFP en expresión transitoria. En esta prueba la construcción que expresa proteína p29 no mostró capacidad de suprimir el

PTGS de la GFP. La acumulación del mRNA de p29 resultó más baja de lo que se podría esperar, puesto que hubo que recurrir a RT-PCR para detectarlo. Sin embargo también este fue el caso para la detección del mRNA de la construcción HC-Pro, que sí suprime silenciamiento. Por tanto la falta de supresión de PTGS por parte de p29 no parece en principio atribuible a un bajo nivel de expresión, aunque esto no se puede descartar en caso de que fuera un supresor más débil que HC-Pro. La segunda prueba se basa en la inducción de sinergismo en una infección con PVX, propiedad habitual entre los supresores de PTGS de diversos tipos (Brigneti *et al.*, 1998; Voinnet *et al.*, 1999; Pfeffer *et al.*, 2002; Van Wezel *et al.*, 2003). La proteína p29 expresada desde el vector PVX no indujo síntomas de tipo sinérgico, como los producidos por PVX-HCT. La presencia del RNA subgenómico de la proteína p29 se comprobó mediante Northern blot, por lo que la falta de inducción de sinergismo no es probablemente debida a una expresión incorrecta de proteína p29.

La ausencia de actividad supresora de PTGS constatada en ambas pruebas sugiere que la proteína p29 de hipovirus no tiene capacidad de suprimir silenciamiento en plantas. La homología existente entre p29 y HC-Pro sugiere que ambas proteínas podrían tener funciones similares e incluso que p29 pudiera funcionar en plantas como supresor de PTGS. Sin embargo p29 carece del dominio central implicado en HC-Pro en dicha función (Kasschau y Carrington, 2001), lo que reduce la posibilidad de que p29 funcione como supresor de PTGS en plantas. La ausencia de supresión de PTGS en plantas no implica necesariamente que p29 no funcione como supresor en hongos. Algunos supresores de PTGS han mostrado capacidad de supresión de PTGS en organismos muy diversos. Las proteínas p19 de tomosvirus, CP de carmovirus (Dunoyer *et al.*, 2004), NS1 del virus de la gripe (Delgadillo *et al.*, 2004) y B2 de nodavirus (Li *et al.*, 2002) suprimen silenciamiento en plantas y en animales. Sin embargo esta propiedad es probablemente consecuencia del modo de acción de estos supresores y no es de esperar que suceda de forma generalizada con otros supresores. NS1 y p19 tienen capacidad de unir siRNAs, por lo que probablemente actúan secuestrando siRNAs e impidiendo su función (Silhavy *et al.*, 2002; Bucher *et al.*, 2004). La estructura de los siRNAs está muy conservada por lo que los supresores que actúan de este modo en teoría podrían funcionar en multitud de organismos. Sin embargo los supresores que actúen mediante interacciones con proteínas del organismo huésped estarán limitados por la compatibilidad entre ambas proteínas y seguramente no funcionarán en gran diversidad de organismos. Tal podría ser el caso de la proteína 2b de cucumovirus en células de *Drosophila* (Reavy *et al.*, 2004) o de la proteína p25 de potexvirus en células humanas (Dunoyer *et al.*, 2004), en las que no muestran capacidad supresora de PTGS. Dado que el PTGS podría jugar un papel en la defensa antiviral en una gran variedad de organismos, es previsible que se continúe identificando nuevos supresores de PTGS de diversos grupos de virus. Además el conocimiento más detallado sobre el modo de acción de estos supresores podría facilitar un mejor entendimiento de las relaciones virus-huésped, lo que podría facilitar el diseño de nuevas estrategias de control de enfermedades virales.

## ***6. CONCLUSIONES***



1. La construcción HCt derivada del gen HC-Pro de PPV, es capaz de inducir silenciamiento génico postranscripcional en algunas líneas transgénicas a pesar de codificar un supresor de PTGS.

2. La resistencia a PPV y a PVX-HCT, y el silenciamiento de un gen *gusA* expresado transitoriamente, son consecuencia del PTGS inducido por el transgén HC-Pro con anterioridad a la infección viral.

3. La proteína HC-Pro expresada por el transgén, aparentemente no interfiere con el PTGS inducido por el propio transgén, al menos en las líneas que muestran resistencia a PPV. Esto puede ser debido probablemente a un nivel de acumulación de proteína HC-Pro por debajo de lo necesario para interferir con el silenciamiento génico.

4. La expresión de gran cantidad de proteína HC-Pro o de 2b, a través de infecciones con PVY o con CMV respectivamente, sí es capaz de interferir con el PTGS del transgén HC-Pro. Además se ha podido demostrar, en el caso de CMV, que la supresión del silenciamiento del transgén HC-Pro interfiere con la resistencia a PPV.

5. La inducción de PTGS del transgén HC-Pro en la línea HCt2 está probablemente determinada por la presencia de un locus concreto del transgén HC-Pro, entre los múltiples loci presentes en esta línea. Las características de este locus que promueven la inducción de PTGS no se han podido determinar, pero probablemente conllevan la producción de RNA de doble cadena homólogo con al menos parte de la secuencia HC-Pro y parte de la secuencia *gusA* del transgén.

6. No se ha demostrado capacidad por parte de la proteína p29 de hipovirus, de suprimir PTGS en plantas. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que sí tenga tal actividad en su huésped natural, el hongo *Cryphonectria parasitica*.



## *7. BIBLIOGRAFÍA*



- Ahlquist, P. (2002). RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science* **296**, 1270-1273.
- Allison, R.F., Dougherty, W.G., Parks, T.D., Johnston, R.E., Kelly, M., and Armstrong, F.B. (1985). Biochemical analysis of the capsid protein gene and capsid protein of tobacco etch virus: N-terminal amino acids are located on the virion's surface. *Virology* **147**, 309-316.
- Alonso, E., García-Luque, I., de la Cruz, A., Wicke, B., Ávila-Rincón, M.J., Serra, M.T., Castresana, C., and Díaz-Ruíz, J.R. (1991). Nucleotide sequence of the genomic RNA of pepper mild mottle virus, a resistance-breaking tobamovirus in pepper. *Journal of General Virology* **72**, 2875-2884.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H., and Vance, V.B. (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**, 13079-13084.
- Anandalakshmi, R., Marathe, R., Ge, X., Herr, J.M., Jr., Mau, C., Mallory, A., Pruss, G., Bowman, L., and Vance, V.B. (2000). A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **290**, 142-144.
- Arbatova, J., Lehto, K., Pehu, E., and Pehu, T. (1998). Localization of the P1 protein of potato Y potyvirus in association with cytoplasmic inclusion bodies and in the cytoplasm of infected cells. *Journal of General Virology* **79**, 2319-2323.
- Atreya, C.D., and Pirone, T.P. (1993). Mutational analysis of the helper component-proteinase gene of a potyvirus: effects of amino acid substitutions, deletions, and gene replacement on virulence and aphid transmissibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **90**, 11919-11923.
- Atreya, P.L., López-Moya, J.J., Chu, M., Atreya, C.D., and Pirone, T.P. (1995). Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. *Journal of General Virology* **76**, 265-270.
- Bahramian, M.B., and Zarbl, H. (1999). Transcriptional and posttranscriptional silencing of rodent alpha1(I) collagen by a homologous transcriptionally self-silenced transgene. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 274-283.
- Barajas, D., Tenllado, F., González-Jara, P., Martínez-García, B., Atencio, F.A., and Díaz-Ruíz, J.R. (2004). Resistance to Plum pox virus (PPV) in *Nicotiana benthamiana* plants transformed with the PPV HC-Pro silencing suppressor gene. *Journal of Plant Pathology* **86**, 239-248.
- Barnett, O.W. (1992). A summary of potyvirus taxonomy and definitions. En: *Potyvirus taxonomy*, pp.435-444. Editado por: O.W. Barnet. *Archives of Virology*, Suplemento 5, Springer-Verlag, Vienna & New York.
- Bartel, B. and Bartel, D.P. (2003). MicroRNAs: At the root of plant development? *Plant Physiology* **132**, 709-717.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-297.
- Baulcombe, D.C. (1996). Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* **8**, 1833-1844.
- Baulcombe, D.C., and English, J.J. (1996). Ectopic pairing of homologous DNA and post-transcriptional silencing in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology* **7**, 173-180.
- Baulcombe, D.C., and Molnar, A. (2004). Crystal structure of p19 - a universal suppressor of RNA silencing. *Trends in Biochemical Sciences* **29**, 279-281.
- Baulcombe, D.C., Chapman, S., and Santa-Cruz, S. (1995). Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant Journal* **7**, 1045-1053.

- Beachy, R.N.** (1997). Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology* **8**, 215-220.
- Beachy, R.N.** (1999). Coat-protein-mediated resistance to tobacco mosaic virus: discovery mechanisms and exploitation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B. Biological Sciences* **354**, 659-664.
- Bendahmane, M., Fitchen, J.H., Zhang, G., and Beachy, R.N.** (1997). Studies of coat protein-mediated resistance to tobacco mosaic tobamovirus: correlation between assembly of mutant coat proteins and resistance. *Journal of Virology* **71**, 7942-7950.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J.** (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-366.
- Blanc, S., López-Moya, J.J., Wang, R., García-Lampasona, S., Thornbury, D.W., and Pirone, T.P.** (1997). A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology* **231**, 141-147.
- Blanc, S., Ammar, E.D., García-Lampasona, S., Dolja, V.V., Llave, C., Baker, J., and Pirone, T.P.** (1998). Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *Journal of General Virology* **79**, 3119-3122.
- Brantley, J.D., and Hunt, A.G.** (1993). The N-terminal protein of the polyprotein encoded by the potyvirus tobacco vein mottling virus is an RNA-binding protein. *Journal of General Virology* **74**, 1157-1162.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L.H., Ding, S.W., and Baulcombe, D.C.** (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO Journal* **17**, 6739-6746.
- Brigneti, G., Martín-Hernández, A.M., Jin, H., Chen, J., Baulcombe, D.C., Baker, B., and Jones, J.D.** (2004). Virus-induced gene silencing in Solanum species. *Plant Journal* **39**, 264-272.
- Bryan, G.T., Gardner, R.C., and Forster, R.L.** (1992). Nucleotide sequence of the coat protein gene of a strain of clover yellow vein virus from New Zealand: conservation of a stem-loop structure in the 3' region of potyviruses. *Archives of Virology* **124**, 133-146.
- Bucher, E., Sijen, T., De Haan, P., Goldbach, R., and Prins, M.** (2003). Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *Journal of Virology* **77**, 1329-1336.
- Bucher, E., Hemmes, H., de Haan, P., Goldbach, R., and Prins, M.** (2004). The influenza A virus NS1 protein binds small interfering RNAs and suppresses RNA silencing in plants. *Journal of General Virology* **85**, 983-991.
- Canto, T., López-Moya, J.J., Serra-Yoldi, M.T., Díaz-Ruíz, J.R., and López-Abella, D.** (1995). Different helper component mutations associated with lack of aphid transmissibility in two isolates of potato virus Y. *Phytopathology* **85**, 1519-1524.
- Carmell, M.A., and Hannon, G.J.** (2004). RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nature Structural and Molecular Biology* **11**, 214-218.
- Carrington, J.C., and Freed, D.D.** (1990). Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. *Journal of Virology* **64**, 1590-1597.
- Carrington, J.C., Cary, S.M., and Dougherty, W.G.** (1988). Mutational analysis of tobacco etch virus polyprotein processing: cis and trans proteolytic activities of polyproteins containing the 49-kilodalton proteinase. *Journal of Virology* **62**, 2313-2320.
- Carrington, J.C., Jensen, P.E., and Schaad, M.C.** (1998). Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *Plant Journal* **14**, 393-400.
- Carrington, J.C., Cary, S.M., Parks, T.D., and Dougherty, W.G.** (1989). A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *EMBO Journal* **8**, 365-370.

- Carrington, J.C., Haldeman, R., Dolja, V.V., and Restrepo-Hartwig, M.A.** (1993). Internal cleavage and trans-proteolytic activities of the VPg-proteinase (NIa) of tobacco etch potyvirus in vivo. *Journal of Virology* **67**, 6995-7000.
- Cassidy, B.G., and Nelson, R.S.** (1995). Differences in protection phenotypes in tobacco plants expressing coat protein genes from peanut stripe potyvirus with or without engineered ATG. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**, 357-365.
- Caudy, A.A., and Hannon, G.J.** (2004). Induction and biochemical purification of RNA-induced silencing complex from *Drosophila* S2 cells. *Methods in Molecular Biology* **265**, 59-72.
- Cerutti, H.** (2003). RNA interference: travelling in the cell and gaining functions? *Trends in Genetics* **19**, 39-46.
- Chapman, E.J., Prokhnevsky, A.I., Gopinath, K., Dolja, V.V., and Carrington, J.C.** (2004). Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes and Development* **18**, 1179-1186.
- Chapman, S., Kavanagh, T., and Baulcombe, D.** (1992). Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant Journal* **2**, 549-557.
- Chen, J., Li, W.X., Xie, D., Peng, J.R., and Ding, S.W.** (2004). Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but upregulates the role of microRNA in host gene expression. *Plant Cell* **16**, 1302-1313.
- Choi, G.H., and Nuss, D.L.** (1992). Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. *Science* **257**, 800-803.
- Choi, G.H., Shapira, R., and Nuss, D.L.** (1991a). Cotranslational autoproteolysis involved in gene expression from a double-stranded RNA genetic element associated with hypovirulence of the chestnut blight fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **88**, 1167-1171.
- Choi, G.H., Pawlyk, D.M., and Nuss, D.L.** (1991b). The autocatalytic protease p29 encoded by a hypovirulence-associated virus of the chestnut blight fungus resembles the potyvirus-encoded protease HC-Pro. *Virology* **183**, 747-752.
- Cogoni, C., and Macino, G.** (1999). Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature* **399**, 166-169.
- Cogoni, C., Romano, N., and Macino, G.** (1994). Suppression of gene expression by homologous transgenes. *Antonie Van Leeuwenhoek* **65**, 205-209.
- Cooper, B., Lapidot, M., Heick, J.A., Dodds, J.A., and Beachy, R.N.** (1995). A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility. *Virology* **206**, 307-313.
- Covey, S.N., Al-Kaff, N.S., Langara, A., and Turner, D.S.** (1997). Plants combat infection by gene silencing. *Nature* **385**, 781-782.
- Crescenzi, A., Nuzzaci, M., Levy, L., Piazzolla, P., and Hadidi, A.** (1995). Plum pox virus (PPV) in sweet cherry. *Acta Horticulturae* **386**, 219-225.
- Cronin, S., Verchot, J., Haldeman-Cahill, R., Schaad, M.C., and Carrington, J.C.** (1995). Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell* **7**, 549-559.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., and Baulcombe, D.C.** (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* **101**, 543-553.
- Dawe, A.L., and Nuss, D.L.** (2001). Hypoviruses and chestnut blight: exploiting viruses to understand and modulate fungal pathogenesis. *Annual Review of Genetics* **35**, 1-29.

- Delgadillo, M.O., Sáenz, P., Salvador, B., García, J.A., and Simón-Mateo, C.** (2004). Human influenza virus NS1 protein enhances viral pathogenicity and acts as an RNA silencing suppressor in plants. *Journal of General Virology* **85**, 993-999.
- Denli, A.M., and Hannon, G.J.** (2003). RNAi: an ever-growing puzzle. *Trends in Biochemical Sciences* **28**, 196-201.
- Di Serio, F., Rubino, L., Russo, M., and Martelli, G.P.** (2002). Homology-dependent virus resistance against Cymbidium ringspot virus is inhibited by post-transcriptional gene silencing suppressor viruses. *Journal of Plant Pathology* **84**, 121-124.
- Ding, X.S., Liu, J., Cheng, N.H., Folimonov, A., Hou, Y.M., Bao, Y., Katagi, C., Carter, S.A., and Nelson, R.S.** (2004). The Tobacco mosaic virus 126-kDa protein associated with virus replication and movement suppresses RNA silencing. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**, 583-592.
- Doi, N., Zenno, S., Ueda, R., Ohki-Hamazaki, H., Ui-Tei, K., and Saigo, K.** (2003). Short-interfering-RNA-mediated gene silencing in mammalian cells requires Dicer and eIF2C translation initiation factors. *Current Biology* **13**, 41-46.
- Dolja, V.V., McBride, H.J., and Carrington, J.C.** (1992). Tagging of plant potyvirus replication and movement by insertion of beta-glucuronidase into the viral polyprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **89**, 10208-10212.
- Dolja, V.V., Haldeman, R., Robertson, N.L., Dougherty, W.G., and Carrington, J.C.** (1994). Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO Journal* **13**, 1482-1491.
- Dolja, V.V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A.E., Vandenbosch, K.A., and Carrington, J.C.** (1995). Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology* **206**, 1007-1016.
- Domier, L.L., Shaw, J.G., and Rhoads, R.E.** (1987). Potyviral proteins share amino acid sequence homology with picorna-, como-, and caulimoviral proteins. *Virology* **158**, 20-27.
- Dong, X., van Wezel, R., Stanley, J., and Hong, Y.** (2003). Functional characterization of the nuclear localization signal for a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology* **77**, 7026-7033.
- Dosba, F., Orliac, S., Dutrannoy, F., Maison, P., Massonie, G., and Audergon, J.** (1992). Evaluation of resistance to plum pox virus in apricot trees. *Acta Horticulturae* **309**, 211-217.
- Dougherty, W.G., and Hiebert, E.** (1980). Translation of potyvirus RNA in a rabbit reticulocyte lysate: identification of nuclear inclusion proteins as products of tobacco etch virus RNA translation and cylindrical inclusion protein as product of the potyvirus genome. *Virology* **104**, 174-182.
- Dougherty, W.G., and Parks, T.D.** (1991). Post-translational processing of the tobacco etch virus 49-kDa small nuclear inclusion polyprotein: identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains. *Virology* **183**, 449-456.
- Dougherty, W.G., Willis, L., and Johnston, R.E.** (1985). Topographic analysis of tobacco etch virus capsid protein epitopes. *Virology* **144**, 66-72.
- Dougherty, W.G., Cary, S.M., and Parks, T.D.** (1989). Molecular genetic analysis of a plant virus polyprotein cleavage site: a model. *Virology* **171**, 356-364.
- Dunoyer, P., Lecellier, C.H., Parizotto, E.A., Himber, C., and Voinnet, O.** (2004). Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell* **16**, 1235-1250.
- Dunoyer, P., Pfeffer, S., Fritsch, C., Hemmer, O., Voinnet, O., and Richards, K.E.** (2002). Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by peanut clump virus. *Plant Journal* **29**, 555-567.

- Duprat, A., Caranta, C., Revers, F., Menand, B., Browning, K.S., and Robaglia, C. (2002). The Arabidopsis eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant Journal* **32**, 927-934.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001a). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes and Development* **15**, 188-200.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001b). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498.
- Elmayan, T., and Vaucheret, H. (1996). Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *Plant Journal* **9**, 787-797.
- English, J.J., Mueller, E., and Baulcombe, D.C. (1996). Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *Plant Cell* **8**, 179-188.
- English, J.J., Davenport, G.F., Elmayan, T., Vaucheret, H., and Baulcombe, D.C. (1997). Requirement of sense transcription for homology-dependent virus resistance and trans-inactivation. *Plant Journal* **12**, 597-603.
- Fellers, J., Wan, J., Hong, Y., Collins, G.B., and Hunt, A.G. (1998). In vitro interactions between a potyvirus-encoded, genome-linked protein and RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of General Virology* **79**, 2043-2049.
- Fernández, A., Laín, S., and García, J.A. (1995). RNA helicase activity of the plum pox potyvirus CI protein expressed in Escherichia coli. Mapping of an RNA binding domain. *Nucleic Acids Research* **23**, 1327-1332.
- Fernández, A., Guo, H.S., Sáenz, P., Simón-Buela, L., Gómez de Cedrón, M., and García, J.A. (1997). The motif V of plum pox potyvirus CI RNA helicase is involved in NTP hydrolysis and is essential for virus RNA replication. *Nucleic Acids Research* **25**, 4474-4480.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
- García, J.A., Laín, S., Cervera, M.T., Riechmann, J.L., and Martín, M.T. (1990). Mutational analysis of plum pox potyvirus polyprotein processing by the NIa protease in Escherichia coli. *Journal of General Virology* **71**, 2773-2779.
- García-Luque, I., Kaper, J.M., Díaz-Ruíz, J.R., and Rubio-Huertos, M. (1984). Emergence and characterization of satellite RNAs associated with Spanish cucumber mosaic virus isolates. *Journal of General Virology* **65**, 539-547.
- García-Luque, I., Serra, M.T., Alonso, E., Wicke, B., Ferrero, M.L., and Díaz-Ruíz, J.R. (1990). Characterization of a Spanish strain of pepper mild mottle virus (PMMV-S) and its relationship to other tobamoviruses. *Journal of Phytopathology* **129**, 1-8.
- Gerlach, W.L., Llewellyn, D., and Haseloff, J. (1987). Construction of a disease resistance gene using the satellite RNA of tobacco ringspot virus. *Nature* **328**, 802-806.
- Giachetti, C., and Semler, B.L. (1991). Role of a viral membrane polypeptide in strand-specific initiation of poliovirus RNA synthesis. *Journal of Virology* **65**, 2647-2654.
- Goldbach, R. (1987). Genome similarities between plant and animal RNA viruses. *Microbiological Sciences* **4**, 197-202.
- Goldbach, R., Bucher, E., and Prins, M. (2003). Resistance mechanisms to plant viruses: an overview. *Virus Research* **92**, 207-212.
- González Jara, P. (2002). Análisis de la función supresora del silenciamiento génico de la proteína HC-Pro del virus de la Sharka (PPV). Departamento de Biología Vegetal I, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid.

- González-Jara, P., Tenllado, F., Martínez-García, B., Atencio, F.A., Barajas, D., Vargas, M., Díaz-Ruiz, J. and Díaz-Ruiz, J.R.** (2004). Host-dependent differences during synergistic infection by Potyviruses with potato virus X. *Molecular Plant Pathology* **5**, 29-35.
- González-Jara, P., Atencio, F.A., Martínez-García, B., Barajas, D., Tenllado, F., and Díaz-Ruiz, J.R.** (2005). A single amino acid mutation in the Plum pox virus HC-Pro gene abolishes both synergistic and silencing suppression activities. *Phytopathology* (en prensa).
- Goodwin, J., Chapman, K., Swaney, S., Parks, T.D., Wernsman, E.A., and Dougherty, W.G.** (1996). Genetic and biochemical dissection of transgenic RNA-mediated virus resistance. *Plant Cell* **8**, 95-105.
- Guo, D., Rajamaki, M.L., Saarma, M., and Valkonen, J.P.** (2001). Towards a protein interaction map of potyviruses: protein interaction matrixes of two potyviruses based on the yeast two-hybrid system. *Journal of General Virology* **82**, 935-939.
- Guo, D., Spetz, C., Saarma, M., and Valkonen, J.P.** (2003). Two potato proteins, including a novel RING finger protein (HIP1), interact with the potyviral multifunctional protein HC-Pro. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**, 405-410.
- Guo, H.S., and García, J.A.** (1997). Delayed resistance to plum pox virus mediated by a mutated RNA replicase gene: involvement of a gene silencing mechanism. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**, 160-170.
- Guo, H.S., and Ding, S.W.** (2002). A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO Journal* **21**, 398-407.
- Guo, H.S., Lopez-Moya, J.J., and Garcia, J.A.** (1998). Susceptibility to recombination rearrangements of a chimeric plum pox potyvirus genome after insertion of a foreign gene. *Virus Research* **57**, 183-195.
- Guo, H.S., López-Moya, J.J., and García, J.A.** (1999). Mitotic stability of infection-induced resistance to plum pox potyvirus associated with transgene silencing and DNA methylation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**, 103-111.
- Haldeman-Cahill, R., Darós, J.A., and Carrington, J.C.** (1998). Secondary structures in the capsid protein coding sequence and 3' nontranslated region involved in amplification of the tobacco etch virus genome. *Journal of Virology* **72**, 4072-4079.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L., and Baulcombe, D.** (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO Journal* **21**, 4671-4679.
- Hammond, S., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G.** (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293-229.
- Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R., and Hannon, G.J.** (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* **293**, 1146-1150.
- Hari, V., Siegel, A., Rozek, C., and Timberlake, W.E.** (1979). The RNA of tobacco etch virus contains poly(A). *Virology* **92**, 568-571.
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C., and Voinnet, O.** (2003). Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO Journal* **22**, 4523-4533.
- Hollings, M., and Brunt, A.A.** (1981). Potyvirus group. *CMI/AAB Descriptions of plant viruses*, pp. 245.
- Hong, Y., and Hunt, A.G.** (1996). RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* **226**, 146-151.
- Hong, Y., Levay, K., Murphy, J.F., Klein, P.G., Shaw, J.G., and Hunt, A.G.** (1995). A potyvirus polymerase interacts with the viral coat protein and VPg in yeast cells. *Virology* **214**, 159-166.

- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., and Fraley, R.T. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**, 1229-1231.
- Hull, R. (2002). *Matthews' Plant Virology*. Academic Press, Londres.
- Hurtado, A., Romero, C., Vilanova, S., Abbott, G., Llacer, G., and Badenes, L. (2002). Genetic linkage maps of two apricot cultivars ( *Prunus armeniaca* L.), and mapping of PPV (sharka) resistance. *Theoretical and Applied Genetics* **105**, 182-191.
- Hutvagner, G., and Zamore, P.D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* **297**, 2056-2060.
- Jacquet, C., Ravelonandro, M., Bachelier, J.C., and Dunez, J. (1998). High resistance to plum pox virus (PPV) in transgenic plants containing modified and truncated forms of PPV coat protein gene. *Transgenic Research* **7**, 29-39.
- Jefferson, R.A., Burgess, S.M., and Hirsh, D. (1986). beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **83**, 8447-8451.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* **6**, 3901-3907.
- Johansen, L.K., and Carrington, J.C. (2001). Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Physiology* **126**, 930-938.
- Johnson, K.L., and Sarnow, P. (1991). Three poliovirus 2B mutants exhibit noncomplementable defects in viral RNA amplification and display dosage-dependent dominance over wild-type poliovirus. *Journal of Virology* **65**, 4341-4349.
- Jones, A.L., Johansen, I.E., Bean, S.J., Bach, I., and Maule, A.J. (1998). Specificity of resistance to pea seed-borne mosaic potyvirus in transgenic peas expressing the viral replicase (NIb) gene. *Journal of General Virology* **79**, 3129-3137.
- Jones, J.D., Shlumukov, L., Carland, F., English, J., Scofield, S.R., Bishop, G.J., and Harrison, K. (1992). Effective vectors for transformation, expression of heterologous genes, and assaying transposon excision in transgenic plants. *Transgenic Research* **1**, 285-297.
- Jones, L., Ratcliff, F., and Baulcombe, D.C. (2001). RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Current Biology* **11**, 747-757.
- Jones, L., Hamilton, A.J., Voinnet, O., Thomas, C.L., Maule, A.J., and Baulcombe, D.C. (1999). RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell* **11**, 2291-2301.
- Kalashyan, Y.A., Bilkey, N.D., Verderevskaya, T.D., and Rubina, E.V. (1994). Plum pox potyvirus in sour cherry in Moldova. *Bulletin OEPP/EPPO* **24**, 645-649.
- Kashiwazaki, S., Minobe, Y., and Hibino, H. (1991). Nucleotide sequence of barley yellow mosaic virus RNA 2. *Journal of General Virology* **72**, 995-999.
- Kasschau, K.D., and Carrington, J.C. (1995). Requirement for HC-Pro processing during genome amplification of tobacco etch potyvirus. *Virology* **209**, 268-273.
- Kasschau, K.D., and Carrington, J.C. (1998). A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* **95**, 461-470.
- Kasschau, K.D., and Carrington, J.C. (2001). Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. *Virology* **285**, 71-81.
- Kasschau, K.D., Cronin, S., and Carrington, J.C. (1997). Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology* **228**, 251-262.

- Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J., Krizan, K.A., and Carrington, J.C. (2003). P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Developmental Cell* **4**, 205-217.
- Kegler, H., and Schade, C. (1971). Plum pox virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses* **70**.
- Kegler, H., Fuchs, E., Gruntzig, M., and Schwarz, S. (1998). Some results of 50 years of research on the resistance to plum pox virus. *Acta Virologica* **42**, 200-215.
- Kennerdell, J.R., and Carthew, R.W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway. *Cell* **95**, 1017-1026.
- Kim, D.H., Han, J.S., Lew, J., Kim, S.S., Kang, B.H., Hwang, D.C., Jang, D.S., Kim, W., Song, B.D., and Choi, K.Y. (1998). Effects of mutations in the C-terminal region of NIa protease on cis-cleavage between NIa and NIb. *Virology* **241**, 94-100.
- Klahre, U., Crete, P., Leuenberger, S.A., Iglesias, V.A., and Meins, F. (2002). High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **99**, 11981-11986.
- Kollar, A., Dalmay, T., and Burgyan, J. (1993). Defective interfering RNA-mediated resistance against cymbidium ringspot tobravirus in transgenic plants. *Virology* **193**, 313-318.
- Koonin, E.V., Choi, G.H., Nuss, D.L., Shapira, R., and Carrington, J.C. (1991). Evidence for common ancestry of a chestnut blight hypovirulence-associated double-stranded RNA and a group of positive-strand RNA plant viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **88**, 10647-10651.
- Kubota, K., Tsuda, S., Tamai, A., and Meshi, T. (2003). Tomato mosaic virus replication protein suppresses virus-targeted posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology* **77**, 11016-11026.
- Labonne, G., Yvon, M., Quiot, J.B., Avinent, L., and Llacer, G. (1995). Aphids as potential vectors of plum pox virus: comparison of methods of testing and epidemiological consequences. *Acta Horticulturae* **386**, 207-218.
- Laín, S., Riechmann, J.L., and García, J.A. (1989). The complete nucleotide sequence of plum pox potyvirus RNA. *Virus Research* **13**, 157-172.
- Laín, S., Riechmann, J.L., and Garcia, J.A. (1990). RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucleic Acids Research* **18**, 7003-7006.
- Laín, S., Martín, M.T., Riechmann, J.L., and García, J.A. (1991). Novel catalytic activity associated with positive-strand RNA virus infection: nucleic acid-stimulated ATPase activity of the plum pox potyvirus helicase-like protein. *Journal of Virology* **65**, 1-6.
- Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D., and Burgyan, J. (2004). Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tobraviruses. *EMBO Journal* **23**, 876-884.
- Langenberg, W.G. (1993). Structural proteins of three viruses in the Potyviridae adhere only to their homologous cylindrical inclusions in mixed infections. *Journal of Structural Biology* **110**, 188-195.
- Langenberg, W.G., and Zhang, L. (1997). Immunocytochemistry shows the presence of tobacco etch virus P3 protein in nuclear inclusions. *Journal of Structural Biology* **118**, 243-247.
- Lapidot, M., Gafny, R., Ding, B., Wolf, S., Lucas, W.J., and Beachy, R.N. (1993). A dysfunctional movement protein of tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in transgenic plants. *Plant Journal* **4**, 959-970.
- Lawson, C., Kaniewski, W., Haley, L., Rozman, R., Newell, C., Sanders, P., and Tumer, N.E. (1990). Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank. *Bio/technology* (NY) **8**, 127-134.

- Lecellier, C.H., and Voinnet, O.** (2004). RNA silencing: no mercy for viruses? *Immunological Reviews* **198**, 285-303.
- Lee, Y.S., Nakahara, K., Pham, J.W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E.J., and Carthew, R.W.** (2004). Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* **117**, 69-81.
- Lellis, A.D., Kasschau, K.D., Whitham, S.A., and Carrington, J.C.** (2002). Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Current Biology* **12**, 1046-1051.
- Lessemann, D.E.** (1988). Cytopathology. En: The Plant Viruses. Ed: R.G. Milne. *Plenum Press*, Nueva York & Londres, pp. 179-235.
- Li, H., Li, W.X., and Ding, S.W.** (2002). Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* **296**, 1319-1321.
- Li, W.X., Li, H., Lu, R., Li, F., Dus, M., Atkinson, P., Brydon, E.W., Johnson, K.L., García-Sastre, A., Ball, L.A., Palese, P., and Ding, S.W.** (2004). Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **101**, 1350-1355.
- Lindbo, J.A., and Dougherty, W.G.** (1992a). Pathogen-derived resistance to a potyvirus: immune and resistant phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **5**, 144-153.
- Lindbo, J.A., and Dougherty, W.G.** (1992b). Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* **189**, 725-733.
- Lindbo, J.A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W.M., and Dougherty, W.G.** (1993). Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implication for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* **5**, 1749-1759.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J.** (2004a). Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi. *Science* **305**, 1437-1441.
- Liu, L., Grainer, J., Cañizares, M.C., Angell, S.M., and Lomonossoff, G.P.** (2004). Cowpea mosaic virus RNA-1 acts as an amplicon whose effects can be counteracted by a RNA-2-encoded suppressor of silencing. *Virology* **323**, 37-48
- Liu, Y., Nakayama, N., Schiff, M., Litt, A., Irish, V.F., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2004b). Virus Induced Gene Silencing of a DEFICIENS Ortholog in *Nicotiana Benthamiana*. *Plant Molecular Biology* **54**, 701-711.
- Llacer, G., Cambra, M., and Laviña, A.** (1985). Detección y primeros estudios del virus de la sharka en España. *Anales INIA, Serie Agrícola* **28**, 157-166.
- Llave, C., Kasschau, K.D., and Carrington, J.C.** (2000). Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**, 13401-13406.
- Llave, C., Tenllado, F., and Díaz-Ruíz, J.R.** (2004). RNA silencing and other small RNA-related processes as innovative molecular tools for control of virus diseases in plants. En: Emerging concepts in plant health management. Eds: R.T. Lartey and A.J. Caesar, *Research Signpost*, Kerala, India. pp. 271-298.
- Llave, C., Martínez, B., Díaz-Ruíz, J.R., and López-Abella, D.** (1999). Serological analysis and coat protein sequence determination of potato virus Y (PVY) pepper pathotypes and differentiation from other PVY strains. *European Journal of Plant Pathology* **105**, 847-857.
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K.D., and Carrington, J.C.** (2002a). Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science* **297**, 2053-2056.

- Llave, C., Kasschau, K.D., Rector, M.A., and Carrington, J.C.** (2002b). Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* **14**, 1605-1619.
- Logemann, J., Schell, J., and Willmitzer, L.** (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissue. *Analytical Biochemistry* **163**, 16-20.
- López-Moya, J.J., Wang, R.Y., and Pirone, T.P.** (1999). Context of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids. *Journal of General Virology* **80**, 3281-3288.
- López-Moya, J.J., Canto, T., López-Abella, D., and Díaz-Ruiz, J.R.** (1994). Differentiation of Mediterranean plum pox virus isolates by coat protein analysis. *Plant Pathology* **43**, 164-117.
- López-Moya, J.J., Fernández-Fernández, M.R., Cambra, M., and García, J.A.** (2000). Biotechnological aspects of plum pox virus. *Journal of Biotechnology* **76**, 121-136.
- Lu, R., Folimonov, A., Shintaku, M., Li, W.X., Falk, B.W., Dawson, W.O., and Ding, S.W.** (2004). Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **101**, 15742-15747.
- Lucy, A.P., Guo, H.S., Li, W.X., and Ding, S.W.** (2000). Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO Journal* **19**, 1672-1680.
- Mahajan, S., Dolja, V.V., and Carrington, J.C.** (1996). Roles of the sequence encoding tobacco etch virus capsid protein in genome amplification: requirements for the translation process and a cis-active element. *Journal of Virology* **70**, 4370-4379.
- Maia, I.G., and Bernardi, F.** (1996). Nucleic acid-binding properties of a bacterially expressed potato virus Y helper component-proteinase. *Journal of General Virology* **77**, 869-877.
- Maia, I.G., Haenni, A., and Bernardi, F.** (1996). Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. *Journal of General Virology* **77**, 1335-1341.
- Maiti, I.B., Murphy, J.F., Shaw, J.G., and Hunt, A.G.** (1993). Plants that express a potyvirus proteinase gene are resistant to virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **90**, 6110-6114.
- Mallory, A.C., Mlotshwa, S., Bowman, L.H., and Vance, V.B.** (2003). The capacity of transgenic tobacco to send a systemic RNA silencing signal depends on the nature of the inducing transgene locus. *Plant Journal* **35**, 82-92.
- Mallory, A.C., Reinhart, B.J., Bartel, D.P., Vance, V.B., and Bowman, L.H.** (2002). A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **99**, 15228-15233.
- Mallory, A.C., Ely, L., Smith, T.H., Marathe, R., Anandalakshmi, R., Fagard, M., Vaucheret, H., Pruss, G., Bowman, L., and Vance, V.B.** (2001). HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell* **13**, 571-583.
- Marathe, R., Anandalakshmi, R., Smith, T.H., Pruss, G.L., and Vance, V.B.** (2000). RNA viruses as inducers, suppressors and targets of post-transcriptional gene silencing. *Plant Molecular Biology* **43**, 295-306.
- Martín, M.T., and García, J.A.** (1991). Plum pox potyvirus RNA replication in a crude membrane fraction from infected *Nicotiana clevelandii* leaves. *Journal of General Virology* **72**, 785-790.
- Martínez García, B.** (2000). Análisis molecular de las proteínas virales implicadas en la transmisión por pulgones del virus de la Sharka (PPV). Departamento de Biología Vegetal I, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid.
- Matzke, M., Aufsatz, W., Kanno, T., Daxinger, L., Papp, I., Mette, M.F., and Matzke, A.J.** (2004). Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Biochimica et Biophysica Acta* **1677**, 129-141.

- McGarvey, P., and Kaper, J.M.** (1991). A simple and rapid method for screening transgenic plants using the PCR. *Biotechniques* **11**, 428-432.
- Merits, A., Guo, D., and Saarma, M.** (1998). VPg, coat protein and five non-structural proteins of potato A potyvirus bind RNA in a sequence-unspecific manner. *Journal of General Virology* **79**, 3123-3127.
- Mitter, N., Sulistyowati, E., and Dietzgen, R.G.** (2003). Cucumber mosaic virus infection transiently breaks dsRNA-induced transgenic immunity to Potato virus Y in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**, 936-944.
- Mitter, N., Sulistyowati, E., Graham, M.W., and Dietzgen, R.G.** (2001). Suppression of gene silencing: a threat to virus-resistant transgenic plants? *Trends in Plant Sciences* **6**, 246-247.
- Mlotshwa, S., Verver, J., Sithole-Niang, I., Prins, M., Van Kammen, A.B., and Wellink, J.** (2002a). Transgenic plants expressing HC-Pro show enhanced virus sensitivity while silencing of the transgene results in resistance. *Virus Genes* **25**, 45-57.
- Mlotshwa, S., Verver, J., Sithole-Niang, I., Gopinath, K., Carette, J., van Kammen, A., and Wellink, J.** (2002b). Subcellular location of the helper component-proteinase of Cowpea aphid-borne mosaic virus. *Virus Genes* **25**, 207-216.
- Mochizuki, K., and Gorovsky, M.A.** (2004). Small RNAs in genome rearrangement in Tetrahymena. *Current Opinion in Genetics and Development* **14**, 181-187.
- Moissiard, G., and Voinnet, O.** (2004). Viral suppression of RNA silencing in plants. *Molecular Plant Pathology* **5**, 71-82.
- Moreno, M., Bernal, J.J., Jiménez, I., and Rodríguez-Cerezo, E.** (1998). Resistance in plants transformed with the P1 or P3 gene of tobacco vein mottling potyvirus. *Journal of General Virology* **79**, 2819-2827.
- Mourrain, P., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Jouette, D., Lacombe, A.M., Nikic, S., Picault, N., Remoue, K., Sanial, M., Vo, T.A., and Vaucheret, H.** (2000). Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* **101**, 533-542.
- Mueller, E., Gilbert, J.E., Davenport, G.F., Brigneti, G., and Baulcombe, D.** (1995). Homology-dependent resistance: Transgenic virus resistance in plants related to homology-dependent gene silencing. *The Plant Journal* **7**, 1001-1013.
- Murashige, T., and Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid grow and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Murphy, J.F., Rhoads, R.E., Hunt, A.G., and Shaw, J.G.** (1990). The VPg of tobacco etch virus RNA is the 49-kDa proteinase or the N-terminal 24-kDa part of the proteinase. *Virology* **178**, 285-288.
- Murphy, J.F., Klein, P.G., Hunt, A.G., and Shaw, J.G.** (1996). Replacement of the tyrosine residue that links a potyviral VPg to the viral RNA is lethal. *Virology* **220**, 535-538.
- Murphy, J.F., Rychlik, W., Rhoads, R.E., Hunt, A.G., and Shaw, J.G.** (1991). A tyrosine residue in the small nuclear inclusion protein of tobacco vein mottling virus links the VPg to the viral RNA. *Journal of Virology* **65**, 511-513.
- Muskens, M.W., Vissers, A.P., Mol, J.N., and Kooter, J.M.** (2000). Role of inverted DNA repeats in transcriptional and post-transcriptional gene silencing. *Plant Molecular Biology* **43**, 243-260.
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R.** (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* **2**, 279-289.
- Németh, M.** (1994). History and importance of plum pox in stone fruit production. *Bulletin OEPP/EPPO* **24**, 525-536.

- Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K., and Ullu, E.** (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**, 14687-14692.
- Oh, C.S., and Carrington, J.C.** (1989). Identification of essential residues in potyvirus proteinase HC-Pro by site-directed mutagenesis. *Virology* **173**, 692-699.
- Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H., and Siomi, M.C.** (2004). Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes and Development* **18**, 1655-1666.
- Palauqui, J.C., and Balzergue, S.** (1999). Activation of systemic acquired silencing by localised introduction of DNA. *Current Biology* **9**, 59-66.
- Palauqui, J.C., Elmayan, T., Pollien, J.M., and Vaucheret, H.** (1997). Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO Journal* **16**, 4738-4745.
- Peng, Y.H., Kadoury, D., Gal-On, A., Huet, H., Wang, Y., and Raccah, B.** (1998). Mutations in the HC-Pro gene of zucchini yellow mosaic potyvirus: effects on aphid transmission and binding to purified virions. *Journal of General Virology* **79**, 897-904.
- Pfeffer, S., Dunoyer, P., Heim, F., Richards, K.E., Jonard, G., and Ziegler-Graff, V.** (2002). P0 of beet Western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology* **76**, 6815-6824.
- Pham, J.W., Pellino, J.L., Lee, Y.S., Carthew, R.W., and Sontheimer, E.J.** (2004). A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell* **117**, 83-94.
- Plasterk, R.H.** (2002). RNA silencing: The genome's immune system. *Science* **296**, 1263-1265.
- Powell, P.A., Sanders, P.R., Tumer, N., Fraley, R.T., and Beachy, R.N.** (1990). Protection against tobacco mosaic virus infection in transgenic plants requires accumulation of coat protein rather than coat protein RNA sequences. *Virology* **175**, 124-130.
- Powell-Abel, P., Nelson, R.S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S.G., Fraley, R.T., and Beachy, R.N.** (1986). Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* **232**, 738-743.
- Prins, M., Resende Rde, O., Anker, C., van Schepen, A., de Haan, P., and Goldbach, R.** (1996). Engineered RNA-mediated resistance to tomato spotted wilt virus is sequence specific. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **9**, 416-418.
- Pruss, G., Ge, X., Shi, X.M., Carrington, J.C., and Vance, V.B.** (1997). Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* **9**, 859-868.
- Qu, F., Ren, T., and Morris, T.J.** (2003). The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *Journal of Virology* **77**, 511-522.
- Que, Q., Wang, H.Y., English, J.J., and Jorgensen, R.A.** (1997). The Frequency and Degree of Cosuppression by Sense Chalcone Synthase Transgenes Are Dependent on Transgene Promoter Strength and Are Reduced by Premature Nonsense Codons in the Transgene Coding Sequence. *Plant Cell* **9**, 1357-1368.
- Quemada, H., Sieu, L.C., Siemieniak, D.R., Gonsalves, D., and Slightom, J.L.** (1990). Watermelon mosaic virus II and zucchini yellow mosaic virus: cloning of 3'-terminal regions, nucleotide sequences, and phylogenetic comparisons. *Journal of General Virology* **71**, 1451-1460.
- Rabindran, S., and Dawson, W.O.** (2001). Assessment of recombinants that arise from the use of a TMV-based transient expression vector. *Virology* **284**, 182-189.
- Ratcliff, F., Harrison, B.D., and Baulcombe, D.C.** (1997). A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* **276**, 1558-1560.

- Ratcliff, F., MacFarlane, S., and Baulcombe, D.C. (1999). Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross protection between viruses. *Plant Cell* **11**, 1207-1215.
- Ravelonandro, M., Scorza, R., and Dunez, J. (1998). Characterization of phenotype resistance to plum pox of transgenic plums expressing plum pox virus capsid gene. *Acta Virologica* **42**, 270-272.
- Ravelonandro, M., Monsion, M., Delbos, R., and Dunez, J. (1993a). Variable resistance to plum pox virus and potato virus Y infection in transgenic plants expressing plum pox virus coat protein. *Plant Science* **91**, 157-169.
- Ravelonandro, M., Peyruchaud, O., Garrigue, L., de Marcillac, G., and Dunez, J. (1993b). Immunodetection of the plum pox virus helper component in infected plants and expression of its gene in transgenic plants. *Archives of Virology* **130**, 251-268.
- Ravelonandro, M., Scorza, R., Callahan, A., Levy, L., Jacquet, C., Monsion, M., and Damsteegt, V. (2000). The use of transgenic fruit trees as a resistance strategy for virus epidemics: the plum pox (sharka) model. *Virus Research* **71**, 63-69.
- Reavy, B., Dawson, S., Canto, T., and MacFarlane, S.A. (2004). Heterologous expression of plant virus genes that suppress post-transcriptional gene silencing results in suppression of RNA interference in *Drosophila* cells. *BMC Biotechnology* **4**, 18.
- Reed, J.C., Kasschau, K.D., Prokhnovsky, A.I., Gopinath, K., Pogue, G.P., Carrington, J.C., and Dolja, V.V. (2003). Suppressor of RNA silencing encoded by Beet yellows virus. *Virology* **306**, 203-209.
- Register III, J.C., and Beachy, R.N. (1988). Coat protein-mediated resistance in transgenic tobacco expressing the tobacco mosaic virus coat protein from tissue-specific promoters. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **6**, 323-330.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B., and Bartel, D.P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes and Development* **16**, 1616-1626.
- Restrepo, M.A., Freed, D.D., and Carrington, J.C. (1990). Nuclear transport of plant potyviral proteins. *Plant Cell* **2**, 987-998.
- Restrepo-Hartwig, M.A., and Carrington, J.C. (1992). Regulation of nuclear transport of a plant potyvirus protein by autoproteolysis. *Journal of Virology* **66**, 5662-5666.
- Restrepo-Hartwig, M.A., and Carrington, J.C. (1994). The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. *Journal of Virology* **68**, 2388-2397.
- Riechmann, J.L., Laín, S., and García, J.A. (1989). The genome-linked protein and 5' end RNA sequence of plum pox potyvirus. *Journal of General Virology* **70**, 2785-2789.
- Riechmann, J.L., Laín, S., and García, J.A. (1992). Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology* **73**, 1-16.
- Riechmann, J.L., Cervera, M.T., and García, J.A. (1995). Processing of the plum pox virus polyprotein at the P3-6K1 junction is not required for virus viability. *Journal of General Virology* **76**, 951-956.
- Robaglia, C., Durand-Tardif, M., Tronchet, M., Boudazin, G., Astier-Manificier, S., and Casse-Delbart, F. (1989). Nucleotide sequence of potato virus Y (N Strain) genomic RNA. *Journal of General Virology* **70** ( Pt 4), 935-947.
- Roberts, I.M., Wang, D., Findlay, K., and Maule, A.J. (1998). Ultrastructural and temporal observations of the potyvirus cylindrical inclusions (CIs) show that the CI protein acts transiently in aiding virus movement. *Virology* **245**, 173-181.
- Rodríguez-Cerezo, E., and Shaw, J.G. (1991). Two newly detected nonstructural viral proteins in potyvirus-infected cells. *Virology* **185**, 572-579.

- Rodríguez-Cerezo, E., Klein, P.G., and Shaw, J.G.** (1991). A determinant of disease symptom severity is located in the 3'-terminal noncoding region of the RNA of a plant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **88**, 9863-9867.
- Rodríguez-Cerezo, E., Ammar, E.D., Pirone, T.P., and Shaw, J.G.** (1993). Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *Journal of General Virology* **74 ( Pt 9)**, 1945-1949.
- Rodríguez-Cerezo, E., Findlay, K., Shaw, J.G., Lomonossoff, G.P., Qiu, S.G., Linstead, P., Shanks, M., and Risco, C.** (1997). The coat and cylindrical inclusion proteins of a potyvirus are associated with connections between plant cells. *Virology* **236**, 296-306.
- Rojas, M.R., Zerbini, F.M., Allison, R.F., Gilbertson, R.L., and Lucas, W.J.** (1997). Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* **237**, 283-295.
- Romano, N., and Macino, G.** (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology* **22**, 3343-3353.
- Roth, B.M., Pruss, G.J., and Vance, V.B.** (2004). Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Research* **102**, 97-108.
- Rubio-Huertos, M., and López-Abella, D.** (1966). Ultraestructura de células de pimiento infectadas con un virus y su localización en las mismas. *Microbiología Española* **19**, 77-86.
- Ruiz, F., Vayssie, L., Klotz, C., Sperling, L., and Madeddu, L.** (1998a). Homology-dependent gene silencing in *Paramecium*. *Molecular Biology of the Cell* **9**, 931-943.
- Ruiz, M.T., Voinnet, O., and Baulcombe, D.C.** (1998b). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* **10**, 937-946.
- Ruiz-García, L., Madueño, F., Wilkinson, M., Haughn, G., Salinas, J., and Martínez-Zapater, J.M.** (1997). Different roles of flowering-time genes in the activation of floral initiation genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **9**, 1921-1934.
- Ryan, M.D., and Flint, M.** (1997). Virus-encoded proteinases of the picornavirus super-group. *Journal of General Virology* **78**, 699-723.
- Sáenz, P., Quiot, L., Quiot, J.B., Candresse, T., and García, J.A.** (2001). Pathogenicity determinants in the complex virus population of a Plum pox virus isolate. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**, 278-287.
- Sáenz, P., Salvador, B., Simón-Mateo, C., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., and García, J.A.** (2002). Host-specific involvement of the HC protein in the long-distance movement of potyviruses. *Journal of Virology* **76**, 1922-1931.
- Sáenz, P., Cervera, M.T., Dallot, S., Quiot, L., Quiot, J.B., Riechmann, J.L., and García, J.A.** (2000). Identification of a pathogenicity determinant of Plum pox virus in the sequence encoding the C-terminal region of protein P3+6K(1). *Journal of General Virology* **81**, 557-566.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanford, J.C., and Johnston, S.A.** (1985). The concept of parasite-derived resistance. Deriving resistance genes from the parasite's own genome. *Journal of Theoretical Biology* **113**, 395-405.
- Savenkov, E.I., and Valkonen, J.P.** (2001a). Coat protein gene-mediated resistance to Potato virus A in transgenic plants is suppressed following infection with another potyvirus. *Journal of General Virology* **82**, 2275-2278.

- Savenkov, E.I., and Valkonen, J.P.** (2001b). Potyviral helper-component proteinase expressed in transgenic plants enhances titers of Potato leaf roll virus but does not alleviate its phloem limitation. *Virology* **283**, 285-293.
- Savenkov, E.I., and Valkonen, J.P.** (2002). Silencing of a viral RNA silencing suppressor in transgenic plants. *Journal of General Virology* **83**, 2325-2335.
- Schaad, M.C., Lellis, A.D., and Carrington, J.C.** (1997a). VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *Journal of Virology* **71**, 8624-8631.
- Schaad, M.C., Jensen, P.E., and Carrington, J.C.** (1997b). Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO Journal* **16**, 4049-4059.
- Schaad, M.C., Haldeman-Cahill, R., Cronin, S., and Carrington, J.C.** (1996). Analysis of the VPg-proteinase (NIa) encoded by tobacco etch potyvirus: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. *Journal of Virology* **70**, 7039-7048.
- Scorza, R., Callahan, A., Levy, L., Damsteegt, V., Webb, K., and Ravelonandro, M.** (2001). Post-transcriptional gene silencing in plum pox virus resistant transgenic European plum containing the plum pox potyvirus coat protein gene. *Transgenic Research* **10**, 201-209.
- Shapira, R., and Nuss, D.L.** (1991). Gene expression by a hypovirulence-associated virus of the chestnut blight fungus involves two papain-like protease activities. Essential residues and cleavage site requirements for p48 autoproteolysis. *The Journal of Biological Chemistry* **266**, 19419-19425.
- Shapira, R., Choi, G.H., and Nuss, D.L.** (1991). Virus-like genetic organization and expression strategy for a double-stranded RNA genetic element associated with biological control of chestnut blight. *EMBO Journal* **10**, 731-739.
- Shi, X.M., Miller, H., Verchot, J., Carrington, J.C., and Vance, V.B.** (1997). Mutations in the region encoding the central domain of helper component-proteinase (HC-Pro) eliminate potato virus X/potyviral synergism. *Virology* **231**, 35-42.
- Shukla, D.D., and Ward, C.W.** (1989). Structure of potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the potyvirus group. *Advances in Virus Research* **36**, 273-314.
- Shukla, D.D., Strike, P.M., Tracy, S.L., Gough, K.H., and Ward, C.W.** (1988). The N and C termini of the coat protein of potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. *Journal of General Virology* **69**, 1497-1508.
- Shukla, D.D., Ford, R.E., Tosic, M., Jilka, J., and Ward, C.W.** (1989). Possible members of the potyvirus group transmitted by mites or whiteflies share epitopes with aphid-transmitted definitive members of the group. *Archives of Virology* **105**, 143-151.
- Sijen, T., and Kooter, J.M.** (2000). Post-transcriptional gene-silencing: RNAs on the attack or on the defense? *BioEssays* **22**, 520-531.
- Sijen, T., and Plasterk, R.H.** (2003). Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi. *Nature* **426**, 310-314.
- Sijen, T., Wellink, J., Hiriart, J.B., and Van Kammen, A.B.** (1996). RNA-mediated virus resistance: Role of repeated transgenes and delineation of targeted regions. *Plant Cell* **8**, 2277-2294.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H., and Fire, A.** (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* **107**, 465-476.
- Silhavy, D., Molnar, A., Lucioli, A., Szittyá, G., Hornyik, C., Tavazza, M., and Burgyan, J.** (2002). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO Journal* **21**, 3070-3080.

- Simón-Buela, L., Guo, H.S., and García, J.A.** (1997). Cap-independent leaky scanning as the mechanism of translation initiation of a plant viral genomic RNA. *Journal of General Virology* **78**, 2691-2699.
- Simón-Mateo, C., López-Moya, J.J., Guo, H.S., González, E., and García, J.A.** (2003). Suppressor activity of potyviral and cucumoviral infections in potyvirus-induced transgene silencing. *Journal of General Virology* **84**, 2877-2883.
- Smardon, A., Spoerke, J.M., Stacey, S.C., Klein, M.E., Mackin, N., and Maine, E.M.** (2000). EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Current Biology* **10**, 169-178.
- Smith, H.A., Swaney, S.L., Parks, T.D., Wernsman, E.A., and Dougherty, W.G.** (1994). Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs: expression, regulation, and fate of nonessential RNAs. *Plant Cell* **6**, 1441-1453.
- Smith, N., Singh, S., Wang, M.B., Stoutjesdijk, P., Green, A., and Waterhouse, P.M.** (2000). Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407**, 319-320.
- Sonoda, S., and Nishiguchi, M.** (2000). Delayed activation of post-transcriptional gene silencing and de novo transgene methylation in plants with the coat protein gene of sweet potato feathery mottle potyvirus. *Plant Science* **156**, 137-144.
- Sonoda, S., Mori, M., and Nishiguchi, M.** (1999). Homology-dependent virus resistance in transgenic plants with the coat protein gene of sweet potato feathery mottle potyvirus: target specificity and transgene methylation. *Phytopathology* **89**, 385-391.
- Stam, M., De Bruin, R., Kenter, S., Van der Hoorn, R.A.L., Van Blokland, R., Mol, J.N., and Kooter, J.M.** (1997). Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in *Petunia* by inverted transgene repeats. *The Plant Journal* **12**, 63-82.
- Suehiro, N., Natsuaki, T., Watanabe, T., and Okuda, S.** (2004). An important determinant of the ability of Turnip mosaic virus to infect *Brassica* spp. and/or *Raphanus sativus* is in its P3 protein. *Journal of General Virology* **85**, 2087-2098.
- Susi, P., Hohkuri, M., Wahlroos, T., and Kilby, N.J.** (2004). Characteristics of RNA silencing in plants: similarities and differences across kingdoms. *Plant Molecular Biology* **54**, 157-174.
- Suzuki, N., and Nuss, D.L.** (2002). Contribution of protein p40 to hypovirus-mediated modulation of fungal host phenotype and viral RNA accumulation. *Journal of Virology* **76**, 7747-7759.
- Suzuki, N., Chen, B., and Nuss, D.L.** (1999). Mapping of a hypovirus p29 protease symptom determinant domain with sequence similarity to potyvirus HC-Pro protease. *Journal of Virology* **73**, 9478-9484.
- Suzuki, N., Geletka, L.M., and Nuss, D.L.** (2000). Essential and dispensable virus-encoded replication elements revealed by efforts To develop hypoviruses as gene expression vectors. *Journal of Virology* **74**, 7568-7577.
- Suzuki, N., Maruyama, K., Moriyama, M., and Nuss, D.L.** (2003). Hypovirus papain-like protease p29 functions in trans to enhance viral double-stranded RNA accumulation and vertical transmission. *Journal of Virology* **77**, 11697-11707.
- Takeda, A., Sugiyama, K., Nagano, H., Mori, M., Kaido, M., Mise, K., Tsuda, S., and Okuno, T.** (2002). Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus. *FEBS Letters* **532**, 75-79.
- Tang, G., Reinhart, B.J., Bartel, D.P., and Zamore, P.D.** (2003). A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes and Development* **17**, 49-63.
- Taschner, P.E., van Marle, G., Brederode, F.T., Tumer, N.E., and Bol, J.F.** (1994). Plants transformed with a mutant alfalfa mosaic virus coat protein gene are resistant to the mutant but not to wild-type virus. *Virology* **203**, 269-276.

- Taverna, S.D., Coyne, R.S., and Allis, C.D.** (2002). Methylation of histone h3 at lysine 9 targets programmed DNA elimination in tetrahymena. *Cell* **110**, 701-711.
- Tavert-Roudet, G., Ravelonandro, M., Bachelier, J.C., and Dunez, J.** (1998). transgenic *Nicotiana benthamiana* plants containing the P1 gene of plum pox virus are resistant to virus challenge. *European Journal of Plant Pathology* **104**, 103-107.
- Tenllado, F., and Díaz-Ruíz, J.R.** (2001). Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection. *Journal of Virology* **75**, 12288-12297.
- Tenllado, F., Llave, C., and Diaz-Ruiz, J.R.** (2004). RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants. *Virus Research* **102**, 85-96.
- Tenllado, F., García-Luque, I., Serra, M.T., and Díaz-Ruíz, J.R.** (1995). *Nicotiana benthamiana* plants transformed with the 54-kDa region of the pepper mild mottle tobamovirus replicase gene exhibit two types of resistance responses against viral infection. *Virology* **211**, 170-183.
- Tenllado, F., García-Luque, I., Serra, M.T., and Díaz-Ruíz, J.R.** (1996). Resistance to pepper mild mottle tobamovirus conferred by the 54-kDa gene sequence in transgenic plants does not require expression of the wild-type 54-kDa protein. *Virology* **219**, 330-335.
- Tenllado, F., Barajas, D., Vargas, M., Atencio, F.A., González-Jara, P., and Díaz-Ruíz, J.R.** (2003). Transient expression of homologous hairpin RNA causes interference with plant virus infection and is overcome by a virus encoded suppressor of gene silencing. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**, 149-158.
- Thomas, C.L., Jones, L., Baulcombe, D.C., and Maule, A.J.** (2001). Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *The Plant Journal* **25**, 417-425.
- Tijsterman, M., Ketting, R.F., and Plasterk, R.H.** (2002). The genetics of RNA silencing. *Annual Review of Genetics* **36**, 489-519.
- Trinks, D., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P.V., Akbergenov, R., Oakeley, E.J., Veluthambi, K., Hohn, T., and Pooggin, M.M.** (2005). Suppression of RNA Silencing by a Geminivirus Nuclear Protein, AC2, Correlates with Transactivation of Host Genes. *Journal of Virology* **79**, 2517-2527.
- Turpen, T.** (1989). Molecular cloning of a potato virus and genome: nucleotide sequence homology in non-coding regions of potyviruses. *Journal of General Virology* **70**, 1951-1960.
- Tuschl, T., Zamore, P.D., Lehmann, R., Bartel, D.P., and Sharp, P.A.** (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes and Development* **13**, 3191-3197.
- Ueki, S., and Citovsky, V.** (2001). Inhibition of systemic onset of post-transcriptional gene silencing by non-toxic concentrations of cadmium. *The Plant Journal* **28**, 283-291.
- Urcuqui-Inchima, S., Maia, I.G., Arruda, P., Haenni, A.L., and Bernardi, F.** (2000). Deletion mapping of the potyviral helper component-proteinase reveals two regions involved in RNA binding. *Virology* **268**, 104-111.
- Vaistij, F.E., Jones, L., and Baulcombe, D.C.** (2002). Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell* **14**, 857-867.
- van den Boogaart, T., Wen, F., Davies, J.W., and Lomonosoff, G.P.** (2001). Replicase-derived resistance against pea early browning virus in *Nicotiana benthamiana* is an unstable resistance based upon posttranscriptional gene silencing. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**, 196-203.
- van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., and Wickner, R.B.** (2000). Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV. *Academic Press*, San Diego.

- Van Wezel, R., Liu, H., Wu, Z., Stanley, J., and Hong, Y.** (2003). Contribution of the zinc finger to zinc and DNA binding by a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology* **77**, 696-700.
- Vance, V.B., Berger, P.H., Carrington, J.C., Hunt, A.G., and Shi, X.M.** (1995). 5' proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology* **206**, 583-590.
- Vastenhouw, N.L., and Plasterk, R.H.** (2004). RNAi protects the *Caenorhabditis elegans* germline against transposition. *Trends in Genetics* **20**, 314-319.
- Vaucheret, H., Béclin, C., and Fagard, M.** (2001). Post-transcriptional gene silencing in plants. *Journal of Cell Science* **114**, 3083-3091.
- Vaucheret, H., Béclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Mourrain, P., Palauqui, J.C., and Vernhettes, S.** (1998). Transgene-induced gene silencing in plants. *The Plant Journal* **16**, 651-659.
- Verchot, J., and Carrington, J.C.** (1995a). Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. *Journal of Virology* **69**, 3668-3674.
- Verchot, J., and Carrington, J.C.** (1995b). Debilitation of plant potyvirus infectivity by P1 proteinase-inactivating mutations and restoration by second-site modifications. *Journal of Virology* **69**, 1582-1590.
- Verchot, J., Koonin, E.V., and Carrington, J.C.** (1991). The 35-kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. *Virology* **185**, 527-535.
- Verchot, J., Herndon, K.L., and Carrington, J.C.** (1992). Mutational analysis of the tobacco etch potyviral 35-kDa proteinase: identification of essential residues and requirements for autoproteolysis. *Virology* **190**, 298-306.
- Verdel, A., Jia, S., Gerber, S., Sugiyama, T., Gygi, S., Grewal, S.I., and Moazed, D.** (2004). RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* **303**, 672-676.
- Voinnet, O.** (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in Genetics* **17**, 449-459.
- Voinnet, O., and Baulcombe, D.C.** (1997). Systemic signalling in gene silencing. *Nature* **389**, 553.
- Voinnet, O., Pinto, V.M., and Baulcombe, D.C.** (1999). Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**, 14147-14152.
- Voinnet, O., Lederer, C., and Baulcombe, D.C.** (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* **103**, 157-167.
- Voinnet, O., Vain, P., Angell, S., and Baulcombe, D.C.** (1998). Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* **95**, 177-187.
- Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.L., and Martienssen, R.A.** (2002). Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* **297**, 1833-1837.
- Wang, M.B., and Waterhouse, P.M.** (2000). High-efficiency silencing of a beta-glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but is independent of DNA methylation. *Plant Molecular Biology* **43**, 67-82.
- Wang, M.B., Bian, X.Y., Wu, L.M., Liu, L.X., Smith, N.A., Isenegger, D., Wu, R.M., Masuta, C., Vance, V.B., Watson, J.M., Rezaian, A., Dennis, E.S., and Waterhouse, P.M.** (2004). On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **101**, 3275-3280.

- Wang, R.Y., Powell, G., Hardie, J., and Pirone, T.P.** (1998). Role of the helper component in vector-specific transmission of potyviruses. *Journal of General Virology* **79**, 1519-1524.
- Wang, X., Ullah, Z., and Grumet, R.** (2000). Interaction between zucchini yellow mosaic potyvirus RNA-dependent RNA polymerase and host poly-(A) binding protein. *Virology* **275**, 433-443.
- Ward, C.W., and Shukla, D.D.** (1991). Taxonomy of potyviruses: current problems and some solutions. *Intervirology* **32**, 269-296.
- Wassenegger, M., and Pelissier, T.** (1998). A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. *Plant Molecular Biology* **37**, 349-362.
- Waterhouse, P.M., Gramham, M., and Wang, M.B.** (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**, 13959-13964.
- Waterhouse, P.M., Smith, N.A., and Wang, M.B.** (1999). Virus resistance and gene silencing: killing the messenger. *Trends in Plant Science* **4**, 452-457.
- Wisniewski, L.A., Powell, P.A., Nelson, R.S., and Beachy, R.N.** (1990). Local and systemic spread of tobacco mosaic virus in transgenic tobacco. *Plant Cell* **2**, 559-567.
- Wittmann, S., Chatel, H., Fortin, M.G., and Laliberte, J.F.** (1997). Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology* **234**, 84-92.
- Wittner, A., Palkovics, L., and Balazs, E.** (1998). *Nicotiana benthamiana* plants transformed with the plum pox virus helicase gene are resistant to virus infection. *Virus Research* **53**, 97-103.
- Wu, X., and Shaw, J.G.** (1998). Evidence that assembly of a potyvirus begins near the 5' terminus of the viral RNA. *Journal of General Virology* **79**, 1525-1529.
- Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E., and Carrington, J.C.** (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biology* **2**, E104.
- Yang, S., and Ravelonandro, M.** (2002). Molecular studies of the synergistic interactions between Plum pox virus HC-Pro protein and Potato virus X. *Archives of Virology* **147**, 2301-2312.
- Yelina, N.E., Savenkov, E.I., Solovyev, A.G., Morozov, S.Y., and Valkonen, J.P.** (2002). Long-distance movement, virulence, and RNA silencing suppression controlled by a single protein in hordei- and potyviruses: complementary functions between virus families. *Journal of Virology* **76**, 12981-12991.
- Yoo, B.C., Kragler, F., Varkonyi-Gasic, E., Haywood, V., Archer-Evans, S., Lee, Y.M., Lough, T.J., and Lucas, W.J.** (2004). A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell* **16**, 1979-2000.
- Zamore, P., Tuschl, T., Sharp, P.A., and Bartel, D.P.** (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**, 25-33.