

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



DESARROLLO DE CIRCUITOS GENÉTICOS DE
REGULACIÓN POSTRADUCCIONAL BASADOS EN
LA PROTEASA N1a DE LOS POTYVIRUS.

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO FINAL DE GRADO

AUTORA: **Eva María Gómez Álvarez**

TUTOR ACADÉMICO: Carmelo López del Rincón

COTUTOR EXTERNO: José Antonio Daròs Arnau

Curso Académico: 2017/2018

VALENCIA, JUNIO 2018.

TÍTULO: Desarrollo de circuitos genéticos de regulación postraduccional basados en la proteasa NIa de los potyvirus.

AUTORA: Dña. Eva María Gómez Álvarez.

TUTOR ACADÉMICO: Prof. D. Carmelo López del Rincón.

COTUTOR EXTERNO: D. José Antonio Daròs Arnau.

LOCALIDAD Y FECHA: València, Junio 2018.

RESUMEN

Los futuros desarrollos en biología sintética de plantas requerirán que previamente se haya definido una serie de elementos genéticos capaces de desarrollar funciones precisas y específicas en las células donde se expresan. Recientemente, el grupo de investigación Biotecnología de Virus de Plantas (IBMCP, CSIC-Universitat Politècnica de València) ha desarrollado circuitos genéticos capaces de realizar operaciones lógicas básicas (YES, OR y AND) en plantas, cuya señal de salida es la acumulación de pigmentos endógenos visibles a simple vista y cuantificables espectrofotométricamente. Estos circuitos se basan en la actividad del factor de transcripción Rosea1 de *Antirrhinum majus* que induce la producción de antocianinas. Cuando este factor de transcripción se fusiona a un fragmento amino terminal de la RNA polimerasa NIb del virus del mosaico de la sandía es inactivo. Sin embargo, cuando entre estos dos elementos se interpone la diana de reconocimiento de la proteasa NIa (NIaPro) de un potyvirus y se coexpresa esta proteasa altamente específica en el tejido de la planta, su actividad libera al factor de transcripción con la consiguiente acumulación de antocianinas.

En este trabajo, utilizando el circuito sintético YES de acumulación de antocianinas desencadenado por la expresión de NIaPro, se ha analizado la eficiencia de las proteasas de una serie de especies distintas de potyvirus pertenecientes a distintos clados en su árbol filogenético. Con ello se ha pretendido aumentar el número de proteasas específicas disponibles para futuros desarrollos de biología sintética. Para ello se clonaron los cDNAs de las NIaPro de diez potyvirus y, mediante expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, se enfrentaron a sus dianas peptídicas incluidas en diferentes versiones de la puerta YES. La eficiencia del procesamiento de cada proteasa se determinó cuantificando la acumulación de antocianinas en el tejido infiltrado de *N. benthamiana*. Los resultados mostraron que las NIaPro del virus del grabado del tabaco, virus del mosaico del nabo y virus de la viruela del ciruelo son muy eficientes en el reconocimiento de su diana específica. Por contra, las NIaPro del virus del moteado de las venas del tabaco (TVMV), virus del mosaico de la soja y virus del enanismo amarillo de la cebolla son poco eficientes e incapaces de activar una acumulación substancial de antocianinas. Sin embargo, como se demuestra en el caso del TVMV, esta baja eficiencia se puede contrarrestar multiplicando el número de dianas en la construcción reportera YES. En el caso de las dianas del virus del mosaico del *Hordeum* (HoMV), virus del moteado de las venas del pimiento, virus del mosaico de la lechuga y virus Y de la patata se observó que el fragmento de NIb no era capaz de inhibir la actividad de Rosea1. No obstante, este problema también puede ser solucionado aumentando el tamaño del fragmento inhibitorio de 100 a 200 aminoácidos, como se muestra en el caso del HoMV. En conclusión, esta investigación ha permitido aumentar el número de proteasas específicas disponible para desarrollos de biología sintética en plantas y ha marcado algunas líneas de actuación para incorporar otras menos eficientes.

PALABRAS CLAVE

Biología sintética, circuitos genéticos, proteasa NIa, factor de transcripción, Rosea1, antocianinas.

ABSTRACT

Future research in plant synthetic biology will require definitions of new elements able to develop precise and specific functions in cells. Recently, the research group Plant Viruses Biotechnology (IBMCP, CSIC-Universitat Politècnica de València) has developed different genetic circuits capable of performing basic logic operations (YES, OR and AND) in plants. The output signal of these circuits is the accumulation of plant endogenous pigments, which are visible to the naked eye and are also spectrophotometrically quantifiable. These circuits are based on the activity of the *Antirrhinum majus* transcription factor Rosea1 that induces anthocyanins production. When this transcription factor is fused with an amino terminal fragment of the watermelon mosaic virus RNA polymerase (NIb) is inactive. However, when between these elements the potyvirus NIa protease (NIaPro) recognition site is interposed, and this highly specific protease is coexpressed in the plant tissue, the proteolytic activity produces the release of the transcription factor, which triggers the anthocyanin accumulation.

In this work, using the YES anthocyanin accumulation synthetic circuit triggered by the expression of NIaPro, we have analyzed the efficiency of potyvirus proteases that belong to different clades of the potyviral phylogenetic tree. With this, we want to increase the number of specific proteases available for future developments in synthetic biology. To this end, we have cloned the NIaPro cDNAs of ten potyviruses and, by transient expression in *Nicotiana benthamiana* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, they faced their peptide targets included in different versions of the YES gate. The processing efficiency of each protease was determined by quantifying anthocyanin accumulation in the infiltrated tissue of *N. benthamiana*. The results showed that the NIaPro of tobacco etch virus, turnip mosaic virus, and plum pox virus are very efficient in the recognition of their specific target. On the other hand, the NIaPro of tobacco vein mottling virus (TVMV), soybean mosaic virus and onion yellow dwarf virus are not as efficient as the above mentioned and unable of activating a substantial accumulation of anthocyanins. However, as shown in the case of TVMV, this low efficiency can be counteracted by multiplying the number of recognition sites in the YES reporter construction. In the case of *Hordeum* mosaic virus (HoMV) recognition sites, pepper veinal mottle virus, lettuce mosaic virus and potato virus Y, it was observed that the NIb fragment was not able to inhibit the activity of Rosea1. However, this problem can also be addressed by increasing the size of the inhibitory fragment from 100 to 200 aminoacids, as shown in the case of HoMV. In conclusion, this research has allowed to increase the number of specific proteases available for synthetic biology developments in plants and has marked some lines of action to incorporate other less efficient ones.

KEY WORDS

Synthetic biology, genetic circuits, NIa protease, transcription factor, Rosea1, anthocyanin.

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que han estado de alguna forma detrás de este trabajo y durante esta etapa.

A José Antonio Daròs, por permitirme realizar este trabajo final de grado en su laboratorio, y a Teresa Cordero por su especial dedicación y consejos, que han sido fundamentales para la realización de este trabajo.

A mi familia, a Mario por su apoyo incondicional, a mis amigos y a todas aquellas personas que han confiado en mí durante esta etapa, gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La biología sintética	1
1.2 Virus de plantas	2
1.3 Potyvirus	5
1.4 Virus del grabado del tabaco y su NIaPro	9
1.5 Las antocianinas y el factor de transcripción Rosea1	11
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIALES	14
3.1 Material vegetal	14
3.1.1 <i>Material vegetal para agroinoculación</i>	14
3.1.2 <i>Extracción de virus de tejido infectado</i>	14
3.2 Material bacteriano	14
3.3 Plásmidos	14
4. MÉTODOS	14
4.1 Fosforilación de cebadores de ADN en 5'	14
4.2 Amplificación de ADN por PCR y PCR en gradiente	15
4.3 Amplificación de ARN por transcripción inversa (RT) con M-MuLV	15
4.4 Electroforesis en gel de agarosa	15
4.5 Elución de ácidos nucleicos a partir de un gel de agarosa	16
4.6 Ligación	16
4.7 Purificación de ácidos nucleicos de una solución	16
4.8 Digestión de ADN	16
4.9. Ensamblaje Gibson	17
4.10 Electroporación de <i>E. coli</i> con plásmidos	17
4.11 Electroporación de plásmidos en <i>A. tumefaciens</i>	17
4.12 Crecimiento de células en medio de cultivo sólido	17
4.13 Crecimiento de colonias aisladas en medio de cultivo líquido	18
4.14 Extracción de plásmidos (minipreps)	18
4.15. Miniprep de ARN total con columnas de gel de sílice	18
4.16 Secuenciación	19
4.17 Agroinoculación de plantas	19
4.18 Extracción, análisis espectrofotométrico de antocianinas y cuantificación	19
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
5.1. Eficiencia y especificidad de corte de las NIaPros virales	23
5.1.1 <i>Obtención de las construcciones con las NIaPros</i>	23

5.1.2 Obtención de las construcciones con los sitios de reconocimiento de las proteasas virales.....	24
5.1.3. Análisis del procesamiento.....	28
5.2. Optimización de las construcciones con los sitios de reconocimiento para las NIaPros que no muestran acumulación de antocianinas en ningún caso.	31
5.3. Optimización de las construcciones de los sitios de reconocimiento para las NIaPros que muestran expresión de antocianinas en ambos casos.	34
6. CONCLUSIONES	37
7. BIBLIOGRAFÍA.	38
8. ANEXO I	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes estrategias de los potyvirus para regular las funciones y la disponibilidad de las proteínas VPg y NIaPro. (a) Organización del genoma de los potyvirus. (b) Las estrategias para la regulación de VPg y NIaPro.....	6
Figura 2. Síntomas de TEV en una hoja de <i>N. tabacum</i>	9
Figura 3. Construcciones genéticas utilizadas. (A) Plásmido pG53CPMVZ a partir del cual se realizaron las dos series de construcciones genéticas. Plásmidos (B) pGNIaPro que expresarán las proteasas de los diferentes virus y (C) pGRos1-diana-NIb100 para expresar las construcciones reporteras.....	21
Figura 4. Filogenia de la familia Potyviridae.....	22
Figura 5. Geles de agarosa correspondientes a las diferentes PCR y a las extracciones de plásmidos relacionados con la obtención de las NIaPro. (A) Productos de la RT-PCR para la NIaPro del virus MDMV. (B) Productos de la PCR de la amplificación de las NIaPro y digestión de CPMVZ. (C) Plásmidos de las NIaPro ya ensambladas.....	24
Figura 6. Electroforesis agarosa de PCRs de (A) OYDV, (B) PRSV y HoMV.....	26
Figura 7. Electroforesis de agarosa de PCRs realizadas para obtener la banda correspondiente a los sitios de reconocimiento de MDMV y HoMV. (A) Electroforesis de agarosa con el producto de la PCR en gradiente. (B) Electroforesis de las PCRs posteriores con las temperaturas de extensión determinadas.....	26
Figura 8. Electroforesis de agarosa mostrando los resultados de las diferentes réplicas de la construcción del sitio de reconocimiento de (A) PRSV, (B) OYDV, (C) HoMV y (D) MDMV.....	27
Figura 9. Modo de agroinfiltración del experimento en la hoja de <i>N. Benthamiana</i>	28
Figura 10. Conjunto de hojas correspondientes a diferentes muestras de los virus de (A)TEV (B) PVY (C) PPV (D) OYDV (E) TuMV (F) SMV (G) LMV (H) PVMV e (I)HoMV.....	28
Figura 11. Acumulación de antocianinas tanto en los controles sin proteasa (barras azules) como en las muestras con proteasas (barras naranjas)	30
Figura 12. Resultados de minipreps de la NIaPro de (A) Proteasa de TVMV y construcción reportera con un sitio de reconocimiento. (B) Plásmido vacío (CPMVZ)	32
Figura 13. Resultados de PCR y extracción de plásmidos para dos y tres sitios de reconocimiento de TVMV. (A) Resultados de PCR con dos y tres sitios de reconocimiento en la construcción reportera para TVMV. (B) Resultados de las minipreps correspondientes a dos y tres sitios de reconocimiento en la construcción reportera para TVMV.....	32
Figura 14. Acumulación de antocianinas tanto en los controles (barras azules) como en las proteasas (barras naranjas), para construcciones reporteras con 1, 2 y 3 sitios de reconocimiento.....	33
Figura 15. Electroforesis de PCRs de las NIb. (A) Se escogieron las bandas de NIb300 y Toda la NIB. (B) Se escogió la banda de la NIb400 (C) Se escogió la banda de la NIb200.....	34

Figura 16. Electroforesis de extracción de plásmidos (A) Electroforesis de donde se obtienen todos los sitios de reconocimiento con diferentes Nlb excepto de la Nlb200. (B) Electroforesis de donde se obtiene la Nlb 200.....34

Figura 17. Acumulación de antocianinas en los controles sin proteasa (barras azules) y las muestras con proteasa (barras naranjas), para construcciones reporteras con longitud de Nlb de 100, 200, 300, 400 aminoácidos y Nlb entera.....35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Funciones de las diferentes proteínas de los potyvirus.....7

Tabla 2. Sitios de reconocimiento de los virus estudiados.....20

Tabla 3. Cebadores utilizados para la amplificación por PCR de los cDNAs de varias NlaPros.....23

Tabla 4. Cebadores utilizados para la amplificación de los sitios de reconocimiento de las proteasas de los virus HoMV, OYDV, PRSV, MDMV.....24

Tabla 5. Cebadores para la amplificación de la construcción reportera de TVMV con dos y tres sitios de reconocimiento.....31

ABREVIATURAS

HoMV: virus del mosaico del *Hordeum*.

TVMV: virus del moteado de las venas del tabaco.

OYDV: virus del enanismo amarillo de la cebolla.

TuMV: virus del mosaico del nabo.

PVY: virus Y de la patata.

PPV: virus de la viruela del ciruelo.

SMV: virus del mosaico de la soja.

LMV: virus del mosaico de la lechuga.

TEV: el virus del grabado del tabaco.

PVMV: Virus del moteado de las venas del pimiento.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La biología sintética

La biología sintética es un campo multidisciplinar emergente que aplica conceptos básicos de la ingeniería a la biología molecular y a la ingeniería genética. Así pues, se basa en el diseño y la construcción de nuevas piezas, dispositivos y sistemas biológicos. No obstante, también se basa en rediseñar sistemas biológicos existentes (Arkin, 2008). Para muchos biólogos, esto implica la reprogramación de los sistemas a nivel de ADN, mientras que, para otros grupos de investigación, además, debe resolver uno o varios problemas y tener un fin comercial (Cook *et al.*, 2014). La biología sintética adopta los principios ingenieriles en los que se basó la informática para desarrollarse en el siglo XX y evolucionar hasta lo que es hoy en día. Estos principios son la modularidad, la abstracción de una función y la estandarización, que, en el caso de la biología sintética, será la estandarización de los elementos genéticos (Gardner y Hawkins, 2013). La aplicación de estos principios a un sistema biológico, tiene como principal objetivo hacerlos más prácticos y predecibles, permitiendo un mayor acercamiento de éstos a la sociedad (Cook *et al.*, 2014).

Con el éxito que ha tenido a informática siguiendo estos preceptos, la biología sintética pretende basarse en ellos y utilizar la biología molecular como el software para escribir instrucciones en el ADN. Sin embargo, todo software necesita un hardware. En el caso de la biología sintética, el hardware podría asimilarse a lo que se llama 'chasis', esto es, las diversas posibilidades de organismos biológicos donde llevar a cabo las instrucciones dadas en el ADN. Dependiendo del objetivo del investigador, escogerá un sistema biológico o 'chasis' u otro (Leonard *et al.*, 2008).

Escherichia coli ha sido el 'chasis' mayormente utilizado por la comunidad científica por diferentes razones, relacionadas con la facilidad de cultivo y el coste (Wendisch, 2014), motivos por los cuales las plantas no han progresado tanto. Otro 'chasis' importante han sido las levaduras donde se han diseñado construcciones genéticas basándose en puertas lógicas YES, NOT y AND (funciones booleanas), vía integración de ADN en el genoma. La puerta YES produce un output en función de un único input. Esta puerta suele utilizarse para convertir sustancias químicas en factores de transcripción o pequeños ARN que llevan a cabo su acción en otras construcciones. Las puertas NOT, producen el output en ausencia del input mientras que las puertas AND necesitan dos inputs para producir un output (Marchisio, 2014).

Debido a que la biología sintética ha utilizado mayoritariamente 'chasis' microbiológicos, la biología sintética de plantas tiene un gran camino por recorrer. De hecho, la diversidad de herramientas para trabajar desde un punto de vista ingenieril con las plantas, es casi inexistente en relación con la cantidad de herramientas para trabajar con microorganismos.

Además, las plantas tienen otras características que dificultan que las herramientas que se utilicen para una especie se utilicen también para otras, como son las diferencias en fisiología, metabolismo, ciclos de vida y nichos medioambientales. Es por ello, que el principal objetivo de la comunidad científica que utiliza las plantas como 'chasis' es seguir construyendo herramientas robustas y útiles que permitan su uso en diferentes especies (Shih y Liang, 2016).

No hay duda de que la biología sintética es y será un recurso muy importante en la caja de herramientas del biólogo de plantas para afrontar los retos actuales y futuros, tales como la seguridad alimentaria, la energía, la obtención de sustancias de interés y el desarrollo de alternativas a la explotación de los recursos naturales limitados (Cook *et al.*, 2014). Además, cabe decir que las plantas pueden ser el paso intermedio entre los estudios a nivel microbiológico y los basados en animales, puesto que tienen un menor componente ético que estos últimos y sin embargo son sistemas eucarióticos pluricelulares complejos. Esto es muy útil desde el punto de vista de la producción de sustancias en plantas, ya no solo por el motivo mencionado sino por su facilidad de cultivo y bajo coste en relación con los cultivos de células de animales (Mett *et al.*, 2008).

El estudio de las estrategias y de las interacciones de las plantas con los posibles causantes de diversos estreses, ya sean de tipo biótico o abiótico, aumentará el conocimiento y los recursos del biólogo. Los resultados de estos estudios podrán ser aplicados a una gran cantidad de organismos, aumentando así la caja de herramientas de la comunidad científica (Liu y Stewart, 2015).

1.2 Virus de plantas

Los estreses bióticos en las plantas son causados por diferentes tipos de agentes. Uno de los más importantes en cuanto a diversidad y número, son los virus (García-Arenal y Fraile, 2005). Los inicios de la virología vegetal datan de finales del siglo XIX. En 1886, Adolph Mayer, un químico y agrónomo alemán, publicó el primer artículo relacionado con los virus de plantas. Este artículo llevaba como título 'Enfermedad del mosaico del tabaco' y fue el primer estudio donde se nombraban y explicaban todos los síntomas de la enfermedad con detalle. Mayer, postuló que el agente que causaba la enfermedad se podía transmitir mecánicamente a otras plantas a partir de extractos de plantas infectadas. En la misma época, un investigador ruso llamado Dmitrii Ivanovski, descubrió que el agente causante de la enfermedad era tan pequeño que era capaz de atravesar los filtros de porcelana, siendo las bacterias incapaces de atravesarlo. Así, en 1892 determinó que el agente causante de la enfermedad del mosaico del tabaco debía de ser causada por algún tipo de toxina bacteriana desconocida (Gergerich y Dolja, 2006). A pesar de estos importantes hallazgos, hasta 1898 no se considera la fecha

del descubrimiento del primer virus de plantas, el virus del mosaico del tabaco (TMV), por el microbiólogo holandés Martinus Willem Beijerinck. Éste, utilizando filtros mucho más finos que los utilizados por Ivanovski, propuso por primera vez que el causante de la enfermedad era un 'virus', un agente que era mucho más pequeño que cualquier bacteria. Además, son sus frases tan conocidas como '*contagium vivum fluidum*' en referencia al TMV, que significa que es un agente contagioso capaz de difundir a través del agar y que es filtrable, a diferencia de otros organismos como las bacterias que son '*contagium vivum fixum*', que no difunden a través del agar, permanecen fijas en él, y no son filtrables (Scholthof, 2004).

A partir de este hallazgo, se han encontrado un gran número de virus en plantas, animales, hongos y bacterias. Su importancia reside en su particularidad, debido a que son patógenos no celulares y capaces de autoensamblarse a partir de la fabricación de sus componentes estructurales. De modo genérico, se trata de parásitos obligatorios que no pueden ser cultivados en ningún medio de cultivo (Gergerich y Dolja, 2006). Poseen dos partes bien diferenciadas, el genoma y la cápside. Algunos virus tienen de manera adicional una membrana externa lipoproteica. Dependiendo del tipo de ácidos nucleicos que conformen el genoma, los virus de plantas pertenecerán a una categoría u otra (Gergerich y Dolja, 2006; Kareem, 2015):

- **Virus de cadena doble de ADN (ADNcd).** Estos virus necesitan un intermediario de ARN, ya que son virus de ADN retrotranscritos. Muy pocos virus tienen este tipo de genoma. Un ejemplo de este tipo de virus son los de la familia *Caulimoviridae*, normalmente transmitidos por áfidos.
- **Virus de cadena simple de ADN (ADNcs).** Son virus que necesitan convertirse primeramente en un ADNdc para que se inicie su replicación. Un ejemplo de estos virus son los de la familia *Geminiviridae*, responsables de una cantidad importante de daños en las cosechas de alrededor del mundo.
- **Virus de cadena doble de ARN (ARNcd).** Un ejemplo de estos virus son los de la familia *Reoviridae* que es la más numerosa y sus viriones no presentan envoltura, o la *Partitiviridae*.
- **Virus de cadena simple de ARN en sentido positivo (ARNcs +).** Son virus que tienen ARN con polaridad positiva, es decir, pueden ser traducidos inmediatamente en el huésped. En este grupo se encuentran la mayoría de virus de plantas. Un ejemplo de estos virus son los de la familia *Potyviridae*, o de la familia *Tobamoviridae*, familia a la que pertenece el TMV nombrado arriba.

- **Virus de cadena simple de ARN en sentido negativo (ARNcs -).** Son virus que tienen ARN con polaridad negativa. Es decir, deben de convertirse a ARN de polaridad positiva mediante una ARN polimerasa antes de ser traducido, ya que un ARN de polaridad negativa no es infeccioso por sí solo. Un ejemplo de estos son de la familia *Rhabdoviridae*, transmitido por áfidos y otros insectos, o *Bunyaviridae*, transmitido por trips.

La razón principal por la que se estudian los virus de plantas es debido al descenso en la producción que causan cuando un cultivo se ve afectado por ellos. Siempre se ha pensado que los cultivos que se ven más afectados son los más comunes, y aunque en términos absolutos es así, hay virus que afectan a plantas ornamentales, como el virus del mosaico del tulipán. En los cultivos de tulipanes de Holanda, la presencia de este virus hace que se pierdan 9 millones de euros anualmente (van der Vlugt *et al.*, 2006). Muchas veces, la transmisión no solo se da de manera mecánica, si no también puede darse mediante vectores. Estos vectores son generalmente insectos, así pues, el control de las infecciones masivas causadas por virus pasa por el control de la expansión de sus vectores. Hay veces que, por motivos de localización geográfica, en una zona determinada existe el virus, pero no su vector o viceversa; es por ello que son muy importantes el control y el tráfico de plantas y semillas de un lugar geográfico a otro, ya que las consecuencias de unas malas prácticas pueden suponer un descenso de la producción, con las consecuencias económicas y sociales que esto puede ocasionar (García-Arenal y Fraile, 2005).

Debido a que la dispersión y el descontrol de los virus puede suponer problemas muy importantes de diversa índole, se debe de trabajar en el desarrollo de nuevas e innovadoras medidas de control de estos agentes (Kang *et al.*, 2005). Tradicionalmente, como métodos de control se usaban métodos de mejora clásica, que requerían una gran cantidad de tiempo para no siempre encontrar la solución deseada. Además, se utilizaban otras técnicas más básicas cuyo objetivo era la disminución de fuentes del inóculo, basadas en la rotación de cultivo, la cuarentena y en el uso de materiales certificados sin virus. Hoy en día, una de las medidas de control más prometedoras es el uso de técnicas de ingeniería genética y biología molecular. Su objetivo es insertar secuencias que codifiquen proteínas que generen resistencia a dicho virus en la planta, o editar su genoma para hacerlas resistentes. Estas secuencias suelen provenir de proteínas de la cápside de los virus o ARNs de polaridad negativa o antisentido. Cabe destacar que los genes que codifican la resistencia de virus suelen ser monogénicos y dominantes en el 54% de los casos, cosa que facilita el trabajo del mejorador. Sin embargo, hay ocasiones que la resistencia es superable por diversas razas fisiológicas de los virus. Es por ello que un tema central de investigación es entender la durabilidad de la resistencia y su manejabilidad (García-Arenal y Fraile, 2005). Debido a la cantidad de controles, permisos y problemas éticos que suponen las plantas modificadas

genéticamente, hoy en día se utiliza una mezcla de técnicas clásicas con técnicas biotecnológicas, generalmente basadas en el uso de marcadores moleculares.

Hoy en día, no solo es importante conseguir plantas resistentes a enfermedades si no que del estudio de las interacciones entre los virus y las plantas han surgido nuevos objetivos, como encontrar nuevos recursos útiles para la biomedicina y la biotecnología. En este ámbito la biología sintética tiene aún mucho que aportar, y es que puede permitir al investigador aumentar su caja de herramientas moleculares, aplicables en diversos campos de estudio. Un ejemplo de esto es como las infecciones virales pueden aportar conocimiento sobre la nanotecnología. Como se ha explicado antes, los virus son capaces de autoreplicarse, acumulando altos niveles de sus componentes estructurales en la célula infectada. Esta capacidad ha sido aprovechada para permitir la generación intracelular de componentes estructurales de los virus, sin ácidos nucleicos, las llamadas partículas ‘virus-like’ (VLPs). Estas partículas se producen en grandes cantidades por la planta pudiendo ser utilizadas en muchas direcciones, como, por ejemplo, en la encapsulación de diferentes sustancias (Cuenca *et al.*, 2016). Otras vías nuevas de estudio son el uso de las plantas como biofactorías, pudiéndose utilizar para obtener vacunas para animales y humanos.

1.3 Potyvirus

Los potyvirus pertenecen a la familia *Potiviridae*, y comprenden un grupo muy importante de virus, desde un punto de vista biológico, económico y de agricultura. Fueron descubiertos a finales de la década de 1920, por Kenneth Smith, que estaba estudiando los virus de la patata en Reino Unido. Al primero que descubrió, lo nombró virus Y de la patata (PVY). Tras ver que muchos otros tenían propiedades similares al PVY, en 1971 les llamó Potyvirus, nombre fruto de un acrónimo con el nombre del virus PVY (Gibbs y Ohshima, 2010).

Se encuentran tanto en variedades cultivadas como en variedades silvestres. No obstante, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus ha reconocido a la familia *Potiviridae* como la segunda familia más numerosa de virus que afectan a plantas cultivadas después de la familia *Geminiviridae* (Ivanov *et al.*, 2014). Una característica compartida por todos los potyvirus es la inducción de cuerpos de inclusión en forma de espiral en el citoplasma de las células infectadas. Estos cuerpos de inclusión son formados por una proteína viral que es considerada como la causante del rasgo fenotípico diferencial más importante para asignar que un virus es del grupo de los potyvirus. Los viriones son de morfología flexuosa y con forma alargada, cuya longitud va desde los 680 a los 900 nm y de los 11 a los 15 nm de ancho, rodeados de una sola proteína estructural formada por 2000 unidades proteicas. Estos virus son mayoritariamente transmitidos por áfidos (Riechmann *et al.*, 1992).

Su genoma es de ARN de simple cadena de polaridad positiva, de unos 10 kb de largo, cuyo final 5' está unido covalentemente a una secuencia de una proteína viral (VPg, viral protein genome-linked) que tiene como función actuar como cebador durante la síntesis del ARN y permitir el inicio de la transcripción ya que actúa como caperuza del ARNm. El extremo 3' del genoma está poliadenilado. Una propiedad importante de los potyvirus es que 10 de las 11 proteínas virales derivan de un solo marco de lectura abierto formando una poliproteína. La que queda (P3N-PIPO) se sintetiza de manera separada, con un pequeño marco de lectura abierto (Rajamäki et al. 2009). La poliproteína será escindida posteriormente por tres proteasas, P1, HC-Pro y NIaPro, que dará lugar a los polipéptidos P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIaPro, NIb y la proteína de cubierta (CP), como puede verse en la Figura 1a. Las proteasas P1 y HC-Pro procesan en un solo sitio, mientras que la NIaPro escinde en varios lugares generando el resto de productos (Urcuqui-Inchima et al. 2001).

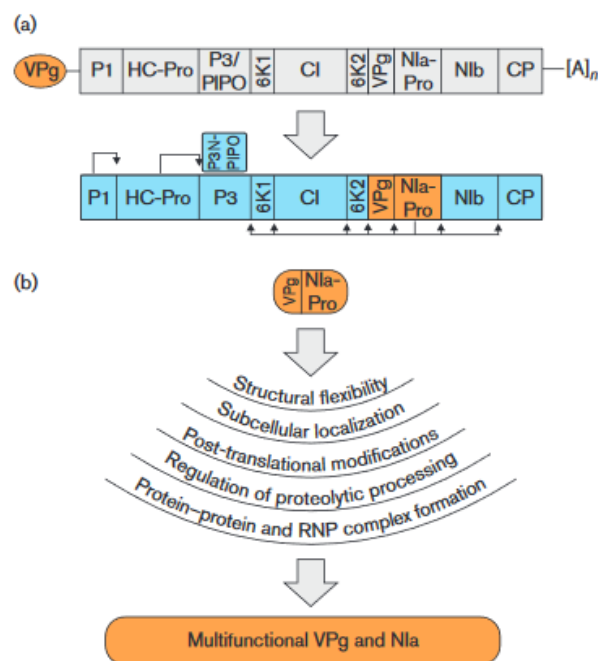


Figura 1. Diferentes estrategias de los potyvirus para regular las funciones y la disponibilidad de las proteínas VPg y NIaPro. (a) Organización del genoma de los potyvirus. El ARN viral se muestra en gris mientras que las proteínas traducidas se muestran en azul. (b) Las estrategias para la regulación de VPg y NIaPro (Ivanov et al, 2014).

Además de la NIaPro y de la VPg, las demás proteínas tienen funciones muy importantes, como se ve en la Tabla 1.

Tabla 1. Funciones de las diferentes proteínas de los potyvirus (Urcuqui-Inchima et al. 2001).

Proteins	Properties
P1 (32–64 K)	Trypsin-like serine proteinase, C-terminal autocleavage
HC-Pro (56–58 K)	Symptomatology Aphid transmission Self-interaction Systemic movement Suppression of gene silencing Synergism and symptom development Papain-like cysteine proteinase, C-terminal autocleavage
P3 (37 K)	Plant pathogenicity
6K1	?
CI (70 K)	ATPase/RNA helicase Cell-to-cell movement
6K2	Anchoring the viral replication complex to membranes
NIa (49 K)	Cellular localization VPg involved in genome replication Trypsin-like serine proteinase, acts in <i>cis</i> and in <i>trans</i>
NIb (58 K)	Protein-protein interaction RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) Involved in genome replication
CP (28–40 K)	Aphid transmission Cell-to-cell and systemic movement Virus assembly

La proteína P1 corresponde al gen N-terminal del genoma de los potyvirus que codifica una proteinasa que permite su propia escisión de la poliproteína (Ivanov et al, 2014). Análisis basados en mutagenesis, han mostrado que la proteína P1 no se requiere para la infectividad del virus pese a que sí que promueve la amplificación y el movimiento de éste (Urcuqui-Inchima et al. 2001, Revers y Garcia, 2015).

La proteína HC-Pro puede dividirse en tres regiones, la N-terminal, la central y la C-terminal. HC-Pro tiene diversas funciones. La primera de ella, mediar la interacción con áfidos y viriones. De hecho, actúa como regulador de la especificidad de la transmisión. Otra función importante es la autointeracción. Diferentes experimentos han demostrado que la HC-Pro está en forma de dímero en las plantas infectadas, si no se encuentra de esta manera, no puede realizar las demás funciones. Además, tiene como función la amplificación del movimiento sistémico, de manera modificaciones en la región central de la HC-Pro afectan a la replicación eficiente. Otra de sus funciones es la interacción con ácidos nucleicos, de hecho, tiene una alta afinidad por el ARN, que se demostró debido a diferentes experimentos basados mutagénesis en la HC-Pro. Además, la HC-Pro se encarga también de la supresión del silenciamiento genético, concretamente del silenciamiento post- traduccional, considerado una manifestación de un mecanismo de resistencia a virus natural. También se encarga del

sinergismo y del desarrollo de síntomas de la infección. Para finalizar, también posee actividad proteínasa, que es requerida para su propia escisión en la región C-terminal (Revers y Garcia, 2015).

La proteína 6K1 no se sabe que función tiene por sí sola. Si permanece unida a P3 puede estar relacionada con la presencia/ausencia de síntomas.

La proteína P3 participa en la patogenicidad, junto con otras proteínas está involucrada en la marchitez, que es síntoma de la infección viral. Además, diversos estudios basados en mutagénesis han demostrado que cuando P3 y 6K1 no son escindidos, la planta infectada presenta menos síntomas (Revers y Garcia, 2015). Como se ha mencionado antes, hay una proteína que procede de un marco de lectura abierto pequeño, esta es la P3N-PIPO. PIPO significa 'pretty interesting *Potyvirdae* ORF'. Esta ORF solo se traduce cuando el marco de lectura abierto se desplaza una unidad (+1), generando una proteína de fusión con la región N-terminal de la proteína P3, que se ha denominado P3N-PIPO. El descubrimiento hizo que se obtuviera más conocimiento del movimiento de los potyvirus de una célula a otra. (Rajamäki et al. 2009).

La proteína CI, que posee actividad ATPasa y tiene como principal función separar los dúplex de ARN. Además, posee un rol en la unión del ARN, en la amplificación y en el movimiento de célula a célula del complejo viral (Revers y Garcia, 2015).

El péptido 6K2 no tiene función enzimática, pero juega un papel importante en la unión a membranas, producido vía el dominio central hidrofóbico de este péptido. La proteína se asocia a compartimientos vesiculares derivados del retículo endoplasmático (Urcuqui-Inchima et al. 2001).

La NIa está compuesta de dos dominios, el N-terminal, que se trata del dominio VPg y el C-terminal, que se trata del dominio proteínasa (NIa-Pro). Estos dos dominios tienen diversas funciones como se observa en la Figura 1b. Es la proteínasa más importante de los potyvirus, procesa la poliproteína en *cis* y en *trans* para producir productos funcionales. Este procesamiento es eficiente y está muy regulado. La NIa-Pro tiene varias funciones. En primer lugar, la localización celular. La NIa-Pro está localizada junto con la NIb en los cuerpos de inclusión de las células infectadas. Como se ha mencionado, uno de los dominios de los que está compuesto la NIa-Pro es el VPg, que tiene funciones esenciales en la replicación viral y en la especificidad del genotipo del huésped. Además, la actividad proteolítica ha sido caracterizada con respecto a una posible escisión interna de la propia NIa. Por otra parte, las interacciones proteína-proteína también son muy importantes, y es que la NIa interacciona consigo misma y con la NIb. En relación con esto, se hicieron diversos experimentos y se propuso un modelo en el cual la NIb interaccionaría con el dominio proteínasa de la NIa, que

estaría unido a las membranas celulares gracias a la asociación con el péptido 6K2. La iniciación de la síntesis de ARN se verá favorecida por el dominio VPg de la NIa, cuya función es hacer de cebador (Urququi-Inchima et al. 2001).

La proteína NIb forma los cuerpos de inclusión en el núcleo de las plantas infectadas, a pesar de que también es necesaria en el citoplasma o en membranas asociadas con complejos de replicación durante la síntesis del ARN viral; de hecho, la NIb es ARN dependiente de la ARN polimerasa de los potyvirus (Revers y García, 2015).

Por último, la proteína de cubierta puede ser dividida en tres dominios. Los dominios variables N- y C-terminal son expuestos en la superficie de la partícula y son sensibles a tratamientos con tripsina. Concretamente, la región N-terminal contiene la mayor parte de los epítomos específicos del virus. Además, están más conservados que el dominio central. Las funciones de la proteína de cubierta son diversas, entre ellas se encuentran la transmisión por áfidos, el movimiento célula a célula y el sistémico, la encapsidación del ARN viral y la regulación de la amplificación del ARN viral (Riechmann et. al, 1992, Urququi-Inchima et al. 2001).

1.4 Virus del grabado del tabaco y su NIaPro

El virus del grabado del tabaco (TEV) es un virus miembro de la familia *Potyviridae*, responsable de infecciones en diferentes especies de la familia *Solanaceae*, incluyendo *Nicotiana tabacum*. De hecho, el TEV está ampliamente distribuido en América del Norte, América Central, Sudamérica y más recientemente en Europa y Asia. El rango de huéspedes que pueden verse afectados por TEV, es de 149 especies vegetales localizadas en 19 familias (Velásquez et al., 2015).

Los síntomas que se observan en las plantas, varían mucho dependiendo de la propia planta. No obstante, los síntomas más frecuentes son el moteado, las líneas necróticas, el grabado de las hojas o el clareado de las venas (Figura 2). Estos síntomas pueden ocurrir en hojas y en frutos.



Figura 2. Síntomas de TEV en una hoja de *N. tabacum*. (Velásquez et al., 2015).

El genoma de TEV es ARNcs (+) y está compuesto de 9500 nucleótidos, que codifican una poliproteína larga formada por 3054 aminoácidos. Dicha poliproteína será procesada por tres proteasas virales obteniendo 11 productos maduros (incluyendo P3N-PIPO), como se ha explicado en el punto anterior (Velásquez *et al.*, 2015).

La NlaPro de TEV pertenece a la familia de las C4 endopeptidasas, y su estructura se compone de dos dominios plegados de barriles beta antiparalelos. Es homóloga a las serín proteasas (Nunn *et al.*, 2005). Las características que hacen de la NlaPro de TEV una proteasa tan importante y valorada, son diversas. Primeramente, su alta especificidad. El motivo específico de reconocimiento tiene una longitud de 7 aminoácidos, que son EXXYXQ-S/G (donde X puede ser cualquier aminoácido, y la proteólisis puede darse entre los residuos de Gln y Ser/Gly. Pese a la poca especificidad que puede dar a pensar una secuencia donde tantos aminoácidos pueden ser variables, se sabe que la secuencia óptima de reconocimiento es ENLYFQ-S/G, que corresponde al sitio de corte entre los fragmentos proteicos Nlb y CP en la poliproteína natural de TEV. Varias proteasas son sensibles a modificaciones postraduccionales de los substratos proteicos. De hecho, si el sitio de reconocimiento de la NlaPro sufre modificaciones postraduccionales puede que no sea procesado, como se mostró si se fosforila la tirosina en posición P3, lo cual reduce su poder catalítico. La siguiente característica importante es el autoprocésamiento. La NlaPro de TEV contiene un sitio de autoescisión, el GHKVM-S en su porción C-terminal entre los residuos 213-219. Estudios de mutagenesis muestran una pérdida de actividad seguidamente a su escisión, debido a la inhibición de la actividad catalítica. La explotación industrial de la NlaPro del TEV se vio limitada por su baja solubilidad, mediante la expresión en *E. coli* se formaban agregados. Diferentes aproximaciones se implementaron en las cepas de *E. coli* con las que se trabajaba para controlar la temperatura de crecimiento, ya que la NlaPro muestra agregados a altas temperaturas (Cesaratto *et al.*, 2016).

Se han desarrollado aplicaciones biotecnológicas de la NlaPro del TEV que han sido implementadas en bacterias (Eisenmesser *et al.*, 2000), levaduras, plantas y células animales. Una regulación de la expresión de la NlaPro puede darse utilizando promotores regulables (choque de calor, temperatura, galactosa, inducibles por luz...) o bien, controlando de manera precisa la activación de NlaPro a nivel postraducciona. No obstante, un control de la expresión de la NlaPro solo se requiere para aplicaciones particulares más que para evitar una expresión basal ('leaky') de la NlaPro *in vivo* (Cesaratto *et al.*, 2016). Una de las aplicaciones biotecnológicas con más interés es su uso para la eliminación de las etiquetas de fusión de proteínas recombinantes (Miladi *et al.*, 2012).

1.5 Las antocianinas y el factor de transcripción Rosea1

Las antocianinas son pigmentos endógenos de las plantas. Están clasificados como fenólicos. Más concretamente pertenecen al grupo de los flavonoides, que son los responsables de las tonalidades roja-anaranjada y azul-violeta presentes en órganos de las plantas como frutos, flores y hojas. Se han identificado en la naturaleza más de 700 derivados diferentes de las antocianinas. Las antocianinas en forma de aglicanos se encuentran de manera muy poco habitual en la naturaleza (Wallace y Giusti, 2015).

Estos pigmentos tienen múltiples roles, desde la adaptación a estreses bióticos y abióticos hasta el reciclado celular o a la atracción de agentes dispersantes de semillas. Las antocianinas, y en general los flavonoides, son sintetizados en el citosol y transportados a la vacuola para ser almacenados. Sin embargo, pueden encontrarse en las paredes celulares, en los núcleos, en los cloroplastos e incluso en el espacio extracelular dependiendo de la especie a la que pertenezca la planta, el tejido o el estado de desarrollo (Hichri *et al.*, 2011). La biosíntesis de antocianinas se activa a nivel transcripcional por tres factores de transcripción, llamados R2R3 MYB, un 'hélice-bucle-hélice' básico (bHLH) y una proteína llamada WD40. Estos factores se unen cooperativamente a los promotores de los genes que codifican enzimas de la ruta. No obstante, la acumulación de antocianinas se ha inducido en unos niveles impresionantes mediante la sobreexpresión de los factores de transcripción Rosea1 y Delia (Bedoya *et al.* 2012). Rosea1 pertenece al grupo de factores de transcripción denominados MYB y codifica 220 aminoácidos, 25.7 kDa de masa molecular (Bedoya *et al.* 2012).

Los factores de transcripción de tipo MYB son los más estudiados en plantas. Regulan ciertos aspectos del metabolismo secundario, tales como el desarrollo, la resistencia a enfermedades o como ya se ha mencionado antes, la ruta de biosíntesis de antocianinas. Presentan un dominio de unión específico y muy conservado al ADN, compuesto por 52 aminoácidos, denominado MYB también. Este dominio se ha visto que puede tener tres tipos de repeticiones imperfectas, R1, R2 y R3. Estas adoptan la conformación de 'hélice-hélice-giro-hélice' para intercalarse en el surco mayor del ADN diana. Existen tres grupos de factores MYB dependiendo del tipo de repeticiones que presenten. El primer grupo, es el que solo presenta la repetición R3, R3-MYB. El segundo grupo es el de los factores de transcripción que presentan las repeticiones imperfectas R2 y R3, siendo así pues R2R3-MYB. Este grupo es el predominante en plantas, ya que es el que está asociado con la biosíntesis de antocianinas. Además, Rosea1 se encuentra en él. El tercer grupo es el que tiene todas las repeticiones imperfectas, por eso se denominan R1R2R3-MYB (Jin y Martin, 1999; Allan *et al.*, 2008).

Rosea1 junto con otros factores de transcripción presentes en *Antirrhinum majus*, como Venosa y Rosea 2, son los responsables de la pigmentación de las flores de dicha planta. No obstante, pese a la similitud estructural de estas tres proteínas reguladoras, todas presentan el dominio R3, que es la responsable de la unión al ADN, la especificidad de dicha unión al ADN es ligeramente diferente en Rosea1, Rosea2 y Venosa. Para estudiar correctamente estos factores de transcripción y sus diferencias, se analizó el nivel de transcrito de los genes diana de cada factor de transcripción. Para Rosea1, se vieron altos niveles de transcrito para los genes flavonona 3-hidroxilasa (FH3), dihydroflavonol 4-reductasa (DFR), antocianin sintasa (ANS), UDP-glucosa 3-O-flavonoide transferasa (UFGT), flavanona 3'-hidroxilasa (F3'H), flavonol sintasa (FSL) y antocianin permeasa (AT) siendo especialmente dependientes de la presencia de Rosea1 los genes F3'H, F3H, DFR y UFGT que son los más relacionados con la ruta de biosíntesis de antocianinas y menos dependientes ANS y AT. Para Rosea2, se demostró que regula la expresión del gen F3'H y contribuye a la activación del gen chalcona isomerasa (CHI). Para Venosa, se observó que aumentaban los niveles de transcritos de los genes CHI, F3H, F3'H, FSL, ANS, UFGT y AT, pero no del gen DFR (Schwinn *et al.*, 2006).

Rosea1 tiene diversas aplicaciones como marcador de diversos procesos biológicos. Por ejemplo, en cuanto al silenciamiento génico. Si había silenciamiento, el factor de transcripción Rosea1 no se expresaba y por lo tanto no había color en los pétalos de las flores (Shang *et al.*, 2007). Con el mismo objetivo se han hecho estudios en frutos como el tomate. Por último, el uso de factores de transcripción como Rosea1 que funcionen como reporteros y que producen acumulación de antocianinas hace que se pueda observar si ha ocurrido el proceso de infección viral sin necesidad de instrumentación compleja (Bedoya *et al.*, 2012). Otra reciente aplicación del factor de transcripción Rosea1 como reportero es conocer la eficiencia y especificidad de proteasas virales. En función de la cantidad de antocianinas obtenida en plantas agroinoculadas con la construcción de la proteasa conjuntamente con su sitio de reconocimiento, se podrá estimar la especificidad y eficiencia de la NIaPro correspondiente. Dicho sitio de reconocimiento formará parte de una construcción reportera que sigue la expresión de una puerta lógica YES y que posee el factor de transcripción Rosea1, responsable de la biosíntesis de antocianinas (Cordero *et al.*, 2018).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Las proteasas virales son un recurso importante en la caja de herramientas de cualquier investigador en biotecnología. Se conoce la alta eficiencia de la NIaPro del TEV y sus aplicaciones en diversos campos. Sin embargo, no se han estudiado otras proteasas de esta misma familia de virus de plantas (*Potyviridae*).

El objetivo de este trabajo fue el estudio de la especificidad y eficiencia de proteasas de diversos virus de la familia *Potyviridae* mediante una construcción reportera que contenía el factor de transcripción Rosea1, que induce la biosíntesis de antocianinas, unido a un fragmento proteico inhibitorio. Entre estos dos elementos se intercalaron las diferentes dianas de corte de las NIaPros analizadas. Así pues, si la proteasa reconoce el sitio de procesamiento, se libera el factor de transcripción y se acumulan antocianinas. Se analizaron las proteasas del virus del mosaico del *Hordeum* (HoMV), virus del moteado de las venas del tabaco (TVMV), virus del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV), virus del mosaico del nabo (TuMV), virus Y de la patata (PVY), virus de la viruela del ciruelo (PPV), virus del mosaico de la soja (SMV), virus del mosaico de la lechuga (LMV), virus del moteado de las venas del pimiento (PVMV) y, como control, el virus del grabado del tabaco (TEV). Con estos análisis se pretende aumentar las herramientas y recursos para el diseño de circuitos genéticos en biotecnología y biología sintética.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES

3.1 Material vegetal

3.1.1 Material vegetal para agroinoculación

Para el proceso de agroinoculación se utilizaron 3 plantas de *Nicotiana benthamiana* por cada virus. Estas plantas se agroinocularon cuando tenían alrededor de cuatro o cinco semanas. Una vez agroinoculadas, las plantas se mantuvieron los siguientes 6 días hasta la recogida de muestra en una cámara a 25°C con fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

3.1.2 Extracción de virus de tejido infectado

Para el virus del mosaico enanizante del maíz (MDMV), el cDNA de la NIaPro se amplificó a partir de tejido de maíz infectado y liofilizado, suministrado por la Dra. Angels Achon de la Universitat de Lleida.

3.2 Material bacteriano

Para desarrollar este trabajo se utilizaron cepas de *Escherichia coli* y de *Agrobacterium tumefaciens*. La cepa de *E. coli*, concretamente DH5 α , sirvió para la amplificación de los plásmidos. Para la agroinoculación de las plantas se utilizaron dos cepas de *A. tumefaciens*: GV3501:Pmp90 con el plásmido auxiliar pS48 (Thole *et al.*, 2007) y C58C1 con el mismo plásmido auxiliar.

3.3 Plásmidos

Se realizaron una serie de construcciones genéticas tomando como base el plásmido pG53CPMVZ (Anexo I), un derivado de pCLEAN-G181 (número de accesión en GeneBank EU186083), que es un plásmido binario de la serie G (Thole *et al.*, 2007). pG53CPMVZ tiene un promotor y terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y las regiones 5' y 3' no traducidas del RNA-2 del virus del mosaico del chícharo (CPMV) (Martínez y Daròs, 2014). Este plásmido será utilizado tanto para las construcciones reporteras como para las construcciones de las NIaPro.

4. MÉTODOS.

4.1 Fosforilación de cebadores de ADN en 5'

En 20 μ l de 50 mM Tris-HCl pH de 7.6, 10 mM de MgCl₂, 5 mM DTT, 0.1 mM espermidina y 0.1 mM EDTA, se mezclaron 1 μ l del cebador (500 μ M), 0,8 μ l de ATP a 10 mM y 0,4 μ l (4 U) de la enzima T4 polinucleótido quinasa (PNK; Thermo Scientific). Se incubó 30 min a 37°C.

4.2 Amplificación de ADN por PCR y PCR en gradiente

Para la PCR se mezcló con puntas de filtro y sobre hielo 13,8 µl de H₂O, 4 µl de tampón HF (x5), 0,6 µl de DMSO, 0,4 µl de dNTPs a 10 mM, 0,4 µl de cada cebador (el directo y el reverso), 0,2 µl de DNA molde y 0,2 µl de DNA polimerasa Phusion (2 U/µl). Una vez hecha esta mezcla, se incubó en un termociclador con un programa de 30 s a 98°C para la desnaturalización inicial, seguida de 30 ciclos de 10 s a 98°C, de 30 s a 55°C, y de 1 min y 32 s a 72°C. En este último paso de extensión, el tiempo se varió en función de las pares de bases (pb) del producto esperado a razón de 15 s por kpb. Finalmente, se realizó una incubación de 10 s a 72°C.

Para la PCR en gradiente cada tubo estuvo sometido a una temperatura de extensión diferente, el resto de pasos fue idéntico.

4.3 Amplificación de ARN por transcripción inversa (RT) con M-MuLV

Primeramente, se mezcló el ARN junto con 5 pmol del cebador y H₂O hasta 6,5 µl. Seguidamente, se incubó 1,5 min a 98°C y se dejó bajar la temperatura a 42°C. A continuación, se añadió el resto de componentes: 2 µl de tampón RT (x5) (250 mM Tris-HCl pH de 8.3, 250 mM de KCl, 20 mM MgCl, y 50 mM DTT), 1 µl de dNTPs a 10 mM, 0,25 µl de inhibidor de RNAsas (40 U/µl) y 0,25 µl de M-MuLV RT (200 U/µl). Se incubó 45 min a 42°C, 10 min a 50°C y 5 min a 60°C.

4.4 Electroforesis en gel de agarosa

Para analizar los fragmentos de ADN, ya sean provenientes de una PCR o de una purificación de plásmidos de bacterias, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1%. Para conseguir esta concentración, se disolvieron 4 g de agarosa en 40 ml de TAE 10X (TAE x1 es 40 mM de Tris, 20 mM de acetato de sodio, 1 mM de EDTA) en 360 ml de agua. Esta mezcla se calentó para su disolución. Una vez teníamos la solución de agarosa fundida, se preparó el soporte y el peine del gel. Dependiendo del número de muestras, se escogió un soporte más o menos grande y un peine con más o menos pocillos. Los geles pequeños tenían unas dimensiones de 8 x 6,5 x 0,5 cm, mientras que los más grandes tenían unas dimensiones de 15 x 11 x 0,5 cm. Para conseguirlo, se vertió sobre el soporte adecuado 25 o 75 ml de agarosa fundida dependiendo de si es un gel pequeño o grande, respectivamente. Tras verter la agarosa sobre el conjunto del soporte más el pocillo, se dejó enfriar durante 15 min. Tras esto, se retiró el peine y se colocó el gel junto con el soporte en la cubeta de electroforesis. Finalmente, se cargaron las muestras en los pocillos del gel después de haberles añadido la cantidad adecuada de tampón de carga x10 (50% de glicerol, 10 mM de EDTA pH 8.0, 0.0025% azul de bromofenol y 0.0025% xilencianol). En el caso de los geles pequeños, las

electroforesis se corrieron a 60 V durante 75 min y en el caso de los geles más grandes a 75 V durante 90 min.

4.5 Elución de ácidos nucleicos a partir de un gel de agarosa

Para este proceso se utilizó el kit DNA Clean & Concentrator™ (Zymo Research). Primeramente, se pesó el fragmento de agarosa y se añadieron tres volúmenes de tampón de disolución de agarosa (ADB). Posteriormente se incubó 5-10 min a 55°C. Tras esta incubación se pasó todo el volumen a una columna de gel de sílice dispuesta sobre un tubo Eppendorf de 2 ml con la tapa cortada. Se centrifuga 10 s a 13000 x g, se descartó el filtrado y se procedió a hacer dos lavados seguidos con 200 µl de tampón de lavado (WB), mediante dos centrifugaciones sucesivas a 13000 x g, la primera de 10 s y la segunda de 30 s. Tras cada lavado se retiró el filtrado. Seguidamente, se traspasaron las columnas a un tubo Eppendorf nuevo de 1,5 ml y se añadieron 8 µl de tampón de elución (EB). El volumen de EB puede variar dependiendo de los pasos sucesivos. Se incubó 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó 1 min a 13000 x g.

4.6 Ligación

Para un volumen final de 10 µl, se añadieron 7 µl de solución de ADN purificado, 1 µl de enzima ADN ligasa T4, 1 µl de tampón del ADN ligasa T4 (x10) y 1 µl de agua. Tras realizar la mezcla, se incubó 1 h en el termociclador a 22°C.

4.7 Purificación de ácidos nucleicos de una solución

Se añadieron 100 µl de DBB (DNA Binding Buffer) a la reacción. Seguidamente, se traspasó todo el volumen a una columna de gel de sílice dispuesta sobre un tubo Eppendorf de 2 ml con la tapa cortada. Se centrifugó 10 s a máxima velocidad (13000 x g) y se retiró el filtrado. Una vez hecho esto, se lavó dos veces seguidas con 200 µl de WB. Para el primer lavado se centrifugó durante 10 s y para el segundo, durante 30 s, ambos a 13000 x g. Después de cada lavado, se retiró el filtrado. A continuación, se procedió a hacer un tercer lavado con 200 µl de etanol al 80%, durante 30 s a máxima velocidad, 13000 x g. Una vez acabada la ronda de lavados, se traspasó la columna a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml y se añadieron 8 µl de EB (x0.1). Se incubó 1 min y posteriormente se centrifugó a máxima velocidad. Tras esto se recogió el eluido.

4.8 Digestión de ADN

Al ADN que se quería digerir, se añadió 1 µl de la enzima de restricción, el volumen adecuado de tampón correspondiente a la enzima de restricción utilizada, y agua hasta conseguir un volumen final de 20 µl. Una vez hechas las correspondientes mezclas, todas las digestiones se incubaron durante 1 h a 37°C.

4.9. Ensamblaje Gibson

Se siguió el protocolo de ensamblaje para el kit NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix. Se mezcló los fragmentos de manera que la cantidad de ADN total estuvo entre 0,02-0,5 pmol (ensamblaje de 2-3 fragmentos). Se añadió un volumen de Gibson Assembly Master Mix (2X). Se incubó a 50°C durante 1 h. Se purificó el producto de la reacción mediante columnas de gel de sílice y con el se transformó *E. coli*.

4.10 Electroporación de *E. coli* con plásmidos

Después de haber purificado las ligaciones de los plásmidos correspondientes, se procedió a transformar *E. coli* (cepa DH5 α). Para ello, antes de empezar se enfriaron en hielo las cubetas de electroporación y se prepararon tubos Eppendorf de 1,5 ml con 8 μ l del producto de las ligaciones purificadas. Se añadieron 40 μ l de *E. coli* competentes sobre el tubo Eppendorf de 1,5 ml, se mezcló bien con la pipeta y se pasó a la cubeta de electroporación. Esta se secó y se dispuso dentro del electroporador (Eporator, Eppendorf), donde se electroporó a 1500 V durante 5 ms. Una vez hecho esto, rápidamente se sacó la cubeta y se le añadió 1 ml de medio SOC (20 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 0.5 g/l NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, glucosa 20 mM, pH 7.0). Se procedió a mezclar bien y se recogieron las células que se incubaron a 37°C en agitación durante 1 h. Finalmente se plaqueó.

4.11 Electroporación de plásmidos en *A. tumefaciens*

A grandes rasgos, este protocolo es igual que el de *E. coli* explicado anteriormente. Las células electroporadas se incubaron 2h a 28°C tras la electroporación. Pasado este tiempo, se plaquearon como ya se ha explicado anteriormente, con la diferencia que dichas placas tendrán que estar compuestas por medio LB suplementado con rifampicina y kanamicina a una concentración de 50 μ g/ml y con tetraciclina a una concentración de 7,5 μ g/ml.

4.12 Crecimiento de células en medio de cultivo sólido

Por cada tubo Eppendorf de 1,5ml se plaquearon dos placas, la primera de ellas con 10 μ l, y la segunda con el resto de cultivo. Para esta segunda placa, después de haber añadido los 10 μ l a la primera placa, se centrifugó el Eppendorf de 1,5 ml con el cultivo restante durante 1 min a 13000 x g y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet, de tal manera que quedó un menor volumen a plaquear. El medio sólido presente en las placas, contenía LB (10 g NaCl, 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 15 g de agar por cada litro) más los antibióticos correspondientes en una concentración de 50 μ g/ml. Si el plásmido introducido contiene el marcador LacZ, se le añadió a la placa 30 μ l de X-gal (50 mg/ml) sobre la superficie de la placa 15 min antes de que se plaquearan las células. Todo este proceso se llevó a cabo siempre bajo llamas de mechero para evitar cualquier tipo de contaminación. Una vez se

plaqueó, se dejaron crecer a 37° C durante toda la noche (si se trata de *E. coli*) o a 28° C durante tres noches (Si se trata de *A. tumefaciens*).

4.13 Crecimiento de colonias aisladas en medio de cultivo líquido

Tras las noches de crecimiento necesarias, se seleccionaron las colonias adecuadas y se dejaron crecer en tubos con 2,5 ml medio líquido LB con kanamicina (50 µg/ml). Las células se incubaron en agitación a 37°C (si se trata de *E. coli*) o a 28°C (si se trata de *A. tumefaciens*) durante toda la noche. El caso particular de *A. tumefaciens*, los tubos con las colonias recién picadas se metieron progresivamente a lo largo del día en la cámara a 28°C, para evitar que al día siguiente el cultivo estuviera sobresaturado.

4.14 Extracción de plásmidos (minipreps)

Se transfirió el cultivo de *E. coli* a un tubo Eppendorf de 2 ml, se centrifugó a 13000 x g durante 2 min. Se descartó el sobrenadante y se le añadieron 250 µl de solución de resuspensión, se hizo vortex. Se añadieron 250 µl de solución de lisis y se invirtió más de cuatro veces cada tubo Eppendorf de 2 ml, tras esto, se incubaron los tubos durante 5 min. Se añadieron 350 µl de solución de invirtió cada tubo Eppendorf más de cuatro veces. Se centrifugaron los tubos durante 5 min a máxima velocidad (13000 x g). Se transfirió el sobrenadante a una columna de gel de sílice dispuesto sobre un tubo Eppendorf de 2 µl, centrifugó a máxima velocidad durante 1 min y se descartó el filtrado. Seguidamente se realizaron dos lavados sucesivos con 500 µl de solución de lavado durante 30 s a máxima velocidad de centrifugación. Tras cada lavado se descartó el filtrado. Se traspasó la columna de gel de sílice a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se añadieron 100 µl de tampón de elución. Se incubaron durante 2 min y se centrifugó a máxima velocidad durante 2 min, recogándose el filtrado.

4.15. Miniprep de ARN total con columnas de gel de sílice

Se trituró 0,1g en un tubo Eppendorf de 2 ml con 1 bolita de acero: Se congeló para ello con nitrógeno líquido y se molió durante 1 min 30s. Se añadió 1 ml de TEX (4 M tiocianato de guanidino, 0,1 M acetato sódico pH 5,5, 10 mM EDTA, 0,1 M 2-mercaptoetanol [47,3g de tiocianato de guanidino + 3,33 ml de 3 M NaAc pH 5,5 + 2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 + 0,7 ml 2 mercaptoetanol + H₂O hasta 100 ml]) y se mezcló con el vórtex. Se centrifugó 5 min a máxima velocidad (13000 x g). Se recogió 0,6 ml de sobrenadante, se le añadió 0,39 ml de etanol al 96%, se hizo un vórtex y se centrifugó 1 min a máxima velocidad. Seguidamente se transfirió 0,7 ml de sobrenadante a la columna Zymo posicionada sobre un tubo Eppendorf de 2ml. Se centrifugó dicho tubo 1 min a máxima velocidad y se descartó el filtrado. Se lavó con 0,5ml de TLA (70% etanol, 10 mM acetato sódico pH 5,5 [0,33 ml 3M NaAc pH 5,5 + 73 ml 96% etanol + H₂O hasta 100ml]) dos veces seguidas, centrifugando durante 30 s y luego durante 1 min, ambas veces a máxima velocidad y descartandose el filtrado. Se transfirió la columna a un

tubo Eppendorf nuevo de 1,5 ml. Se eluyó con 10 µl de TEL (20 mM Tris-HCL, pH 8,5 [200 µl 0,1M Tris-HCl pH 8,5 + H₂O hasta 1ml]), se incubó durante 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó a máxima velocidad durante 2 min.

4.16 Secuenciación

Se ha utilizado el servicio de secuenciación del IBMCP, cuyo secuenciador automático es el modelo de Applied Biosystems ABI 3100. Dependiendo de la muestra a secuenciar, se utilizaron diferentes cebadores. Las muestras se proporcionaron en alícuotas de 6 µl. Una vez secuenciadas, se compararon las muestras experimentales con las teóricas mediante el algoritmo de ClustalW del portal de recursos bioinformáticos ExpASy.

4.17 Agroinoculación de plantas

Se partió de los tubos en los que picamos las colonias de *A. tumefaciens*. Se escogieron aquellos con una densidad óptica (DO) entre 0,5 y 1 a 600 nm. Se prepararon 4 ml de la solución de agroinoculación. Se tomó la cantidad adecuada del cultivo líquido para conseguir una densidad óptica final de 1 y se centrifugó durante 5 min a 13000 x g. Se retiró el sobrenadante y se resuspieron las células con 4 ml tampón de agroinoculación (10 mM de MES-NaOH pH 5.6, 10 mM de MgCl₂, 150 µM de acetosiringona). Se incubó esta mezcla 2 h a 28 °C y se procedió a agroinfiltrar las plantas. El proceso de agroinfiltración se realizó con una jeringa e 1 ml sin aguja cargada con la solución de agroinoculación. Por cada planta, se inocularon tres hojas verdaderas (por el envés). Posteriormente se recogieron las muestras de las hojas 6 días después de la agroinoculación.

4.18 Extracción, análisis espectrofotométrico de antocianinas y cuantificación

Tras haber recogido las hojas, se recortó los halos de las hojas agroinoculadas y se pesaron. Se añadieron 10 volúmenes de la solución de extracción (0.037% HCl en metanol) y se homogenizaron las muestras con un triturador mecánico. Seguidamente el extracto se mantuvo en hielo, y se agitó de manera ocasional. Tras 1 h de espera, se tomaron 2 ml de la mezcla y se centrifugó durante 5 min a 13000 x g. Se recogió 1 ml de sobrenadante y se dispuso en una cubeta adecuada. Se midió la presencia de antocianinas mediante espectrofotometría a 595 nm (espectrofotómetro Biochrom WPA Biowave II). Los resultados se analizaron estadísticamente con el programa Statgraphics Centurion® vs XVII.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para estudiar la eficiencia y especificidad de las NIaPro de diversos virus de la familia *Potyviridae*, se realizaron una serie de construcciones genéticas en plásmidos binarios para expresar las proteasas y sus péptidos diana en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Las construcciones se realizaron utilizando el plásmido pG53CPMVZ (Anexo I). A partir de una versión de este plásmido se expresaron las construcciones reporteras con Rosea1-diana-NIb (fragmento de 100 aminoácidos) y a partir de otra versión se expresaron las distintas NIaPros virales (Figura 3). Se sabe que el factor de transcripción Rosea1 es inactivo cuando esta fusionado a determinados fragmentos proteicos de la NIb del WMV. En consecuencia, si no se produce el procesamiento de la construcción reportera por la NIaPro, no se induce la biosíntesis de antocianinas. En cambio, si se produce el procesamiento en el sitio de reconocimiento, Rosea1 queda libre induce la acumulación de antocianinas en el tejido de la planta (Zhang *et al.*, 2014; Passeri *et al.*, 2016; Cordero *et al.*, 2018).

En este trabajo, se ha continuado con el trabajo desarrollado por la investigadora Arantxa Rosado, que clonó con éxito las construcciones reporteras y las NIaPro de los virus PPV, SMV, PVMV, TEV, TVMV, PVY y LMV. En base a su trabajo se ha desarrollado se han clonado las construcciones reporteras y las NIaPros de los virus OYDV y HoMV. Las dianas utilizadas en las construcciones reporteras se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Sitios de reconocimiento de los virus estudiados.

Virus	Sitio de reconocimiento NIaPro
TuMV	GCTGAGGCTTGTGTTTATCACCAGGCAGGTGAA
PPV	GAGTCCAACGTTGTTGTGCACCAAGCTGACGAA
LMV	GATATGGATGAAGTCTATCATCAAGTAGACACG
PVY	GACTCATATGAGGTATATCATCAGGCAAACGAC
PVMV	GGTGATGACTTTGTTCTACACCAAGCTGGTGAG
OYDV	ATTCCGAAGGAGGTTTCGATATCAGGCGGGGAA
SMV	TGTTGTGAATCAGTGTCTTACAATCAGGCAAG
TEV	ACGACTGAGAATCTTTATTTTCAGAGTGGCACT
HoMV	GAACCAACTCTTGTTTTTCACGAAGCAGATGAT

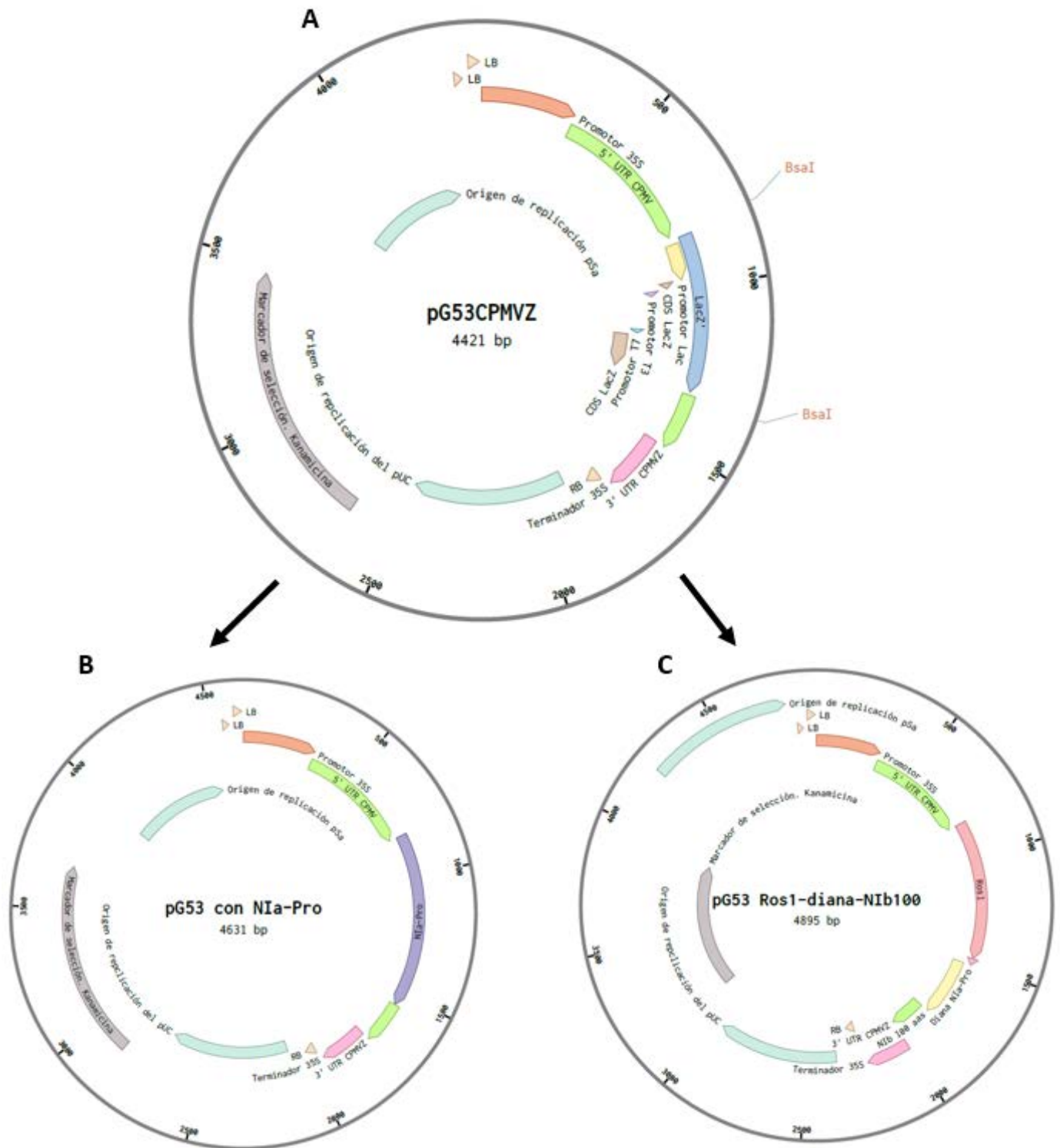


Figura 3. Construcciones genéticas utilizadas. (A) Plásmido pG53CPMVZ a partir del cual se realizaron las dos series de construcciones genéticas. Plásmidos (B) pGNIaPro que expresarán las proteasas de los diferentes virus y (C) pGRos1-diana-NIb100 para expresar las construcciones reporteras.

Para realizar el presente estudio se eligieron una serie de especies virales distribuidas en los diferentes clados de la familia *Potyviridae* (Figura 4). Principalmente se intentó que hubiese al menos un virus representando a cada clado, y además, que fueran virus de los cuales ya se tuviera la proteasa en el laboratorio o bien tejido infectado de donde se pudiera obtener. No obstante, se pidieron por síntesis química las proteasas del HoMV, PRSV y OYDV. Puesto que la NIb de la construcción reportera pertenece al virus del mosaico de la sandía (WMV), no se ha trabajado con este virus para evitar posibles interferencias; la NIa y la NIb de los potyvirus interactúan entre sí (Li *et al.*, 1997).

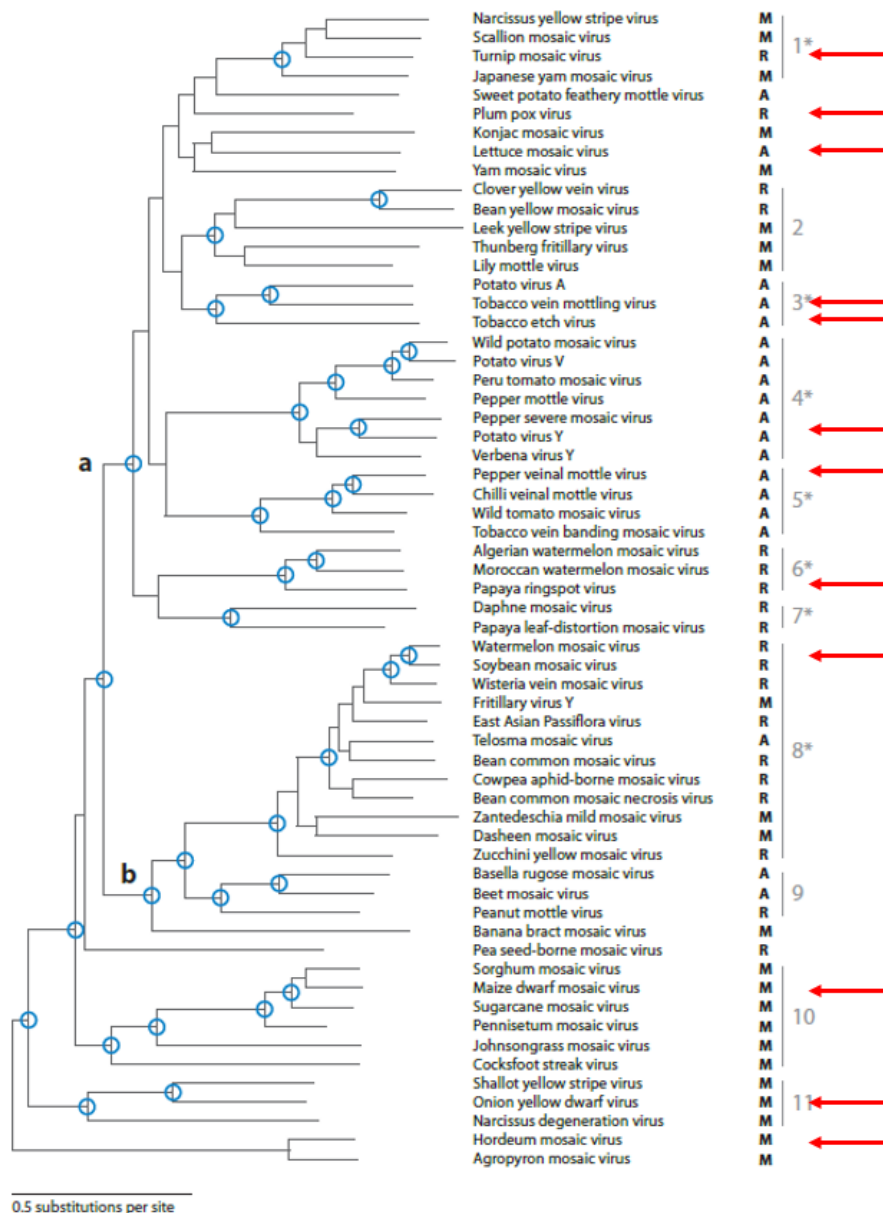


Figura 4. Filogenia de la familia *Potyviridae*. Las flechas rojas indican los virus con los que se ha trabajado (adaptado de Gibbs y Ohshima, 2010).

5.1. Eficiencia y especificidad de corte de las NlaPros virales

5.1.1 Obtención de las construcciones con las NlaPros

Los cDNAs de las NlaPros de HoMV, PRSV y OYDV fueron obtenidos por síntesis química, mientras que el cDNA de la NlaPro del MDMV fue amplificado de una muestra de tejido infectado. Los cDNAs de HoMV, PRSV y OYDV se amplificaron por PCR, mientras que el del MDMV se amplificó por RT-PCR a partir de una preparación de RNA utilizando los cebadores la Tabla 2.

Tabla 3. Cebadores utilizados para la amplificación por PCR de los cDNAs de varias NlaPros.

Virus	Cebadores de RT-PCR	Cebadores de PCR
PRSV	-	D3050: 5'-ctgtatattctgcccaaattgaaatgGGAAAAAGTCTTTGTCAAGG-3' D3051: 5'-CAATTGAATGTTTTTCGAGCAAtaactctggttcattaaattttctt-3'
OYDV	-	D3052: 5'-ctgtatattctgcccaaattgaaatgGCTAAATCAGCATGTTGTG-3' D3053: 5'-CTTGATAAATAGTGTGACATTTCAAtaactctggttcattaaattttctt-3'
HoMV	-	D3054: 5'-ctgtatattctgcccaaattgaaatgAGCAAATCACACCTAGCAG-3' D3055: 5'-GGAGACAGATGTAGAACATCAAtaactctggttcattaaattttctt-3'
MDMV	D3060: 5'-GCCATGTTTCATGTTGAATCCC-3'	D3058: 5' ctgtatattctgcccaaattgaaatgGCAAAGTCCATGTTGATAGG-3' D3059: 5'-aaagaaaatttaatgaaccagagttaCTGTTCCGTCACATCAAATG-3'

Los cDNAs amplificados se insertaron en el plásmido pG53CPMVZ mediante ensamblaje Gibson. Para ello, se realizó una digestión del plásmido con la enzima de restricción BsaI, ya que contiene sitios de restricción para dicha enzima (Anexo I). Los productos de PCR y de la digestión del plásmido se separaron mediante una electroforesis en gel de agarosa (Figura 5B). Seguidamente, se purificaron los DNAs y se realizó el ensamblaje. Para finalizar se electroporó *E. coli* y se procedió a la purificación de los plásmidos y análisis mediante su correspondiente electroforesis de agarosa (Figura 5C).

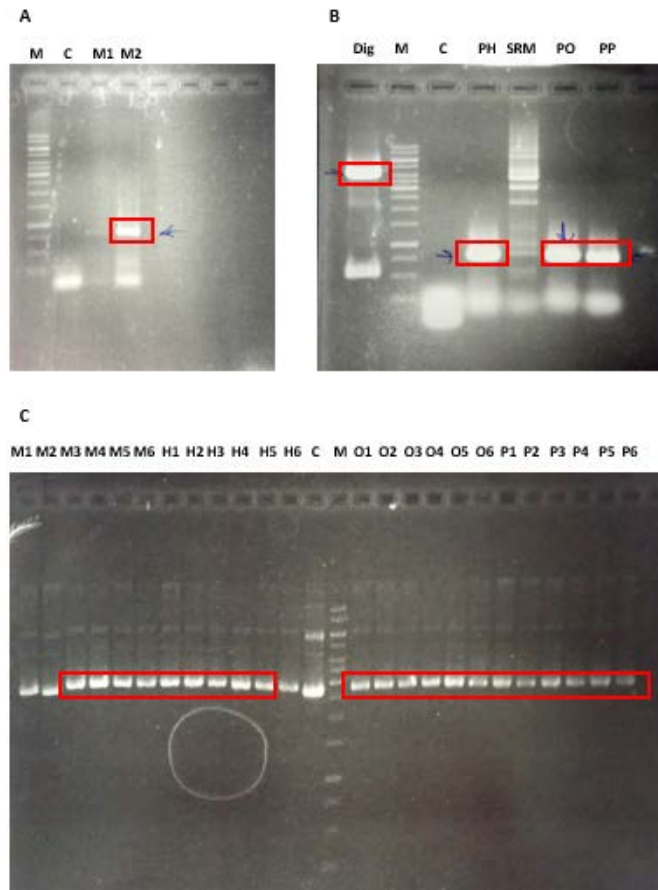


Figura 5. Geles de agarosa correspondientes a las diferentes PCR y plásmidos con cDNAs de NlaPro. (A) Productos de la RT-PCR para la NlaPro de MDMV. C, control de PCR sin ADN molde; M1 y M2, RT-PCR para MDMV, M1 tiene 6 μ l de la reacción y M2 14 μ l. (B) Productos de la PCR de las NlaPro y digestión de CPMVZ. Control de PCR sin ADN molde; Dig, producto de la digestión de pGCMPVZ; PH, producto de PCR de HoMV; PO, producto de PCR de OYDV; PP, producto de PCR de PRSVA; SRM, construcción del sitio de reconocimiento del MDMV. (C) Plásmidos de las NlaPro ya ensambladas. C, plásmido control con la proteasa de TEV; M1-M6, proteasa del MDMV; H1-H6, proteasa del HoMV; O1-O6, proteasa del OYDV; P1-P6, proteasa del PRSV. En todos los casos M corresponde al marcador de peso molecular de 1 kb.

5.1.2 Obtención de las construcciones con los sitios de reconocimiento de las proteasas virales

Con el fin de obtener las construcciones reporteras con los sitios de reconocimiento, se diseñaron los cebadores correspondientes a las dianas de las NlaPros de HoMV, PRSV, OYDV y MDMV (Tabla 3). Con ellos, se realizaron diversas PCR, utilizando como ADN molde una construcción del sitio de reconocimiento obtenida previamente para el TVMV (Cordero *et al.*, 2018). Los cebadores solo cambian la diana de reconocimiento del virus, que queda enmarcada entre Rosea1 y el fragmento de NlB de 100 aminoácidos. Se trata de cebadores adyacentes que se fosforilaron previamente a su uso en la PCR permitiendo así la posterior ligación del plásmido.

Tabla 4: Cebadores utilizados para la amplificación de los sitios de reconocimiento de las proteasas de HoMV, OYDV, PRSV, MDMV.

Virus	Cebadores
HoMV	D3048: 5'-AACAAAGAGTTGGTTCATTTCCAATTTGTTGGGC-3' D3049: 5'-CCATCTCTCCTTTCTACTATCATCTGCTTCGTGAAA-3'
OYDV	D3046: 5'-AACCTCCTTCGGAATATTTCCAATTTGTTGGGC-3' D2047: 5'-CCATCTCTCCTTTCTACTTTCCCCCGCCTGATATCG-3'
PRSV	D3044: 5'-CACATGCGTATTGTTATTTCCAATTTGTTGGGC-3' D3045: 5'-CCATCTCTCCTTTCTACTATTCTTGGACTGATGAAA-3'
MDMV	D3056: 5'-GACATCTATGACTTCATTTCCAATTTGTTGGGC-3' D3057: 5'-CCATCTCTCCTTTCTACTTTACCAGCTTGATGTTT-3'

Posteriormente a la PCR, se realizó la correspondiente electroforesis en gel de agarosa. Los productos de las PCR en las que finalmente se pudo amplificar el cDNA de interés para el OYDV y el PRSV se muestran en la Figura 6. Los productos de la PCR esperados para el MDMV y el HoMV solo se pudieron obtener mediante una PCR en gradiente, para determinar qué temperatura de hibridación era la óptima (Figura 7).

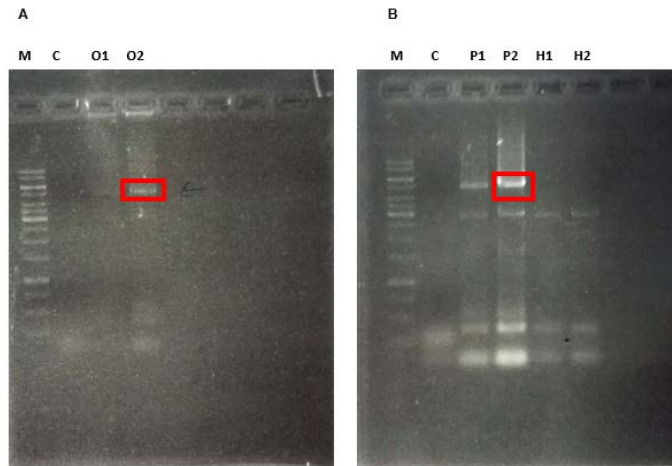


Figura 6. Electroforesis de agarosa de PCRs de (A) OYDV y (B) PRSV y HoMV. M, marcador de peso molecular de 1 kpb; C, control de PCR sin ADN molde. En (A) O1 y O2, sitio de reconocimiento de NlaPro de OYDV (6 y 14 μ l respectivamente). En (B) P1 y P2, sitio de reconocimiento de NlaPro de PRSV (6 y 14 μ l respectivamente); H1 y H2, HoMV.

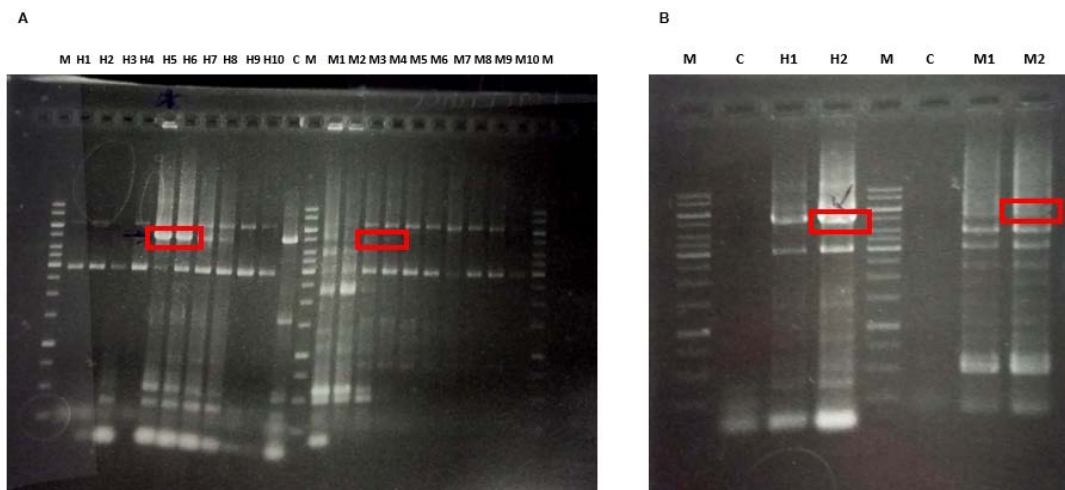


Figura 7. Electroforesis de agarosa de PCRs realizadas para obtener la banda correspondiente a los sitios de reconocimiento de MDMV y HoMV. (A) Electroforesis de agarosa con producto de la PCR en gradiente. C corresponde al control de la PCR, en este caso se trata de la construcción reportera de TEV; H1-H10 corresponden a las 10 PCR con diferentes temperaturas de extensión para HoMV; M1-M10 lo mismo que H1-H10, pero para MDMV. (B) Electroforesis de las PCRs posteriores con las temperaturas de extensión determinadas. C corresponde al control de la PCR, sin ADN molde; H1 y H2 corresponden al producto de PCR de la construcción con el sitio de reconocimiento para HoMV, con 6 μ l y 14 μ l respectivamente; M1 y M2 corresponden a lo mismo que H1 y H2, pero para el virus MDMV, con los mismos volúmenes, respectivamente. En todos los casos M corresponde al marcador de peso molecular de 1 kb.

Una vez cortada la banda correspondiente a la construcción del sitio de reconocimiento de cada uno de los virus, se realizó una purificación de los ácidos nucleicos presentes en dicha banda, una ligación para la recircularización de los plásmidos y una purificación de los ácidos nucleicos de la solución. Se transformaron bacterias *E. coli* que se plaquearon en medio selectivo. A continuación, se seleccionaron colonias que se crecieron en medio líquido toda la

noche. Al día siguiente se realizó la purificación de los plásmidos (miniprep) y se corrió un gel de electroforesis para analizar los resultados (Figura 8).

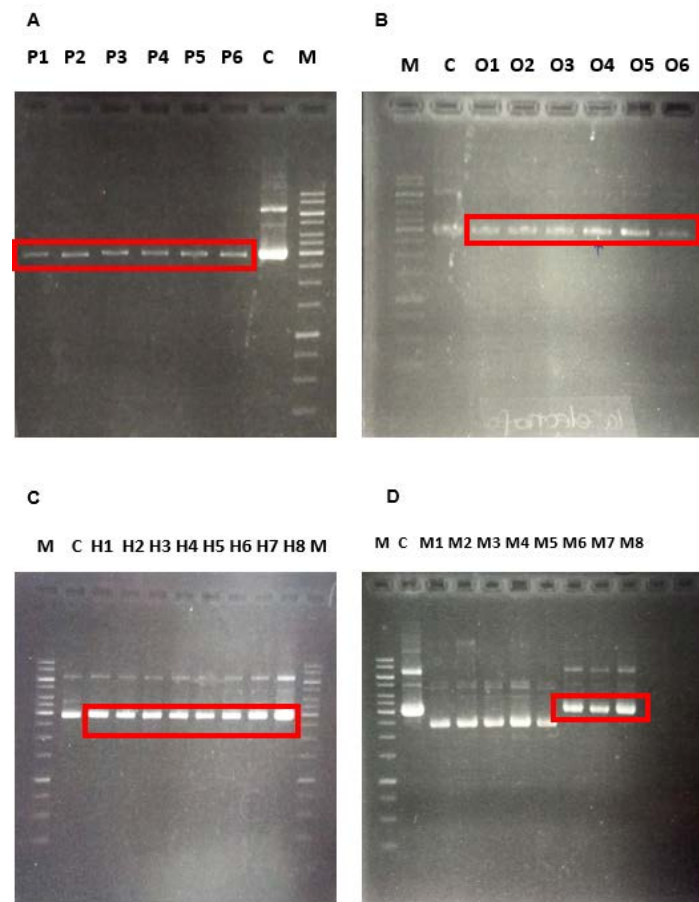


Figura 8. Electroforesis de agarosa mostrando los resultados de las las diferentes réplicas de la construcción del sitio de reconocimiento de (A) PRSV, (B) OYDV, (C) HoMV y (D) MDMV. En todos los casos, M corresponde al marcador de peso molecular de 1kb y C al control, que consiste a la construcción correspondiente al sitio de reconocimiento de TEV.

Tras estudiar los resultados obtenidos, se secuenció un clon correspondiente a cada virus con el objetivo de comprobar que construcción experimental era idéntica a la teórica. La obtención de los sitios de reconocimiento de los virus mencionados en la Tabla 3 resultó complicada. Se realizaron múltiples ensayos, teniéndose que descartar para el experimento donde se probó la eficiencia y especificidad de corte de las proteasas, los virus del PRSV y del MDMV. Esto fue debido a que, en todos los clones que se secuenciaron de PRSV, se obtenían las mismas mutaciones en varios nucleótidos del sitio de reconocimiento de la NIaPro. Puesto que los cebadores correspondientes estaban bien diseñados, lo único que puede dar explicación a este suceso es que la casa comercial enviase unos cebadores que no fuesen correctos y, por lo tanto, se obtuviera este resultado en todos los clones secuenciados. Para el sitio de reconocimiento del MDMV, ninguno de los tres clones provenientes de diferentes PCR que se enviaron a secuenciar resultaron perfectos. De hecho, a lo largo de toda la secuencia presentaban diferentes errores.

5.1.3. Análisis del procesamiento

Una vez obtenidas las construcciones que contenían o bien los sitios de reconocimiento o bien las proteasas, se procedió a electroporar *A. tumefaciens* para infiltrar plantas de *N. benthamiana*. En este experimento se infiltraron dos hojas por planta, teniendo para cada virus una maceta con tres plantas cada una. De esta manera, cada réplica estaba constituida por tejido de dos hojas infiltradas, teniendo tres replicas en total por virus. Mirando de frente a la hoja, y con el peciolo en la parte superior, se infiltró a la izquierda el control (sitio de reconocimiento con el plásmido vacío pG53CPMVZ) y a la derecha tanto la NlaPro como la construcción reportera con el sitio de reconocimiento (Figura 9).

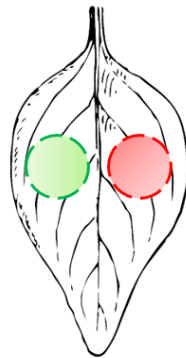


Figura 9. Modo de agroinfiltración del experimento en la hoja de *N. benthamiana*, en verde construcción reportera junto con CPMVZ sin NlaPro, y en rojo con la NlaPro correspondientes.

Tras los 6 días de espera correspondientes, se recogieron las muestras (Figura 10).

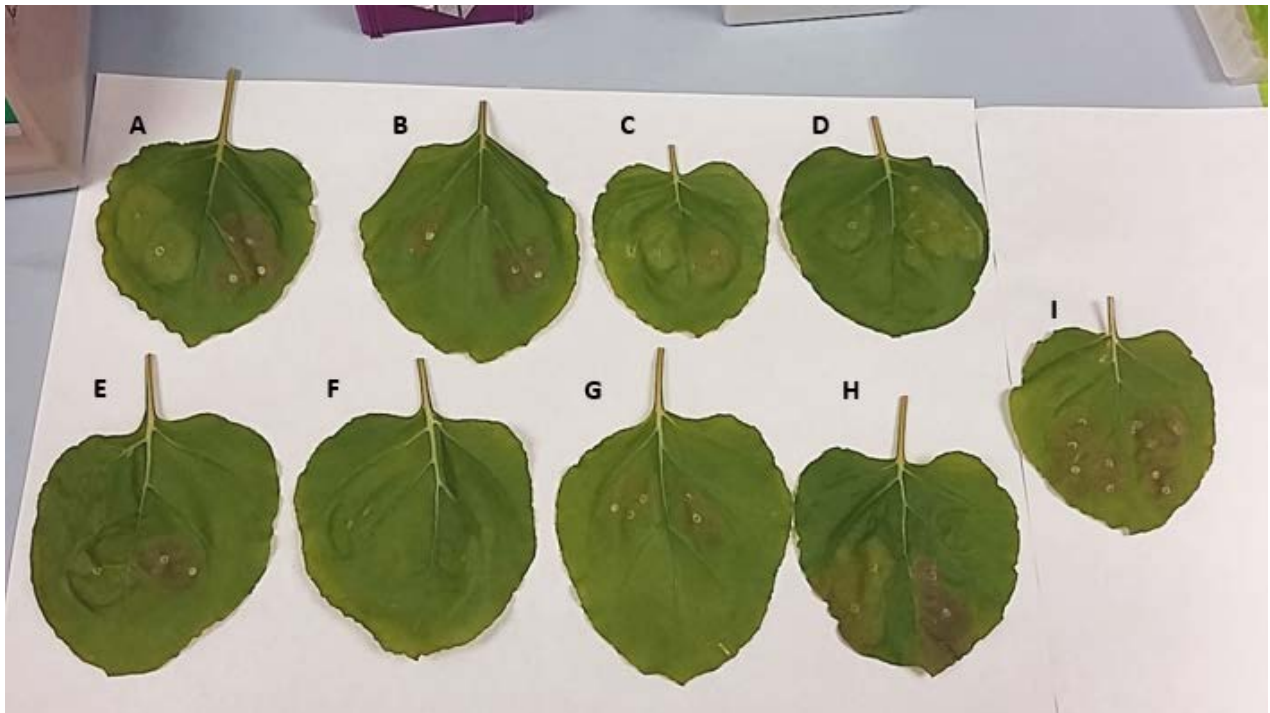


Figura 10. Conjunto de hojas correspondientes a diferentes muestras de los virus (A) TEV (B) PVY (C) PPV (D) OYDV (E) TuMV (F) SMV (G) LMV (H) PVMV e (I) HoMV.

El color rojo producido por la acumulación de antocianinas se pudo observar a simple vista en la mayoría de los casos. No obstante, se observó algún resultado inesperado, tales como el del SMV, en el cual no se observa pigmentación roja ni en el control sin proteasa ni donde se expresa la proteasa. Otro caso es el del HoMV, donde el color rojo puede apreciarse tanto en el control (donde no hay proteasa) como donde se expresa la NIaPro. Se realizó la correspondiente extracción de antocianinas para obtener resultados cuantitativos. Se ha determinado el valor de 0,5 de absorbancia a 595 nm como umbral por debajo del cual se considera que no hay una acumulación substancial de antocianinas. Este umbral viene determinado por los resultados visuales y por los estadísticos mostrados en la Figura 11. Coincide que no se observa pigmentación roja en aquellos resultados clasificados como 'e' por el análisis estadístico realizado. Por tanto, se escoge el valor más alto que está clasificado como 'e', que corresponde al control de TEV, como valor umbral. Esta elección se tomó también siendo conscientes de la alta eficiencia y especificidad de corte que tiene la NIaPro de TEV y los estudios por los que viene respaldado (Cesaratto *et al.*, 2016, Cordero *et al.*, 2018). Con el fin de establecer las diferencias entre los niveles de antocianinas de las distintas proteasas virales analizadas, se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA), seguido del test post-hoc de Duncan para comparar las medias, considerando que existen diferencias significativas cuando el p-valor es igual o menor a 0,05 ($P \leq 0,05$).

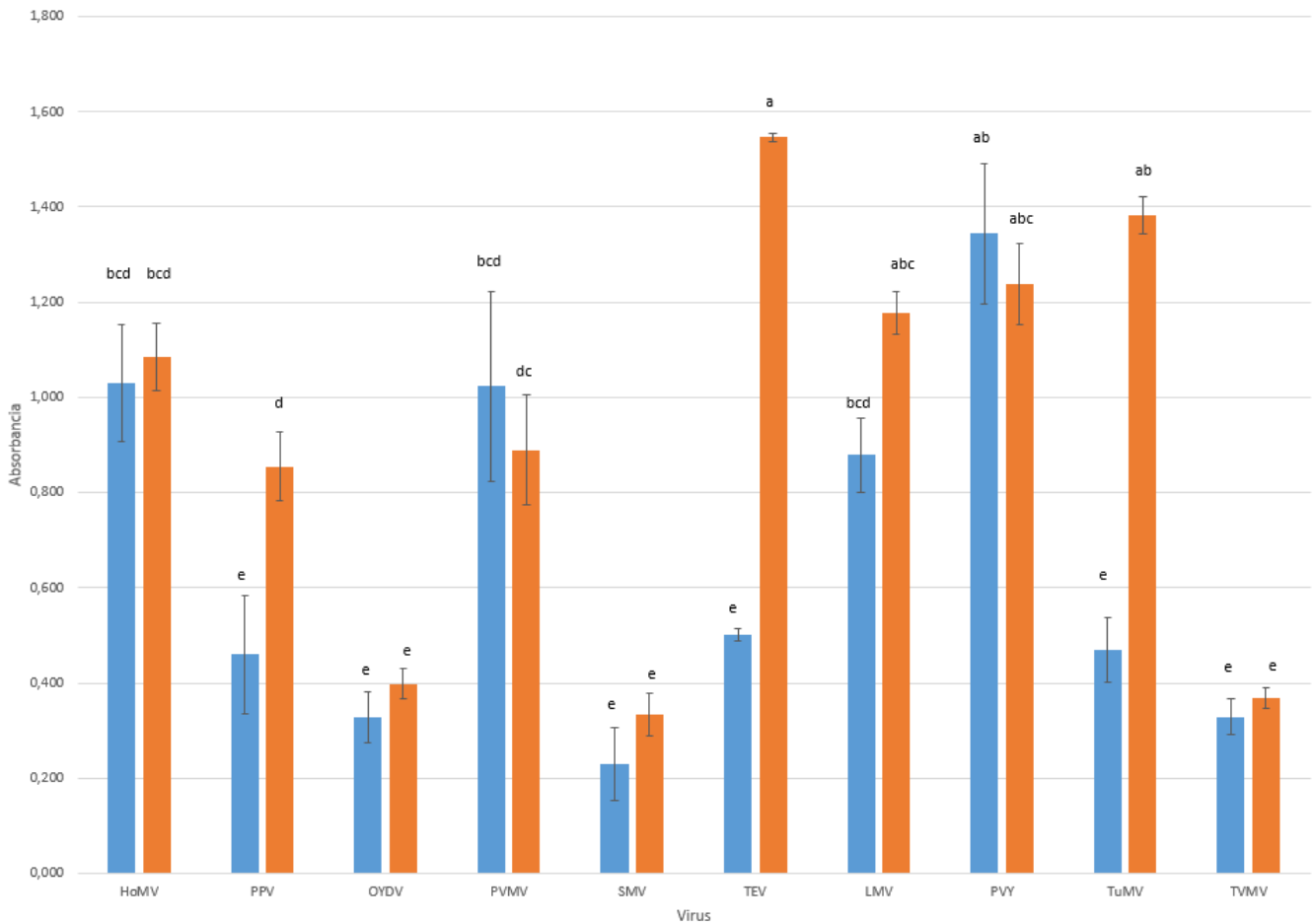


Figura 11. Acumulación de antocianinas tanto en los controles sin proteasa (barras azules) como en las muestras con proteasas (barras naranjas). Se representa la media de 3 réplicas \pm error típico (SE). Diferentes letras indican diferencias significativas estadísticamente de acuerdo con el Test de Duncan ($p < 0,05$).

En base a estos resultados, tenemos tres escenarios posibles. El primer escenario es el esperado, en el cual el control no presenta acumulación de antocianinas, y cuando se añade la proteasa sí. El mejor ejemplo de este escenario es la NIaPro del TEV, con la que se esperaban unos resultados como los ya descritos anteriormente (Cordero *et al.*, 2018). No obstante, cabe destacar otras NIaPros como las del PPV o el TuMV, los cuales también presentan una producción de antocianinas en presencia de la NIaPro, siendo los niveles de absorbancia en el control menores, por debajo del umbral establecido. Como ya se ha mencionado anteriormente, en el control no hay acumulación de antocianinas porque no hay NIaPro. En consecuencia, el factor de transcripción Rosea1 permanece unido al elemento inhibitorio N1b de 100 aminoácidos y no puede ejercer su función. Sin embargo, cuando se añade la NIaPro y ésta corta por el sitio de reconocimiento, Rosea1 queda libre, aumentando considerablemente la expresión de los genes biosintéticos de las antocianinas (Zhang *et al.*, 2014; Passeri *et al.*, 2016).

El segundo escenario es en el que no hay diferencias entre el control con el plásmido vacío y en el caso en el que está presente la proteasa viral, sin haber en ningún caso acumulación de antocianinas. Esto puede ser debido a que la NIaPro no corte la diana de reconocimiento, o la reconozca muy ineficientemente, y por tanto el factor de transcripción Rosea1 no se libera o lo hace en cantidad insuficiente para inducir la biosíntesis de antocianinas. En este escenario se encuentran los virus OYDV, SMV y TVMV.

El tercer escenario es en el que no hay diferencias entre el control con el plásmido vacío y en el caso en el que está presente la proteasa viral, habiendo en ambos casos acumulación de antocianinas. Esto puede ser debido a que la NIb de 100 aminoácidos sea demasiado corta como para inhibir la función del factor de transcripción Rosea1, aunque la NIaPro no haya escindido el péptido de reconocimiento. Esto significa que el péptido de reconocimiento de cada NIaPro influye en la inhibición de NIb sobre Rosea1, posiblemente debido a los cambios conformacionales que los péptidos de reconocimiento producen en la proteína de fusión, facilitando o no que la NIb sea capaz de inhibir a Rosea1. Esta es la situación observada para los virus del HoMV, PVMV, LMV y PVY.

Ante esta diversidad de resultados, nos propusimos realizar dos experimentos más para optimizar las construcciones reporteras de virus que se encuentran en el segundo y tercer escenario, de tal manera que se sepa una posible manera de trabajar con ellos.

5.2. Optimización de las construcciones con los sitios de reconocimiento para las NIaPros que no muestran acumulación de antocianinas en ningún caso

Para las NIaPros que no mostraron acumulación de antocianinas, se propuso aumentar el número de sitios de reconocimiento en la construcción reportera. En este experimento, se probó aumentando a dos sitios de reconocimiento (Rosea1-diana/diana-NIb) y a tres (Rosea1-diana/diana/diana-NIb), para ver si al multiplicar las dianas, aumenta también la acumulación de antocianinas debido a que la NIaPro tiene más oportunidades para cortar la construcción reportera.

Para este análisis se escogió el TVMV. Esta NIaPro se escogió por razones bibliográficas, ya que como se ha descrito (Tözsér *et al.*, 2005; Cordero *et al.*, 2018), se conoce que la producción de antocianinas es menor que con la NIaPro del TEV de manera estadísticamente significativa. En definitiva, el objetivo fue investigar si aumentando el número de sitios de reconocimiento de la NIaPro del TVMV se obtiene una acumulación de antocianinas con diferencias significativas respecto al control

Se realizó una PCR en la cual se utilizó como molde la construcción reportera con un único sitio (Cordero *et al.*, 2018) y los cebadores adecuados (Tabla 4) para aumentar el número de sitios de reconocimiento a dos y a tres.

Tabla 5: Cebadores para la amplificación de la construcción reportera de TVMV con dos y tres sitios de reconocimiento.

Número de sitios de reconocimiento TVMV	Cebadores
2 sitios de reconocimiento de TVMV	D1945: 5'-ATTTCCAATTTGTTGGGCCTCCTC-3' D3012: 5'TTACGTGAGACTGTTAGATTCCAAAGCGATACCTTGCGTGAAACTGTGAGATTTTC-3'
3 sitios de reconocimiento de TVMV	D3011: 5'TGTGTCACTCTGAAATCGCACTGTTTCTCGCAAATTTCCAATTTGTTGGGCCTC-3' D3012: 5'TTACGTGAGACTGTTAGATTCCAAAGCGATACCTTGCGTGAAACTGTGAGATTTTC-3'

Se electroporó *E. coli* con el plásmido de la proteasa vacío (pG53CPMVZ) y la construcción con un sitio de reconocimiento de la NlaPro del TVMV (Figura 12), y se realizó la PCR mencionada para obtener las construcciones. Posteriormente, se cortó la banda, se purificó el ADN, se hizo la ligación correspondiente y se electroporó *E. coli*. Se realizaron las purificaciones de plásmidos correspondientes y se procedió a secuenciar (Figura 13). Seguidamente, se electroporó *A. tumefaciens* con el plásmido para expresar la proteasa del TVMV, el plásmido de la proteasa vacío (CPMVZ) y las construcciones reporteras con uno, dos y tres sitios de reconocimiento de la NlaPro del TVMV. Tras 6 días, se procedió a la correspondiente extracción de antocianinas y su medición por espectrofotometría obteniéndose los resultados de la Figura 14.

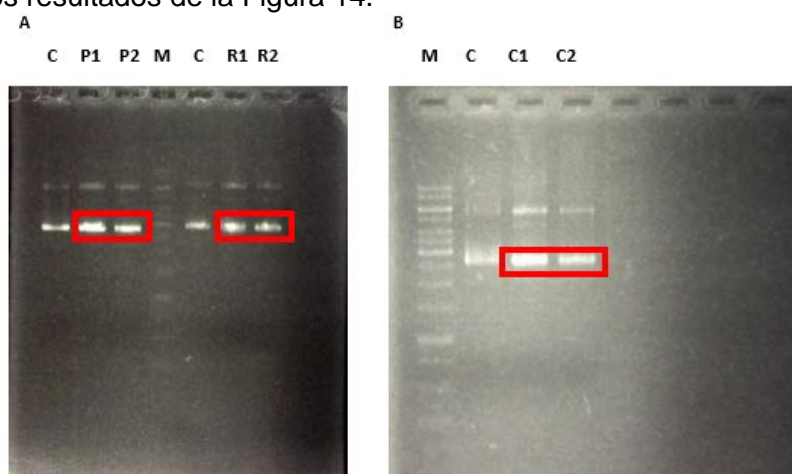


Figura 12. Resultados de minipreps de (A) Proteasa de TVMV y construcción reportera con un sitio de reconocimiento. C corresponde al control, la proteasa de TVMV obtenida previamente en el laboratorio; P1 y P2 corresponden a las dos réplicas de la proteasa del TVMV; R1 y R2 a las dos réplicas de la construcción del sitio de reconocimiento del TVMV. (B) Plásmido vacío (CPMVZ). C corresponde al control, que es el plásmido vacío obtenido previamente en el laboratorio; C1 y C2 corresponden a dos réplicas del plásmido vacío CPMVZ'. En todos los casos, M corresponde al marcador de peso molecular de 1kb

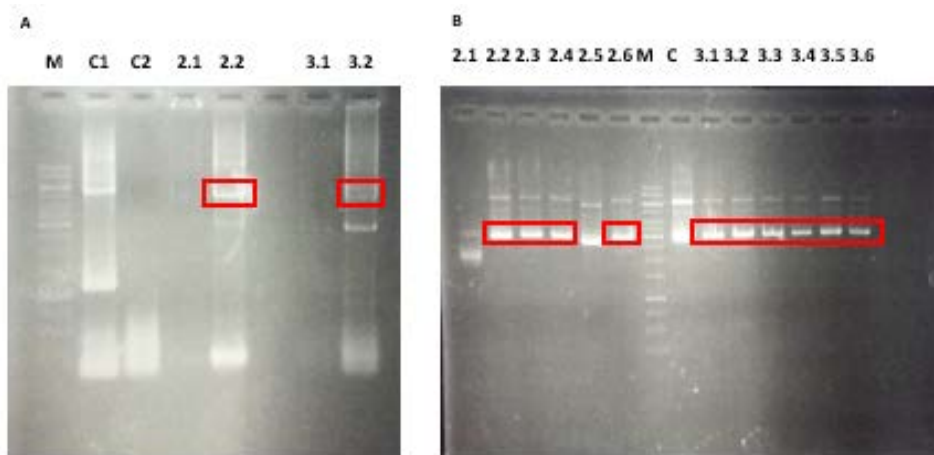


Figura 13. Resultados de PCR y extracción de plásmidos para dos y tres sitios de reconocimiento de TVMV. (A) Resultados de PCR con dos y tres sitios de reconocimiento en la construcción reportera para TVMV. C1 y C2 corresponden a los controles, C1 corresponde a la construcción con un sitio de reconocimiento de TVMV obtenida previamente en el laboratorio y C2 es el control de la PCR, sin ADN molde; 2.1, 2.2, 3.1 y 3.2 corresponden a las construcciones reporteras con 2 y 3 sitios de reconocimiento, 2.1 y 3.1 poseen 6 μ l del producto de PCR, y 2.2 y 3.2 poseen 14 μ l de producto de PCR. (B) Resultados de las minipreps correspondientes a dos y tres sitios de reconocimiento en la construcción reportera para TVMV. C corresponde al control, que es TVMV con 1 sitio de reconocimiento; 2.1-2.6 corresponden a las construcciones con 2 sitios de reconocimiento; 3.1-3.6 las construcciones con 3 sitios de reconocimiento. En todos los casos, M es el marcador de peso molecular es de 1kb.

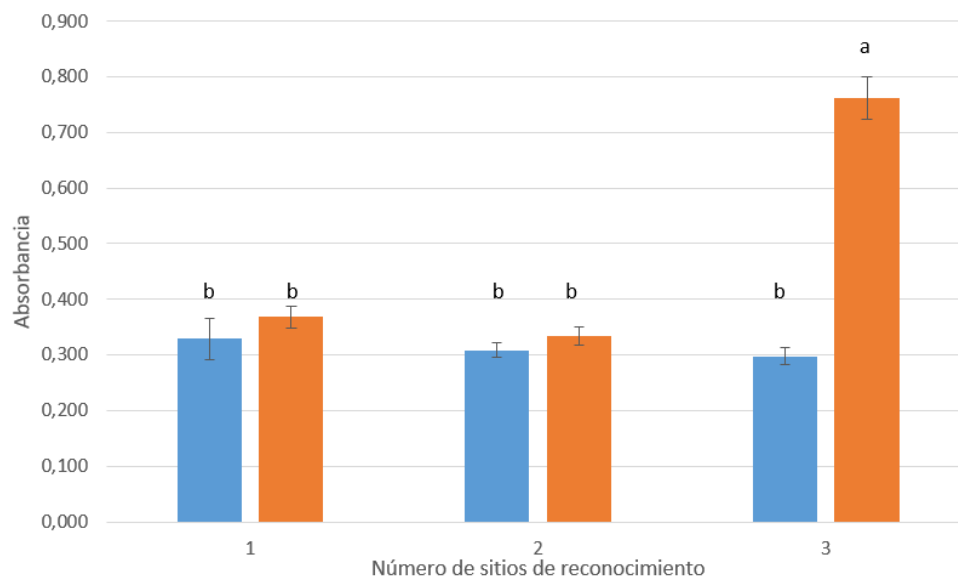


Figura 14. Acumulación de antocianinas en los controles sin proteasa (barras azules) y las muestras con proteasa (barras naranjas), para construcciones reporteras con 1, 2 y 3 sitios de reconocimiento. Los datos representan la media de 3 réplicas \pm error típico (SE). Diferentes letras indican diferencias significativas estadísticamente de acuerdo con el Test de Duncan ($p < 0,05$).

El análisis de los resultados permite concluir que cuando hay tres sitios de reconocimiento en la construcción reportera, se produce un aumento substancial en la acumulación de antocianinas. Estos resultados indican un posible camino para optimizar las construcciones

genéticas en el caso de NIaPros poco eficientes. Multiplicando el número de dianas se consigue aumentar la eficiencia del corte.

5.3. Optimización de las construcciones de los sitios de reconocimiento para las NIaPros que muestran expresión de antocianinas en ambos casos

Para aquellos virus que tanto en el control como cuando está presente la proteasa se observa acumulación de antocianinas, se propuso aumentar el fragmento inhibitorio de NIb. Este objetivo se abordó con la proteasa del HoMV. Si se acumulan antocianinas tanto en el control como cuando está presente la proteasa es porque el fragmento NIb de 100 aminoácidos no es lo suficientemente grande como para inhibir la actividad del factor de transcripción Rosea1. En esta situación independientemente de la presencia o ausencia de la NIaPro, se acumulan antocianinas sin diferencias significativas.

Mediante PCR se aumentó el tamaño de la NIb de 100 a 200, 300, 400 y a la NIb completa. En estas cinco PCRs (Figura 15) se utilizó como ADN molde, las construcciones utilizadas con estas mismas longitudes de NIb para la NIaPro del TEV (Cordero *et al.*, 2018), y como cebadores fosforilados, los utilizados anteriormente para cambiar el sitio de reconocimiento de la construcción reportera, el D3048 y el D3049 (Tabla 3).

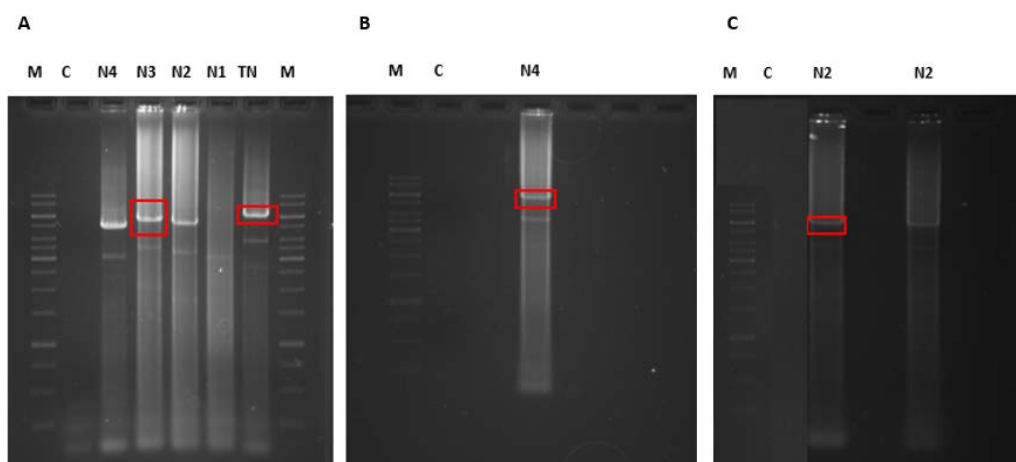


Figura 15. Electroforesis de PCRs de las NIb. En todos los casos, M corresponde al marcador de peso molecular de 1kb, C al control de la PCR, sin ADN molde. N4 a la construcción con la NIb de 400, N3 a la construcción con la NIb de 300, N2 a la construcción con la NIb de 200, N1 a la construcción con la NIb de 100 y TN a la construcción con la NIb entera. (A) Se escogieron las bandas de NIb300 y Toda la NIb. (B) Se escogió la banda de la NIb400 (C) Se escogió la banda de la NIb200.

Una vez separados los productos de PCR por electroforesis, se cortó y se purificó las bandas deseadas. Seguidamente, se ligaron los plásmidos y se purificó la ligación. Seguidamente se transformó *E. coli* y se plaqueó. Se escogieron colonias y se dejaron crecer toda la noche en medio líquido. Finalmente, se realizó la extracción de plásmidos con la consiguiente electroforesis (Figura 16). Se secuenció, y una vez se tuvo la total certeza de que las secuencias eran las adecuadas, se transformó *A. tumefaciens*, se plaqueó y a los tres días se

picaron colonias y se dejaron crecer en medio líquido durante una noche. Al día siguiente, se midió la OD (que debía estar entre 0,5 y 1,5) y se prosiguió a agroinfiltrar hojas de *N. benthamiana*.

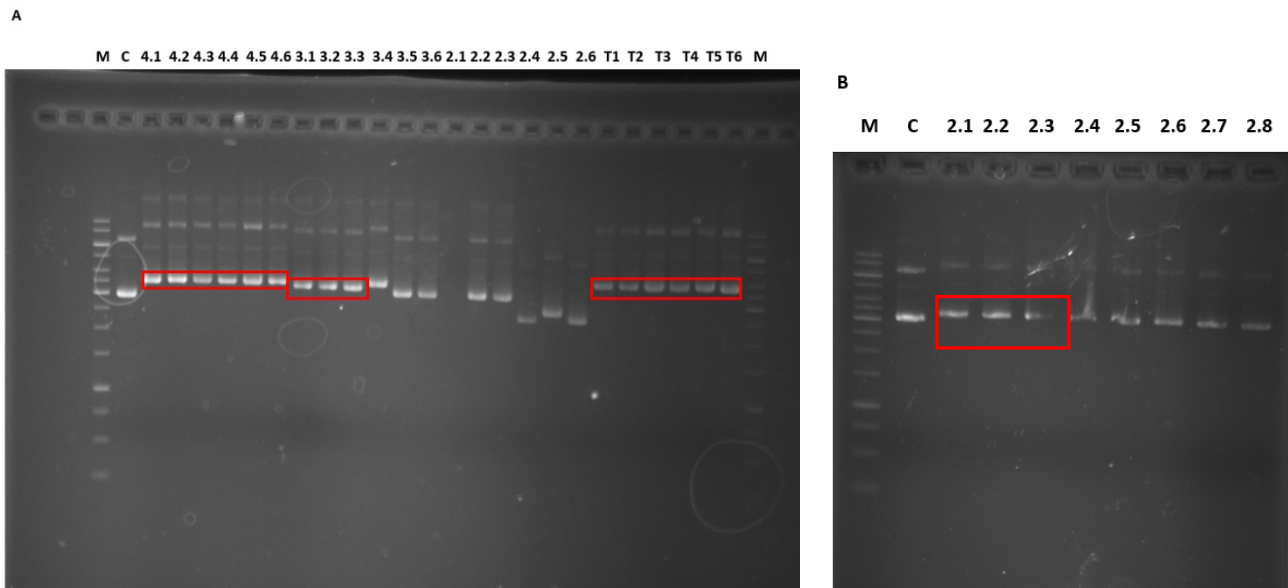


Figura 16. Electroforesis de extracción de plásmidos. (A) Electroforesis de donde se obtienen todos los sitios de reconocimiento con diferentes Nib excepto de la Nib200. De 4.1 a 4.6. corresponde a las réplicas con una Nib de 400; de la misma manera 3.1 a 3.6. a las replicas de la Nib de 300; de 2.1 a 2.6. a las replicas de la Nib de 200 y T.1 a T.6. a las réplicas con toda la Nib. (B) Electroforesis de donde se obtiene la Nib 200. 2.1-2.8 corresponde a las réplicas con una Nib de 200. En todos los casos, M corresponde al marcador de peso molecular de 1kb, C al control correspondiente a la construcción reportera de HoMV con Nib de 100 aminoácidos utilizada en el experimento previo.

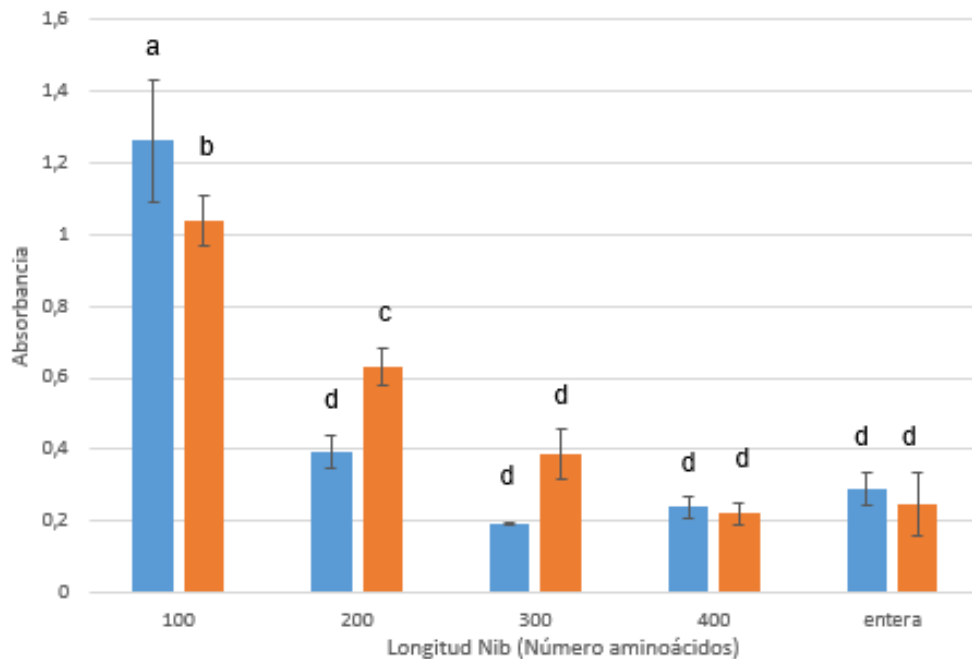


Figura 17. Acumulación de antocianinas en los controles sin proteasa (barras azules) y las muestras con proteasa (barras naranjas), para construcciones reporteras con longitud de Nib de 100, 200, 300, 400 aminoácidos y Nib entera. Los datos representan la media de 3 réplicas \pm error típico (SE). Diferentes letras indican diferencias significativas estadísticamente de acuerdo con el Test de Duncan ($p < 0,05$).

El análisis de los resultados permite determinar que el fragmento de la Nib que es capaz de inhibir al factor de transcripción Rosea1 es la de 200 aminoácidos de longitud. No obstante, se observa que para las longitudes de 300 y 400 aminoácidos, y de la Nib entera, no hay sobreexpresión de antocianinas ni en el control ni en presencia de la NIaPro. Esto puede ser debido a que el tamaño de la Nib impida estéricamente el corte por parte de la NIaPro, habiéndose obtenido así esta baja eficiencia de corte con las Nib más grandes. Esto viene apoyado por el valor que se ha obtenido para la Nib de 200 aminoácidos en presencia de la NIaPro, donde se observa acumulación de antocianinas, con una eficiencia de corte baja, pero mayor que cuando la construcción reportera tiene fragmentos de Nib mayores.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. Se ha analizado la eficiencia de las NIaPro del TVMV, TEV, LMV, SMV, TuMV, OYDV, HoMV, PVMV, PPV y PVY para procesar sus correspondientes dianas peptídicas, siendo TEV el virus cuya NIaPro posee mejores características.
2. Se ha determinado qué construcción reportera es la adecuada para trabajar con los virus que no presentan acumulación de antocianinas en ningún caso, el OYDV, SMV y TVMV. En estos casos se ha concluido que es necesario aumentar el número de sitios de reconocimiento de las NIaPro en la construcción reportera, siendo 3 sitios de reconocimiento los adecuados para trabajar con la NIaPro del TVMV.
3. Se ha determinado qué construcción reportera es la adecuada para trabajar con los virus que presentan acumulación de antocianinas sin y con NIaPro, el HoMV, PVMV, LMV y PVY. Para estos casos se ha concluido que es necesario aumentar el tamaño del fragmento inhibitorio de NIb en las construcciones reporteras. Para el HoMV, se ha determinado que el fragmento de NIb adecuado es de 200 aminoácidos.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- ALLAN A.C., HELLENS R.P. Y LAING W.A.** (2008). MYB transcription factors that colour our fruit. *Trends in Plant Science*; 13(3):99-102.
- ARKIN A.** (2008). Setting the standard in synthetic biology. *Nature Biotechnology*; 26:771-4.
- BEDOYA L.C., MARTÍNEZ F., ORZÁEZ D. Y DARÒS J.A.** (2012). Visual Tracking of Plant Virus Infection and Movement Using a Reporter MYB Transcription Factor That Activates Anthocyanin Biosynthesis. *Plant Physiology*; 158(3):1130-1138.
- CARRINGTON J.C. Y DOUGHERTY W.G.** (1987). Small Nuclear Inclusion Protein Encoded by a Plant Potyvirus Genome Is a Protease. *Journal of Virology*; 61(8):2540-2548.
- CESARATTO F., BURRONE O.R. Y PETRIS G.** (2016). Tobacco Etch Virus protease: A shortcut across biotechnologies. *Journal of Biotechnology*; 231:239-2349.
- COOK C., MARTIN L. Y BASTOW R.** (2014). Opportunities in plant synthetic biology. *Journal of Experimental Botany*; 65(8):1921–1926,
- CORDERO T., ROSADO A., MAJER E., JARAMILLO A., RODRIGO G., Y DARÒS J.A.** (2018). Boolean computation in plants using post-translational genetic control and a visual output signal. En Evaluación.
- CUENCA S., AGUADO M., YUSTE-CALVO C., SÁNCHEZ F., SÁNCHEZ-MONTERO J.M. Y PONZ F.** (2016). Nanonets Derived from Turnip Mosaic Virus as Scaffolds for Increased Enzymatic Activity of Immobilized *Candida antarctica* Lipase B. *Front. Plant Sci*; 7:464-466
- EISENMESSER E.Z., KAPUST R.B., NAWROCKI J.P., MAZULLA M.J., PANNELL L.K., WAUGH D.S. Y BYRD R.A.** (2000). Expression, purification, refolding, and characterization of recombinant human interleukin-13: utilization of intracellular processing. *Protein Expression and Purification*; 20(2):186-195.
- GARCÍA-ARENAL F. Y FRAILE A.** (2005). La virosis de las plantas y su control. *Phytoma*; 169:34-35
- GARDNER T.S. Y HAWKINS K.** (2013). Synthetic Biology: evolution or revolution? A co-founder's perspective; 17(6):871-877.
- GERGERICH R.C. Y DOLJA V. V.** (2006). Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. *The Plant Health Instructor*.
- GIBBS A. y OHSHIMA K.** (2010). Potyviruses and the Digital Revolution. *Annual Review of Phytopathology*; 48:205-223.
- HICHRI I., BARRIEU F., BOGS J., KAPPEL C., DELROT S. Y LAUVERGEAT V.** (2011). Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany*; 62(8):2465–2483.
- IVANOV K. I., ESKELIN K., LOHMUS A. Y MAKINEN K.** (2014). Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection. *Journal of General Virology*; 95:1415–29.

- JIN H Y MARTIN C.** (1999). Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Molecular Biology*, 41(5):577-585.
- KANG B.C., YEAM I. Y JAHN M.M.** (2005). Genetics of plant virus resistance. *Annual Review of Phytopathology*, (43):581-621.
- KAREEM A.** (2015). Recent classification of plant viruses and viroids. *Virus Diseases and Crop Biosecurity*, 7:121-123
- LEONARD E., NIELSEN D., SOLOMON K., Y PRATHER K.J.** (2008). Engineering microbes with synthetic biology frameworks; 36(12): 674-681.
- LI X.H., VALDEZ P., OLVERA R.E. Y CARRINGTON J.C.** (1997). Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (NIb): subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (NIa). *Journal of Virology*; 71: 1598-1607.
- MARCHISIO M. Y MARIO A.** (2014). In silico design and in vivo implementation of yeast gene Boolean gates. *Journal of Biological Engineering*; 8.
- MARTÍNEZ F. Y DARÒS JA.** (2014). Tobacco Etch Virus Protein P1 Traffics to the Nucleolus and Associates with the Host 60S Ribosomal Subunits during Infection. *Journal Virology*; 88(18):10725-10737.
- METT V., FARRANCE C.E., GREEN B.J. Y YUSIBOV V.** (2008). Plants as biofactories. *Biologicals*; 36(6):354-358.
- MIALDI B., EL MARJOU A., BOEUF G., BOUALLAGUI H., DUFOUR F., DI MARTINO P. Y ELM'SELMI A.** (2012). Oriented immobilization of the tobacco etch virus protease for the cleavage of fusion proteins. *Journal of Biotechnology*; 158(3):97-103
- NUNN C.M., JEEVES M., CLIFF M.J., URQUHART G.T., GEORGE R.R., CHAO L.H., TSUCUCHIA Y. Y DJORDEJEVIC S.** (2005). Crystal Structure of Tobacco Etch Virus Protease Shows the Protein C Terminus Bound within the Active Site; 350(1):145-155.
- PASSERI V., KOES R. Y QUATTROCCHIO F.M.** (2016). New challenges for the design of high value plant products: stabilization of anthocyanins in plant vacuoles. *Front Plant Sci*; 7: 153.
- RAJAMÄKI M.L., VALKONEN J.P.T.** (2009). Control of Nuclear and Nucleolar Localization of Nuclear Inclusion Protein a of Picorna-Like Potato virus A in Nicotiana Species. *Plant Cell*; 21(8): 2485-2502.
- REVERS F. Y GARCÍA J.A.** (2015). Molecular Biology of Potyviruses. *Advances in Virus Research*; 92:101-199.
- RIECHMANN J.L., LAIN S. y GARCÍA J.A.** (1992). Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology*; 73(1):1-16.
- SCHOLTHOF K.B.** (2004). Tobacco Mosaic Virus: A Model System for Plant Biology. *Annual Review of Phytopathology*; 42:13-34.

- SCHWINN K., VENAIL J., SHANG Y., MACKAY S., ALM V., BUTELLI E., OUAMA R., BAILEY P., DAVIES K. Y MARTIN C.** (2006). A Small Family of MYB-Regulatory Genes Controls Floral Pigmentation Intensity and Patterning in the Genus *Antirrhinum*. *Plant Cell*; 18(6):831-851.
- SHANG Y., SCHIWINN K.E., BENNET M.J., HUNTER D.A., WAUGH T.L., PATHIRANA N.N., BRUMMELL D.A., JAMESON P.E. Y DAVIES K.M.** (2007). Methods for transient assay of gene function in floral tissues. *Plant Methods*; 3(1).
- SHIH P.M., LIANG Y. y LOQUÉ D.** (2016). Biotechnology and synthetic biology approaches for metabolic engineering of bioenergy crops. *Plant J.*; 87(1):103-117.
- THOLE V., WORLAND B., SNAPE J.W. Y VAIN P.** (2007). The pCLEAN Dual Binary Vector System for Agrobacterium-Mediated Plant Transformation. *Plant Physiology*; 145(4):1211–1219.
- TÖZSÉR J., TROPEA J.E., CHERRY S., BAGOSSI P., COPELANDT.D., WLODAWER A. Y WAUGH D.S.** (2005). Comparison of the substrate specificity of two potyvirus proteases. *FEBS J.*; 272: 514-523.
- URCUQUI-INCHIMA S. y HAENNI F.** (2001). Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research*; 74:157–175.
- VAN DER VLUGT R.A.** (2006). Plant viruses in European agriculture: current problems and future aspects. En: Cooper I., Kühne T., Polishchuk V.P. (eds) *Virus Diseases and Crop Biosecurity*. NATO Security through Science Series. *Springer*, Dordrecht.
- VELÁSQUEZ N., HOSSAIN M.J. y MURPHY J.F.** (2015). Differential disease symptoms and full-length genome sequence analysis for three strains of Tobacco etch virus. *Virus Genes*; 442-449.
- WALLACE T.C. y GIUSTI M.M.** (2015). Anthocyanins. *Advances in Nutrition*; 6(5):620-622.
- WENDISCH V.F.** (2014). Microbial production of amino acids and derived chemicals: synthetic biology approaches to strain development. *Current Opinion in Biotechnology*; 30:51-58.
- LIU W. y STEWART.** (2015). Plant Synthetic biology. *Trends Plant Sci.*; 20(5):309-317.
- ZHANG Y., BUTELLI E. y MARTIN C.** (2014). Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. *Current Opinion in Plant Biology*; 19: 81-90.

ANEXO

8. ANEXO I

>pG53CPMVZ [P44] (4 421 pb)

GCGGCCGCGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGAAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAA
ATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCC
ACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTC
CACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTC
TTTGGAGAGGTATTAATAATCTTAATAGGTTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTA
AACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACCTTCTCTTGTCTTTCTTGGCTGAGCGATCTTCAACGTGTGTCAGAT
CGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAGTGCGG
CGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTATTCTTGTTCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAAGCTTGTCTGGAGGCTGCT
GTTTCAGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCCGGCGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGA
GGTATTGTTGCCTGTACTTCTTCTTCTTCTTCTTGTCTGATTGGTCTATAAGAAAATCTAGTATTTTCTTTGAAA
CAGAGTTTTCCCGTGGTTTTCGAAGTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGAAGGAG
ACCGCGGGAAAAGCGGGCAGTGAACGCAACGCAATTAAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTAC
ACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACC
ATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGGTACCGGGCCCCCTCGAGGTCG
ACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCCGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGG
TGGAGCTCCAATTCGCCTATAGTGAGTCTGATTAACGCGCTCACTGGCCGTCTGTTTTACAACGTCTGACTGG
GAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAG
GCCCCGACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGGGCGGGTCTCGCTCTGGT
TTCATTAAATTTCTTTAGTTTTGAATTTACTGTTATTCCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTG
CTCAGAGTGTGTTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTACAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGA
CACAAAAGATTTTAATTTTATTCTGTAATCACCAGTCTCTCTCAAAATCTATCTCTCTATTTTCTCCA
TAAATAATGTGTGAGTAGTTTTCCCGATAAGGGAAATTAGGGTCTTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATAT
AAGAAACCTTAGTATGTATTTGTATTTGTAAAATACTTCTATCAATAAAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAATC
CAGGGGCCCCGACGTTTCTTGACAGGATATATTGGCGGGTAAACTAAGTCGCTGTATGTGTTGTTGAGATCC
TCTAGGGCATGCAAGCTGATCTGGATCTCATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCG
CGTTGCTGGCGTTTTCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGC
GAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCTGTTCCGACCC
TGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGT
ATCTCAGTTCGGTGTAGGTGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCGACCGCTGCG
CCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCACCCTGGTA
ACAGGATTAGCAGACGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCCTAAGTACGGCTACACTA
GAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCG
GCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTC
AAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCA
TGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTTAAATCAATCTAAAGTATAT
ATGTGTAACATTGGTCTAGTGAATAGAAAACCTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTTCATATCAGGAT
TATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGG
CAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCTCGTCAAAAA
TAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGTTTATGCATTTCTT
TCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCAAAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTTCATT
GTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTAACAAACAGGAATCGAATGCAACC
GGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTG
TTTTCCCTGGGATCGCAGTGGTGAATACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAAATGCTTGATGGTGGAAAGAG
GCATAAATCCGTGAGCCAGTTTGTCTGACCATCTCATCTGTAACAACATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTT
TCAGAAACAACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCGGTAGATTGTGCGACCTGATTGCCCGACATATATCG
GAGCCCATTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTAATCGCGGCCCTTGAGCAAGACGTTTCCCGTT
GAATATGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGATGATATATTTT
TATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGGACACAACGTGGCTTTGTTGAATAAATCGAACTTTTGTCTGAGT
TGAAGGATCAGATCACGCATCTTCCCACAACGCAGACCGTTCCGTGGCAAAGCAAAAGTTCAAATACCAACT
GGTCCACCTACAACAAAGCTCTCATCAACCGTGGCTCCCTCACTTTCTGGCTGGATGATGGGGCGATTACGGCGA
TCCCCATCCAACAGCCCGCCGTCGAGCGGGCTTTTTTATCCCCGGAAGCCTGTGGATAGAGGGTAGTTATCCACG
TGAAACCGCTAATGCCCGCAAAGCCTTGATTACGGGGCTTTCCGGCCCCGCTCCAAAAACTATCCACGTGAAAT
CGCTAATCAGGGTACGTGAAATCGCTAATCGGAGTACGTGAAATCGCTAATAAGGTCACGTGAAATCGCTAATCA
AAAAGGCACGTGAGAACGCTAATAGCCCTTTCAGATCAACAGCTTGCAAAACACCCCTCGCTCCGGCAAGTAGTTA
CAGCAAGTAGTATGTTCAATTAGCTTTTTCAATTATGAATATATATATCAATTATTGGTTCGCCCTTGGCTTGTGGA
CAATGCGCTACGCGCACCGGCTCCGCCCGTGGACAACCGCAAGCGGTTGCCACCGTCGAGCGCCTTTGCCACA
ACCCGGCGGCCGGCCGCAACAGATCGTTTTATAAATTTTTTTTTTTTGA AAAAGAAAAGCCCCGAAAGCGGCAAC

CTCTCGGGCTTCTGGATTTCCGATCCCGGAATTAGATCCGTTTAAACTACGTAAGATCGATCTTGGCAGGATAT
ATTGTGGTGTAAACGTTTCTGCGGCGGTTCGAGATGGATCTTGGCAGGATATATTTGGTGGTAAACGTTTCT

Vector en azul. Polylinker con doble sitio **Eco31I** en negrita (**reconocimiento** fondo amarillo, **corte** subrayado) Secuencias **5' y 3' UTR del CPMV** en verde. Sitios **NotI** y **Apal** sobre fondo amarillo. **Promotor 35S** en rojo con el nucleótido +1 de la transcripción subrayado. **Terminador 35S** en fucsia con sitio de procesamiento y poliadenilación subrayado. **Origen de replicación pUC** mínimo sobre fondo gris con el nucleótido donde empieza la replicación doble subrayado. Marcador de selección **kanamicina** (secuencia complementaria) sobre fondo gris oscuro. **Origen de replicación pSa** sobre fondo gris. **RB** con secuencia **overdrive** (subrayada) sobre fondo amarillo y **doble LB** sobre fondo rojo. En **LacZ'** (cursiva; **la orientación no se ha determinado experimentalmente**): promotor lac sobre fondo dorado. Secuencia de lacZ' en azul. Cebador **directo** subrayado, cebador **reverso** subrayado a puntos. **Promotor T7** sobre fondo azul con nt **+1** y **+2** en amarillo. **Promotor T3** sobre fondo rojo con nt **+1** y **+2** en amarillo. Sitios SacI-KpnI subrayado.

>pGR1-tev-N₁₀₀ [TCC] (4895 pb)

GCGGCCGCGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGAAAAGGAAGGTGGCTCTACAA
ATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCC
ACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTC
CACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTC
TTTGAGAGGTATTAAATCTTAATAGGTTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAAACCGAACCAAACCTTCTTCTA
AACTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACCTTCTCTTTGTCTTTCTTGGTGGACGATCTTCAACGTTGTCAGAT
CGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTTCTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTAGTGC
CGCCATTAATAACGTGTACTTGTCTATTCTTGTGCGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGTGGAGGCTGCT
GTTTACGCCCATAACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTTCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGA
GGTATTGTTGCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTGGTCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTCTTTGAAA
CAGAGTTTTCCCGTGGTTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGAAATGG
AAAAGAATTGTCGTGGAGTGAGAAAAGGTAAGTGGACCAAAGAAGAAGACACTCTCTTGAGGCAATGTATAGAAG
AGTATGGTGAAGGGAATGGCATCAAGTTCACACAGAGCAGGGTGAACCGGTGTAGGAAGAGTTGCAGGCTGA
GGTGGTTGAATTATCTGAGGCCAAATATCAAAGAGGTCGGTTTTTCGAGAGATGAAGTGGACCTAATTGTGAGGC
TTCATAAGCTGTTGGGTAACAAATGGTCGCTGATTGCTGGTAGAATTCCTGGAAGGACAGCTAATGACGTGAAGA
ACTTTTGAATACTCATGTGGGGAAGAATTTAGGCGAGGATGGAGAACGATGCCGAAAAATGTTATGAACACAA
AAACCTAAGCTGACTAATATCGTAAGACCCCGAGCTCGGACCTTCAACGGATTGCAGTTACTTGGCCGAGAG
AAGTCGAAAAACCGATGAATTTCAAATGTCCGGTTAACTGACTGATGAGATTCAGATTCCAGATTGAGAAGCAAACGC
AATTTTACAATGATGTTGCGTCGCCACAAGATGAAGTTGAAGACTGCATTTCAGTGGTGGAGTAAGTTGCTAGAAA
CAACGGAGGATGGGGAATTAGGAAACCTATTTCGAGGAGGCCCAACAAATTTGAAATACTACAGAGAACCTCTACT
TTCAATCAGGTACAAGTAGAAAGGAGAGATGGGTTTTGGATGCCATGGAAGGGAATTTGGTTGCTTGTGGCAAG
CTGACAGCGCGTAGTGACAAAGCATGTGGTTAAAGGAAAATGCCCTTATTTTTTACAATATCTCTCATTGCACA
ATGAAGCAAAACAGTTCTTTGAGCCATTGATGGGGGCATACCAGCCAAGCCGGTTAAATAAAGACGCTTTCAAGA
AAGATTTCTTTAAATACAACAAACCGGTAGTTTTGAATGAAGTTGATTTTAAACGCTTTTCGAGAAAGCAGTTGAGG
GAGTGATAACAATGTAACTCTGGTTTTATTAAATTTTTCTTTAGTTTTGAATTTACTGTTATTCGGTGTGCATTTCT
ATGTTTTGGTGAGCGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTTATTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTT
AGCAGGTGCTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTTCGCTGAAATCACCAGTCTCTCTACAA
ATCTATCTCTCTATTTTTCTCCATAAATAATGTGTGAGTAGTTTTCCCGATAAGGGAAATTAGGGTCTTATAGG
GTTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCTTAGTATGATTTGTATTTGTAAAATACTTCTATCAATAAAA
TTTTTAATTTCTAAAACCAAATCCAGGGGCTCGACGTTTCTTGGACAGGATATATTGGCGGGTAAACTAAGTC
GCTGTATGTGTTTTGTTGAGATCCTCTAGGGCATGCAAGCTGATCTGGATCTCATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAA
AGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAA
ATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCTGGAAGCTCCC
TCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCCTTTCGGGAAGCGTGGCGC
TTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAAC
CCCCGTTCCAGCCCGACCGCTTATCCGGTAACTACTCGTCTTGTAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTAT
CGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGTACAGACTTCTTGAAGT
GGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAA
GAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACACCCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGA
TTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAA
ACTCACGTTAAGGGATTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAA
GTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGTGTAACATTGGTCTAGTGAATTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAA
ACTGCAATTTATTTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAAC

CACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAAC
 CTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGA
 ATGGCAAAAGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTC AACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAAATCACTCG
 CATCAACCAAACCGTTATTTCATTTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAAGGACAAT
 TACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGGCGAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTTACCTGAATCAGGAT
 ATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCTGGGATCGCAGTGGTGGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGA
 TAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACAACAT
 TGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCGGCGCATCGGGCTTCCATACAATCGGTAGATTGTCG
 CACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCG
 GCCTTGAGCAAGACGTTTTCCCGTTGAATATGGCTCAT AACACCCCTTGATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTT
 TTATTGTTTCATGATGATATATTTTTTATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACAACGTGGCTTTGTT
 GAATAAATCGAACTTTTGCTGAGTTGAAGGATCAGATCACGCATCTTCCCACAAACGCAGACCGTTCCCGTGGCAA
 AGCAAAAGTTCAAAATCACCAACTGGTCCACCTACAACAAAGCTCTCATCAACCGTGGCTCCCTCACTTTCTGGC
 TGGATGATGGGGCGATTACAGGC GATCCCCATCCAACAGCCCGCCGTCGAGCGGGCTTTTTTATCCCCGGAAGCCT
 GTGGATAGAGGGTAGTTATCCACGTGAAACCGCTAATGCCCGCAAAGCCTTGATTACGGGGCTTTCCGGCCCCG
 CTCCAAAACCTATCCACGTGAAATCGCTAATCAGGGTACGTGAAATCGCTAATCGGAGTACGTGAAATCGCTAAT
 AAGGTCACGTGAAATCGCTAATCAAAAAGGCACGTGAGAACGCTAATAGCCCTTTCAGATCAACAGCTTGCAAAC
 ACCCCTCGCTCCGGCAAGTAGTTACAGCAAGTAGTATGTTCAATTAGCTTTTCAATTATGAATATATATATCAAT
 TATTGGTCGCCCTTGGCTTGTGGACAATGCGCTACGCGCACCGGCTCCGCCCGTGGACAACCGCAAGCGTTGCC
 CACCGTCGAGCGCCTTTGCCACAACCCGGCGGCCGGCCGCAACAGATCGTTTTATAAATTTTTTTTTTTGAAAA
 AGAAAAAGCCCGAAAGGCGGCAACCTCTCGGGCTTCTGGATTTCGATCCCGGAATTAGATCCGTTTAAACTAC
 GTAAGATCGATCTTGGCAGGATATATTGCTGTAACGTTCTCGCGGGTTCGAGATGGATCTTGGCAGGATAT
 ATTGCTGCTGTAACGTTTCCT

Ros1 en rojo sobre fondo negro, seguido de una secuencia de reconocimiento **NlaPro-a2** del TEV en morado (**sitio de corte** resaltado sobre fondo azul) y **Nib₁₀₀ de WMV-Vera** (300 nt) en negrita con codón de **parada** en granate. **Vector** en azul. Secuencias **5' y 3' UTR del CPMV** en verde. Sitios **NotI** y **Apal** sobre fondo amarillo. **Promotor 35S** en rojo con el nucleótido +1 de la transcripción subrayado. **Terminador 35S** en fucsia con sitio de procesamiento y poliadenilación subrayado. **Origen de replicación pUC** mínimo sobre fondo gris con el nucleótido donde empieza la replicación doble subrayado. Marcador de selección **kanamicina** (secuencia complementaria) sobre fondo gris oscuro. **Origen de replicación pSa** sobre fondo gris. **RB** con secuencia **overdrive** (subrayada) sobre fondo amarillo y **Boble LB** sobre fondo rojo.

>pG53TEV (4631 pb)

GCGGCCGCGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGAAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAA
 ATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCC
 ACCCAGGAGGAGCATCGTGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTC
 CACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTC
 TTTGGAGAGGTTATAAAATCTTAATAGGTTTTGATAAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAAACCTTCTTCTA
 AACTCTCTCTCATCTCTCTTAAAGCAAACCTTCTCTCTTGTCTTTCTTGGTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAGAT
 CGTGCTTCCGCACCAGTACAACGTTTTCTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTGTGGACACGTAGTGGG
 CGCCATTAATAACGTGTACTTGTCTATTCTTGTGCGGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTGTCTGGAGGCTGCT
 GTTCAGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCCGGCGGGTGCAATATCTCTACTTCTGCTTGACGA
 GGTATTGTTGCCTGTACTTCTTTCTTCTTCTTCTTGGCTGATTGGTTCTATAAGAAATCTAGTATTTTCTTTGAAA
 CAGAGTTTTCCCGTGGTTTTTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCTTCTGTATATTCTGCCCAAATTTGAAATGC
 CTAAATCAGCATGTTGTGGCCCTAGAAATTACAATGCTATATCGAGTGTATTGTCATCTCGAACTGAAAAGTG
 ATGGAAATGAAAGAAAAACATTTGGTATCGGATATGGACCATAACATCATTGCCAATCAGCATTTATTTACAAGAA
 ATAATGGCACACTCAAAATTAATCACAACATGGAGAATTCATAATCAAAAATACATGTCAGCTTCAATTAAAGC
 CAATTGATGGAATTGATGTAGTGTCTAATAATTACAAAAGATCATCCACCATTTTCGAGTAAACTTAAATTC
 GAGAGCCTGAAGAGAGGGAGAAAGTTTGCTTAGTGAGTGTGAGTTAACCACAAGCATAACATCGGCATTTGATGT
 CAGAAACATCATTTACATATAATGAAGCAAACTAGATTTTGGAAAGCACTGGATAACAATAAGGAAGGACATT
 GCGGTTTGCCAAATTGTGTCGACGAAGGATGGGTGCGTTTTAGGTATTCACAGTTTATCGGATCAGAAAGAACTCTG
 TTAATACTTCAACAATTCCCTAGCAATTTTCAAGAACTTACTTGTACCAACAATAATGTGATAGAGTGGGCTA
 AGGGATGGAAGCATAACACAGATAACATAGCATGGGGTTCTTAAATCCAAGAAAGATGCACCAGAGACGCTAT
 TTAAACCCTAAATTAATCAGTGACTTGATAAATAGTGTGACATTTCAATAA CTCTGGTTTTCATTAATTTTCT

TTAGTTTGAATTTACTGTTATTTCGGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTTA
TTTTATGTAATTTAATTTCTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTA
ATTTTATTTCGCTGAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTATTTTCTCCATAAATAATGTGTGAG
TAGTTTCCCGATAAGGGAAATTAGGGTCTTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCTTAGTA
TGTATTTGTATTTGTAAAATACTTCTATCAATAAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAATCCAGGGGCCTCGACG
TTCCTTGACAGGATATATTGGCGGGTAAACTAAGTCGCTGTATGTGTTTGGTTGAGATCCTCTAGGGCATGCAAG
CTGATCTGGATCTCATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTT
TCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGAC
TATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGACCTGCCGTTACCGGAT
ACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGT
AGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACT
ATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAG
CGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCCTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTG
GTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCG
CTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGA
TCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAA
GGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGTGTAACATTGGT
CTAGTGAATTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTATCATATCAGGATTATCAATACCATATT
TTTGA AAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATC
GGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCTCGTCAAAAAATAAGGTTATCAAGTG
AGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAAGTGGCAAAAAGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAA
CAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAG
CGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAAACAGGAATCGAATGCAACCCGGCGCAGGAACACTG
CCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACTGGAATGCTGTTTTCCCTGGGATCG
CAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAAATGCTTGATGGTGGGAAGAGGCATAAAATCCGTC
GCCAGTTTGTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACAACATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAAACACTCTG
GCGCATCGGGCTTCCATACAATCGGTAGATTGTGCGACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCCCATTATATACC
CATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTTGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAA
CACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGATGATATATTTTTATCTTGTGCAATGT
AACATCAGAGATTTTGGAGACACAACGTGGCTTTGTTGAATAAATCGAACTTTTGTGAGTTGAAGGATCAGATCA
CGCATCTTCCCGACAACGCAGACCGTTCCGTGGCAAAGCAAAGTTCAAATCACCACCTGGTCCACCTACAACA
AAGCTCTCATCAACCGTGGCTCCCTCACTTTCTGCTGGATGATGGGGCGATTTCAGGCATCCCATCCAACAGC
CCGCCGTCGAGCGGGCTTTTTTATCCCGGAAGCCTGTGGATAGAGGGTAGTTATCCACGTGAAACCGCTAATGC
CCCGCAAAGCCTTGATTCACGGGGCTTTCCGGCCCGCTCCAAAACCTATCCACGTGAAATCGCTAATCAGGGTAC
GTGAAATCGCTAATCGGAGTACGTGAAATCGCTAATAAGGTCACGTGAAATCGCTAATCAAAAAGGCACGTGAGA
ACGCTAATAGCCCTTTCAGATCAACAGCTTGCAAAACACCCCTCGCTCCGGCAAGTAGTTACAGCAAGTAGTATGT
TCAATTAGCTTTTCAATTATGAATATATATATCAATTATTGGTTCGCCCTTGGCTTGTGGACAATGCGCTACGCGC
ACCGGCTCCGCCCGTGGACAACCGCAAGCGGTTGCCACCGTCGAGCGCCTTTGCCACAACCCGGCGGCCGGCC
GCAACAGATCGTTTTATAAATTTTTTTTTTGA AAAAAGAAAAAGCCCGAAAGGGCGCAACCTCTCGGGCTTCTGG
ATTTCCGATCCCGGAATTAGATCCGTTTAAACTACGTAAGATCGATCTTGGCAGGATATATTGTGGTGTAAAG
TTCCTGCGGCGGTGAGATGGATCTTGGCAGGATATATTGTGGTGTAAAGGTTTCT

Vector en azul. Polylinker con doble sitio **Eco31I** en negrita (**reconocimiento** fondo amarillo, **corte** subrayado) Secuencias **5' y 3' UTR del CPMV** en verde. **Promotor 35S** en rojo con el nucleótido +1 de la transcripción subrayado. **Terminador 35S** en fucsia con sitio de procesamiento y poliadenilación subrayado. **Origen de replicación pUC** mínimo sobre fondo gris con el nucleótido donde empieza la replicación doble subrayado. Marcador de selección **kanamicina** (secuencia complementaria) sobre fondo gris oscuro. **Origen de replicación pSa** sobre fondo gris. **RB** con secuencia **override** (subrayada) sobre fondo amarillo y **doble LB** sobre fondo rojo. Secuencia NlaPro en **rosa**.