

MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS

TRABAJO FINAL DE MÁSTER:



Optimización de la técnica de Agroinfección para la producción de proteínas en plantas de *N. benthamiana*

M. Cristina Valero Martínez



Director experimental:

Diego Orzáez Calatayud

En Valencia a 11 de enero de 2016



NOTA DE LA AUTORA:

Este trabajo titulado: “Optimización de la técnica de Agroinfección para la producción de proteínas en plantas de *N. benthamiana*”, que comenzaba allá por 2014 en el laboratorio 2.10 del IBMCP, ha llegado a su fin.

En estas páginas se recogen algo más que explicaciones, resultados y referencias. Es el reflejo de un periodo de enorme aprendizaje, desde cada una de las horas de clase, exámenes y trabajos, hasta todos los días de laboratorio y elaboración de esta memoria. Me siento enormemente satisfecha del conocimiento que me llevo después del intenso esfuerzo que me ha iniciado en el mundo de la investigación.

Quiero hacer un especial agradecimiento a Asun por enseñarme casi todo lo que sé sobre el laboratorio, por ayudarme en mis comienzos y por resolver siempre las dudas que se me planteaban. Gracias a Diego, por su paciencia y por guiarme durante todo este trabajo. Gracias a Julve, a Joan y a Estefanía, por su enorme sentido del compañerismo. Gracias también a Silvia, por intentar poner orden en medio del caos que suele invadirnos. Gracias a mi familia y a mis amigos por haberme hecho más feliz este tiempo. Y por último, gracias a mi misma.

M. Cristina Valero Martínez

Valencia, 11 de enero de 2016

1. Resumen
2. Abstract
3. Introducción
 - 3.1. Plantas biofactoría
 - 3.2. Las plantas como un sistema industrial escalable
 - 3.3. Producción de anti-venenos en planta
 - 3.4. Expresión transitoria en plantas
 - 3.5. Vectores virales
 - 3.6. MagnIcon
 - 3.7. Agroinfección por infiltración
 - 3.8. Agroinfección por spray e inmersión
4. Objetivos
5. Material y Métodos
 - 5.1. Material
 - 5.1.1. Plásmidos
 - 5.1.2. Medios de cultivo
 - 5.1.3. Material vegetal
 - 5.1.4. Medio de Agroinfiltración
 - 5.1.5. Medio de Agroinfección
 - 5.1.6. Toma y análisis de imágenes

5.2. Métodos

5.2.1. Protocolo de Agroinfección

5.2.1.1. Spray con pulverizador eléctrico

5.2.1.2. Spray con pulverizador por presión manual

5.2.1.3. Inmersión

5.2.2. Toma y Procesamiento de imágenes (protocolos)

5.2.3. Cuantificación y purificación de anticuerpos

6. Resultados

6.1. Métodos y herramientas de Agroinfección, para la expresión transitoria en plantas de *N.benthamiana*.

6.2. Ajuste de la OD y de la concentración de surfactante.

6.3. Efecto de la re-agroinfección sobre la expresión transitoria.

6.4. Expresión de un anticuerpo policlonal recombinante.

7. Discusión

8. Conclusiones

9. Bibliografía

1. Resumen

Actualmente, las proteínas utilizadas por la industria farmacéutica se producen, principalmente, en células de mamíferos, insectos y bacterias. Estos sistemas de producción son eficaces, pero la purificación de la proteína producida es cara, lo que la hace inaccesible para muchos países (Walsh, 2014). Por esto, en los últimos años, el uso de las plantas como biofactorías ha ido tomando importancia. Ofrece un sistema escalable, de alta producción de proteínas funcionales, libres de patógenos propios de animales, fáciles de purificar y con un bajo coste en la producción y la purificación (Gleba et al., 2004), (Krenek et al., 2015), (Chen et al., 2015). La rentabilidad del Molecular Pharming se debe a la expresión transitoria de genes y al uso de vectores virales descontruidos. Para la expresión transitoria, las plantas son transformadas mediante un vector bacteriano, *Agrobacterium tumefaciens*, por Agroinfección (Marillonnet et al., 2005). Tradicionalmente, la Agroinfección por infiltración (o Agroinfiltración) a vacío, es el método usado, pero a la vez, puede suponer un problema para la escalabilidad del proceso, debido a las inversiones necesarias en las cámaras de vacío en las que agroinfiltrar una gran cantidad de plantas. Por esto, se estudian nuevas herramientas y procedimientos que permitan una producción rentable, con una mínima inversión (Kwon and Daniell, 2015). En este trabajo hemos querido probar el resultado obtenido con algunas de estas herramientas, como son sprays o la simple inmersión de las plantas en una solución de Agroinfección. Para ello, hemos optimizado la OD₆₀₀ (densidad óptica bacteriana) y la concentración de surfactante (que favorezca la penetración de la solución de Agroinfección en el tejido vegetal). Con todo esto, hemos pretendido obtener una máxima expresión de proteína con un coste, esfuerzo y tiempo, mínimos.

2. Abstract

Nowadays, proteins used by pharmaceutical industry are produced, mainly, in mammal, insect and bacterial cells. These production systems are effective, but produced protein purification is expensive, so it becomes prohibitive for many countries. For this reason, during the last years, plants use as biofactories has gained importance. It offers a scalable system of high functional protein production, it is zoonotic pathogen-free and easy to manipulate and it has a low cost production and purification (Gleba et al., 2004), (Krenek et al., 2015), (Chen et al., 2015). The Molecular Pharming profitability is due to genes transient expression and to the use of deconstructed viral vectors. For the transient expression, the plants are transformed by a bacterial vector, *Agrobacterium tumefaciens*, through Agroinfection (Marillonnet et al., 2005). Traditionally, vacuum infiltration Agroinfection (or Agroinfiltration) is the used method, but, in the same time, it can be a problem for the process scalability because of the required inversions in the vacuum chamber in which a huge quantity of plants is agroinfiltrated (Kwon and Daniell, 2015). In this paper, we wanted to test the result with some of these tools, such as sprays or simple immersion of plants in a agroinfection solution. To do this, we have optimized the OD₆₀₀ (bacterial optical density) and the concentration of surfactant (wich improves solution penetrarion in the vegetal tissue). With all this, we have tried to obtain maximum expression of protein at a minimun cost, effort and time.

3. Introducción

3.1. Plantas biofactoría

El uso de plantas biofactoría o Molecular Pharming consiste en la producción de proteínas recombinantes utilizando la biotecnología de plantas (Stoger et al., 2014). El Molecular Pharming representa la oportunidad de fabricar medicamentos económicamente asequibles y ponerlos a disposición del mercado a escala global. Esto supone el posible acceso de países en vías de desarrollo, a ciertos fármacos, hasta ahora fuera de su alcance (Paul et al., 2011), (Ma et al., 2013).

Es un sistema considerado eficiente frente a otros, como las bacterias, las levaduras o las células de mamíferos (Paul and Ma, 2011). Las ventajas que ofrecen las plantas como biofactorías son:

- Alta producción de proteínas con bajo coste
- La obtención de proteínas de interés, funcionales y libres de patógenos propios de animales
- Fácil purificación de las proteínas obtenidas
- Sistema con potencial para la escalabilidad del proceso de producción

Gracias a estas ventajas, el desarrollo de plantas como biofactorías para la producción de proteínas con usos industriales ha aumentado en los últimos años, pero faltan algunos ajustes antes de que se generalice su uso, como ocurre con otros métodos de producción más utilizados para el mismo fin, como: bacterias, células de ratón, etcétera (Gleba et al., 2007), (Tusé et al., 2014).

3.2. Las plantas como un sistema industrial escalable

Como ya se ha mencionado, las plantas proporcionan un sistema barato y con múltiples ventajas para la producción a gran escala de proteínas recombinantes valiosas (Twyman et al., 2003), (Desai et al., 2010), (Paul et al., 2011).

Los productos biofarmacéuticos que se obtienen con los sistemas de producción actuales son, en muchas ocasiones, prohibitivamente caros y no están al alcance de la gran mayoría de la población mundial. El costo de los medicamentos de proteínas se estimó en \$ 140 mil millones en 2013, lo que supone que supera el PIB de más del 75% de los países de todo el mundo (Walsh, 2014). Esto es debido a su producción en fermentadores que encarecen muchísimo la producción y el coste final, sumado a la purificación, almacenamiento en frío, transporte, una vida útil corta y la necesidad de condiciones de esterilidad en todo el proceso. Gran parte de estos gastos se eliminarían con la producción en plantas. Por ejemplo, ciertos fármacos producidos en plantas podrían administrarse de forma oral, sin necesidad de purificación y facilitando el transporte y almacenamiento (Kwon and Daniell, 2015).

3.3. Producción de anti-venenos en planta

Recientemente, Médicos Sin Fronteras lanzaba una campaña de prensa en la que se sugirió que la interrupción de la producción del Fav-Afrique (Sanofi-Pasteur, Lyon, Francia), uno de los pocos antivenenos eficaces usados en África, daría lugar a innumerables muertes en el continente (Wolf et al., 2011). Esta campaña ha causado pánico en países sub-saharianos ya que se sugiere que la región no será capaz de hacer frente a los 300.000 envenenamientos, 7.000 muertes, y 10.000 discapacidades permanentes, causadas por mordeduras de serpiente al año.

El productor de Fav-Afrique detuvo la producción debido a la caída drástica de las ventas.

Los fabricantes han sabido hacer buenos antivenenos durante décadas. Existen varios antivenenos que cumplen con los requisitos, cada vez más rigurosos, de la producción del suero antiofídico. Los antivenenos deben cumplir varios requisitos, como ser eficaces contra las especies locales, lo suficientemente seguros para su uso en centros de salud mal equipados, fisicoquímicamente estables (para soportar el transporte y almacenamiento en territorio africano) y de fácil acceso para los pacientes, que son,

por lo general, las personas que viven en las zonas rurales con pocos recursos y poco apoyo financiero (Chippaux et al., 2015).

En el laboratorio 2.10 del IBMCP se está poniendo a punto la producción de antivenenos para la picadura de algunas serpientes como *Bothrops asper*. A partir de un Working Cell Bank mejorado por Phage Display se ha obtenido un Bulk de anticuerpos frente a serpientes. La producción de este Bulk de anticuerpos en plantas, se utilizará para probar la eficacia de los parámetros ajustados en este trabajo para optimizar el proceso de agroinfección.

3.4. Expresión transitoria en plantas

Para el uso de plantas como biofactorías, la expresión transitoria es una herramienta clave. La expresión transitoria se define como un proceso rápido, que consiste en la expresión de ciertos genes, que no han tenido que integrarse previamente en el genoma de la planta. Ofrece ciertas ventajas con respecto a la transformación estable o nuclear de la planta. Una transformación nuclear estable de la planta, implica introducir los genes a expresar en el genoma nuclear de la misma. Por tanto, la expresión transitoria, es más rápida que la transformación estable (Twyman et al., 2003), (Geisse et al., 2012), (Krenek et al., 2015).

Las herramientas clave para la expresión transitoria en plantas son: los genes transmitidos por *Agrobacterium* y la amplificación transitoria basada en vectores virales. En ambos casos, la expresión se basa en que un vector, ya sea una bacteria y/o un virus, sean los que transmitan el transgen sin necesidad de la integración estable del mismo. La ventaja más obvia del sistema es la velocidad ya que la expresión de la proteína de interés en las hojas de las plantas agroinfiltradas es de 3-4 días (Gleba et al., 2005), (Lacroix et al., 2013), (Krenek et al., 2015).

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria de tipo gram negativa, en su forma salvaje es un fitopatógeno que produce tumoraciones en las raíces de las plantas (Wolterink-van Loo et al., 2015).

La estrategia usada por esta bacteria consiste en suministrar DNA o T-DNA a la célula del huésped, una planta, y este material de la bacteria se inserta en el genoma del huésped infectado. Esa capacidad de *Agrobacterium* para transmitir su propio DNA al genoma de la planta se debe al plásmido *Ti* (Tumor Inducing), sin ese plásmido la bacteria ni puede infectar a la planta, ni puede provocar tumores en la raíz de la misma. Pero si recupera el plásmido *Ti*, recupera de nuevo su virulencia. Dentro del plásmido *Ti* hay dos regiones esenciales para provocar el desarrollo de tumoraciones, la región formada por los genes del T-DNA y la región con los genes *vir* de virulencia.

La expresión transitoria, además de ser una estrategia rápida y flexible, no está influida por efectos de posición, previniendo los efectos negativos que la proteína recombinante pudiera generar durante el desarrollo de la planta. La expresión transitoria, al no ser una modificación genética permanente, es una ventaja en términos de bioseguridad (Wolterink-van Loo et al., 2015), (Vinogradova et al., 2015), (Krenek et al., 2015b).

3.5. Vectores virales

La expresión transitoria de proteínas mediante vectores víricos tradicionalmente ha consistido en la inoculación de la planta con virus recombinantes, que contienen las secuencias que se desean expresar en la planta, bajo el control de promotores fuertes (Fischer et al., 1999).

El sistema viral ofrece una gran ventaja, aprovecha que el virus usado como vector se replica en el citoplasma (Pogue et al., 2010). Una de las mayores ventajas del uso de vectores virales es la rapidez. Además, aumenta la eficacia de la expresión. Tanto la rapidez como la eficiencia son dos parámetros realmente deseables para la escalabilidad del proceso a nivel industrial.

Las ventajas que ofrecen los vectores virales, frente a otras actuaciones como la transformación estable son:

- Alta velocidad de expresión
- Alto rendimiento
- Bajo coste, una vez que cuentas con vectores fiables
- Fácil escalabilidad del proceso

Los vectores virales deben tener una expresión comparable a la que tendría la proteína de cubierta (la proteína viral más abundante) de un virus de tipo salvaje. También es importante la proteína de movimiento del virus, que le da la capacidad de movimiento célula-célula y sistémico (Gleba et al., 2004).

Uno de los problemas que pueden presentarse al usar vectores virales son los mecanismos que tiene la planta para defenderse frente a la infección por virus. Sin embargo, se han desarrollado protocolos para inhibir la capacidad de las plantas de silenciar virus y vectores virales. La estrategia consiste en silenciar, o sobre-expresar, los genes de la planta que están relacionados directa, o indirectamente, con la capacidad de la planta hospedadora de combatir la infección viral (Gleba et al., 2004).

Los niveles de expresión de proteínas en plantas usando vectores virales, como el TMV, son mucho mayores que los niveles que se pueden obtener usando solo promotores de plantas, esto les hace clave en la producción, a gran escala, de proteínas en plantas (Lindbo et al., 2007).

3.6. MagIcon

La compañía alemana Icon Genetics, desarrolló un sistema de expresión que tiene como base la estrategia del virus deconstruido. El proceso se llama 'MagInfection', el protocolo a seguir es sencillo y fácil de escalar. Este sistema utiliza la transformación transitoria basada en vectores virales, por su capacidad de amplificación e infección sistémica de la planta, para la expresión de proteínas heterólogas (Marillonnet et al., 2004), (Gleba et al., 2005).

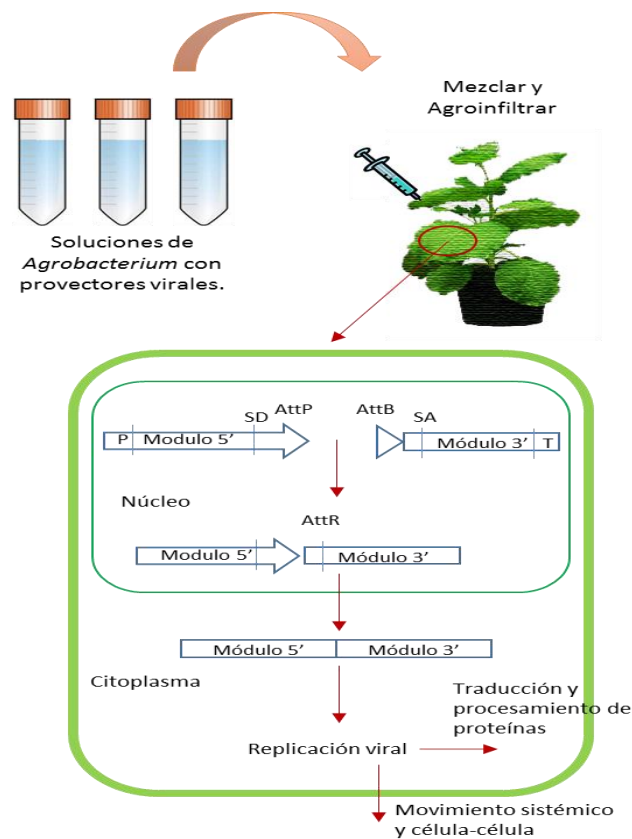
Esta tecnología consiste, a grandes rasgos, en la infiltración de plantas maduras con una suspensión de *Agrobacterium* que contiene un T-DNA que codifica ciertos replicones de

RNA. En este proceso, las bacterias tienen como funciones la infección primaria y el movimiento sistémico, mientras que el vector viral tiene las funciones de propagación célula a célula (o de corta distancia), la amplificación y el alto nivel de expresión. Se combinan de esta manera tres sistemas biológicos que son: la eficiencia del vector viral y la capacidad de *Agrobacterium* de transmitir transgenes, la velocidad y los niveles de expresión de un virus, y el bajo coste de producir proteínas en plantas (Gleba et al., 2005).

Por tanto, el sistema MagIcon resulta un sistema de expresión transitoria de proteínas recombinantes en plantas simple, robusto, barato, versátil y eficiente. Está basado en la utilización de un vector vírico derivado del TMV. Con un sistema modular que permite hacer un ensamblaje, *in vivo*, de la construcción de interés. La estrategia consiste en deconstruir y reconstruir el vector viral de RNA para tener más versatilidad y eficiencia. La modularidad permite hacer numerosas combinaciones de genes-vector, que pueden ser probadas sin necesidad de hacer cada construcción de forma individual. Gracias a esto, es posible dirigir proteínas a diferentes compartimentos subcelulares o fusionarlas a reporteros diferentes y otras muchas posibilidades. Destaca su rapidez, permitiendo la expresión del gen de interés 3-4 días post-infección. Es decir, alcanza la velocidad de los sistemas procariotas, pero con las modificaciones post-traduccionales eucariotas (específicas de la planta) (Marillonnet et al., 2004).

Puesto que es un sistema modular, el ensamblaje de la construcción de interés se produce *in vivo*. Cada amplicón vírico está deconstruido en dos fragmentos el 5' y el 3', ambos introducidos en el T-DNA de los respectivos vectores binarios bajo el control de promotores constitutivos. Estos dos fragmentos están flanqueados por una secuencia attB que permite su fusión en presencia de una integrasa. Las construcciones finales se ensamblan mezclando dos o más cultivos de *Agrobacterium*. La independencia de los módulos permite un rápido desarrollo y optimización de todos los casetes de expresión (Marillonnet et al., 2004).

Esquema general del Sistema MagIcon:

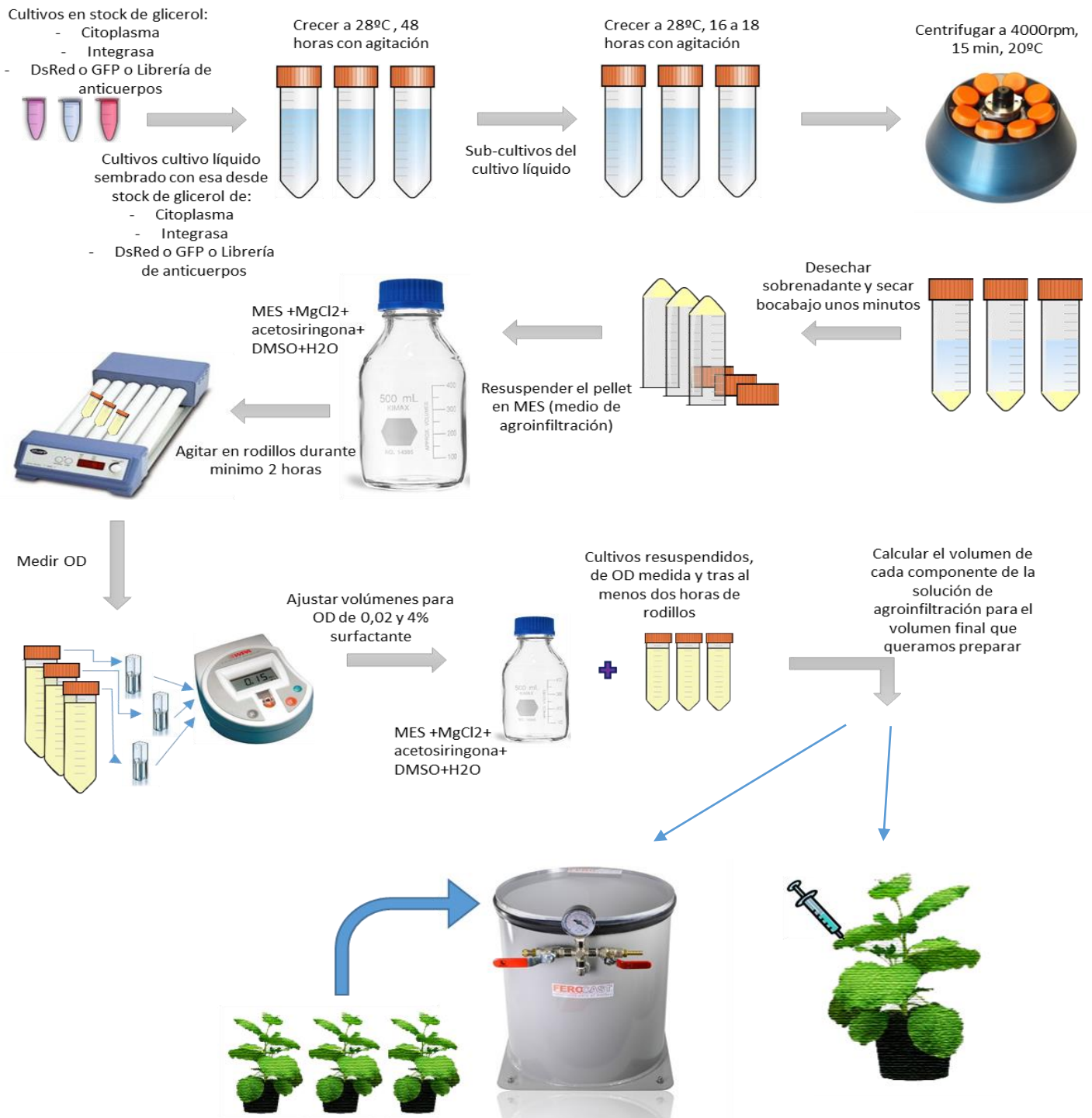


Esquema 1: Representación general del Sistema MagIcon

3.7. Agroinfección por infiltración (clásica)

Una limitación de MagnIcon y otros sistemas similares es la escalabilidad. Para que la agroinfección funcione de forma eficiente es necesario hacer llegar a la bacteria al mayor número posible de células de la planta, y para ello se infiltran las plantas con una suspensión de *Agrobacterium*. A este proceso se le llama Agroinfección por infiltración (agroinfiltración), consiste en la introducción en el apoplasto de la solución de *Agrobacterium*. A pequeña escala esto se consigue fácilmente inyectado a presión la suspensión con una jeringa, aprovechando como zonas de entrada los estomas o las pequeñas heridas provocadas durante el proceso. A media escala y también a escala industrial, la agroinfiltración se consigue sumergiendo las plantas en posición invertida en tanques de vacío que contienen la suspensión de *Agrobacterium*. Tras la rotura del vacío, se produce una diferencia de presión que facilita la entrada de la suspensión de *Agrobacterium* en los espacios intercelulares, facilitando así la infección y la

transferencia del T-DNA a toda la planta. Este sistema, aunque eficiente, limita la escalabilidad y aumenta los costes por la necesidad de equipamiento especializado y los requerimientos operacionales que requiere el vacío a gran escala. Lo que aquí llamamos Agroinfección por infiltración clásica, consiste en la infiltración (o introducción en el apoplasto), de la solución de *Agrobacterium*, usando jeringa o cámara de vacío.

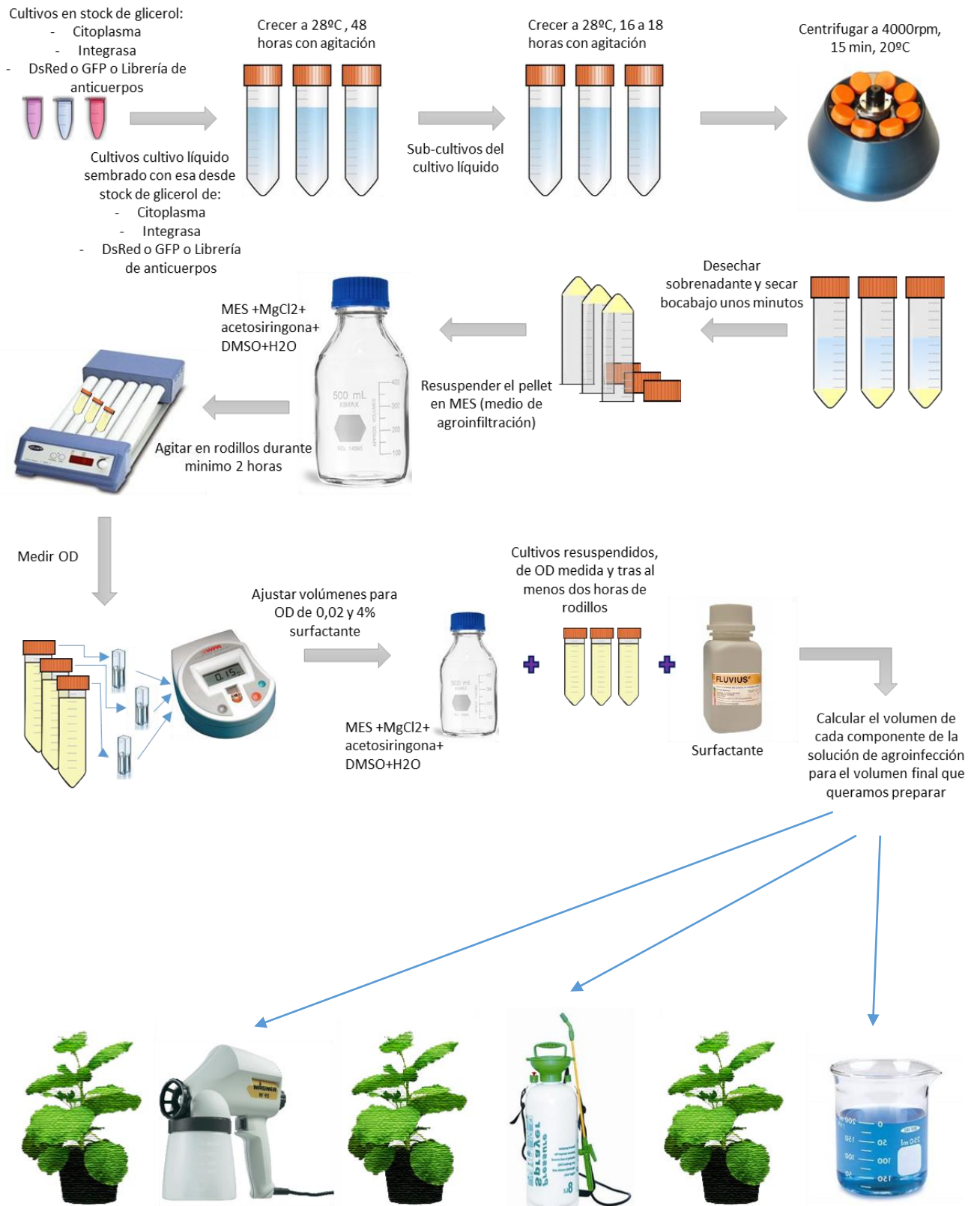


Esquema 2: Representación de los pasos a seguir en la *Agroinfiltración* a vacío (en cámara de vacío o con jeringa) de plantas de *N. benthamiana*

3.8. Agroinfección por spray e inmersión

Recientemente se han propuesto sistemas de Agroinfección alternativos a la Agroinfiltración para aumentar la escalabilidad del proceso. Una alternativa es la Agroinfección por contacto (spray o inmersión), que se diferencia de la Agroinfiltración (o Agroinfección por infiltración) en que, mientras que en la Agroinfiltración se introduce el líquido en los espacios intercelulares de la hoja, en la Agroinfección por spray o inmersión (sin infiltración), la solución se aplica sobre la hoja, y con ayuda de un surfactante, penetra a través del tejido vegetal. Estos sistemas resultarían mucho más escalable, sin embargo requiere optimización y evaluación para comprobar su rendimiento y evaluar si la mayor escalabilidad compensa su menor rendimiento.

En este trabajo se tratará de evaluar la eficiencia de sistemas de Agroinfección alternativos a la Agroinfiltración a vacío, concretamente la “Agroinfección por spray” y la “Agroinfección por inmersión”. Como primera aproximación, se ensayará el efecto de distintos parámetros (surfactantes, concentración de *Agrobacterium*) en la eficacia de la Agroinfección mediante el uso de proteínas fluorescentes. El uso de estas proteínas permitirá evaluar la eficiencia de agroinfección mediante análisis de imagen, sin necesidad de llevar a cabo extracciones de tejido. Posteriormente se utilizarán los mejores parámetros para ensayar la producción de un lote de antivenenos recombinantes. En el laboratorio 2.10 del IBMCP se está poniendo a punto la producción de antivenenos para la picadura de algunas serpientes como *Bothrops asper*. A partir de un Working Cell Bank mejorado por Phage Display se ha obtenido un Bulk de anticuerpos frente a serpientes. La producción de este Bulk de anticuerpos en plantas, se utilizará para probar la eficacia de los parámetros ajustados en este trabajo para optimizar el proceso de agroinfección.



Esquema 3: Representación de los pasos a seguir en la *Agroinfección* (con pistola de pulverización eléctrica, con pulverizador por presión manual, por inmersión en la solución de agroinfección) de plantas de *N. benthamiana*

4. Objetivos

- Comprobar la eficacia de diferentes estrategias para la Agroinfección de las plantas, sin recurrir a la Agroinfección clásica por infiltración.
- Optimizar parámetros de densidad óptica, concentración de surfactante óptimas y sucesión de agroinfecciones para obtener una buena expresión con el mínimo de recursos invertidos.
- Producir y cuantificar el rendimiento de un anticuerpo policlonal recombinante utilizando las condiciones óptimas obtenidas en los Objetivos 1 y 2.

5. Material y Métodos

5.1. Material

5.1.1. Plásmidos

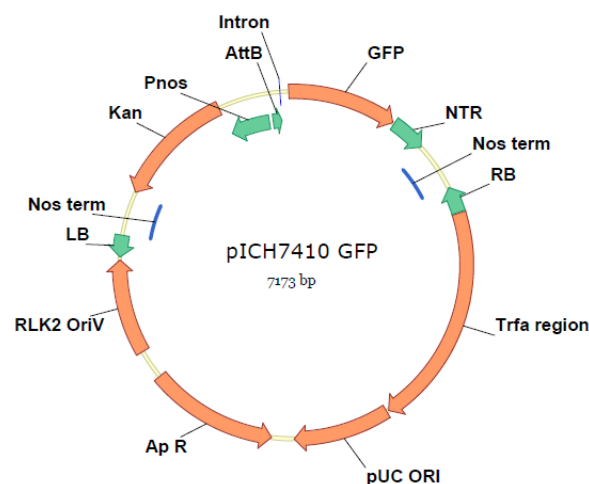
pICH17388 – Citoplasma – de Icon Genetics

pICH14011 – Integrasa – de Icon Genetics

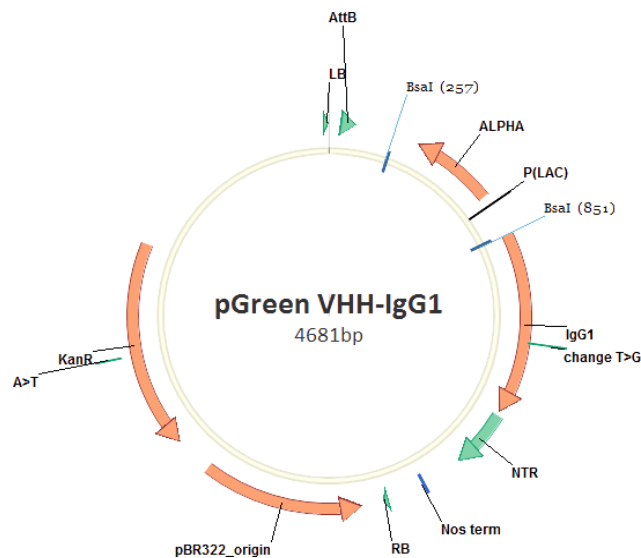
pICH7410-GFP de Icon Genetics (módulo 3')

pICH7410-DsRed (a partir de pICH7410-GFP de Icon Genetics)

pGREEN VHH-IgG1



Esquema 4: Plásmido pICH7410-GFP, del módulo 3' del sistema provector MagnICON



Esquema 5: Plásmido pGreen VHH-IgG1

5.1.2. Medios de cultivo

Los cultivos de *Agrobacterium*, que contenían cada módulo, se crecieron a partir de stock de glicerol. Se sembró con asa, cada módulo por separado, en medio de cultivo LB con $1\mu\text{/ml}$ de Rifampicina ($50\mu\text{g/ml}$) y $1\mu\text{/ml}$ de Carbenicilina ($50\mu\text{g/ml}$). Los cultivos se crecieron, primero durante 72 horas a 28°C y en un agitador. Después fueron subcultivados en medio LB con $1\mu\text{/ml}$ de Rifampicina, $1\mu\text{/ml}$ de Carbenicilina y $10\mu\text{/ml}$ del cultivo. Se crecieron durante 16 a 18 horas overnight, a 28°C , en agitador.

Los cultivos se precipitaron por centrifugación, en tubos Falcon, a 4000rpm , 20°C , $15'$. El sobrenadante fue desechado y el pellet fue resuspendido en medio MES con acetosiringone y DMSO. La proporción utilizada para resuspender es de 1 parte de MES por cada 3 partes de cultivo centrifugado (por ejemplo, 15 ml de cultivo centrifugado se resuspendieron en 5 ml de MES).

5.1.3. Material vegetal

Plantas de *Nicotiana benthamiana* de 45 a 60 días. Crecidas en fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a una temperatura de 22 a 25°C.

5.1.4. Medio de Agroinfección por infiltración

10mM MES pH 5,6, preparado a partir de MES monohidratado ($C_6H_{13}NO_4S \cdot H_2O$) con peso molecular 213,2 g/mol y un 99% de pureza.

10mM $MgCl_2$, preparado a partir de Cloruro de Magnesio 6-hidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) con peso molecular 203,3 g/mol y un 99% de pureza.

1M Acetosiringona (3',5'-Dimetoxi-4'-hydroxy-acetophenone, $C_{10}H_{12}O_4$) con peso molecular 196,2 g/mol y un 97% de pureza.

1m/l DMSO (Dimetil sulfoxido, C_2H_6OS) con peso molecular de 78,13 g/mol y un 99,9% de pureza.

*Para 1 litro de MES: 100ml de MES 10x + 10ml de $MgCl_2$ 100x + 39,24mg de acetosiringona + 1ml de DMSO + 889 ml de H_2O MiliQ.

5.1.5. Medio de Agroinfección sin infiltración (spray y/o inmersión)

100mM MES, preparado a partir de MES monohidratado ($C_6H_{13}NO_4S \cdot H_2O$) con peso molecular 213,2 g/mol y un 99% de pureza.

1M $MgCl_2$, preparado a partir de Cloruro de Magnesio 6-hidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) con peso molecular 203,3 g/mol y un 99% de pureza.

1M Acetosiringona (3',5'-Dimetoxi-4'-hydroxy-acetophenone, $C_{10}H_{12}O_4$) con peso molecular 196,2 g/mol y un 97% de pureza.

1m/l DMSO (Dimetil sulfoxido, C_2H_6OS) con peso molecular de 78,13 g/mol y un 99,9% de pureza.

Surfactante Fluvius (Poliéter-triloxano al 19,5% y Poliéter-siloxano al 80,5%), en formato líquido.

*Surfactente, es una sustancia

*Para 1 litro de MES: 100ml de MES 10x + 10ml de $MgCl_2$ 100x + 39,24mg de acetosiringona + 1ml de DMSO + 889 ml de H_2O MiliQ + Fluvius (volumen variable según experimento)

5.1.6. Herramientas de Agroinfección

Para spray con pulverizador eléctrico, se utilizó una pistola eléctrica Wagner w95.

Para spray con pulverizador manual, se utilizó un pulverizador de carga por presión manual con rociador de mano manual, de 3 litros de capacidad.

Para la inmersión, se utilizó un vaso de precipitado, de cristal, de 600ml de capacidad.

5.1.7. Toma y análisis de imágenes

Para la toma de imágenes se usó una cámara fotográfica Nikon d90 con objetivo 18-105mm, filtro fotográfico rojo, trípode.

Como estudio se usó una caja forrada de cartulina negro mate con 3 aperturas en la parte superior. Lámpara Led con bombillas color verde, lámpara UV Spectroline BIB-150p.

Para procesar las imágenes: Photoshop versión CS6, y FIJI.

5.2. Métodos

5.2.1. Protocolo de Agroinfección con spray e inmersión

Los cultivos de *Agrobacterium* se obtuvieron de stock de glicerol y fueron cultivados durante 40-48 horas en 5ml de medio LB con rifampicina (50µg/ml) y carbenicilina (50µg/ml), a 28°C. A partir de ese cultivo líquido (7,5 µl de cultivo líquido/ml de LB), se preparó un sub-cultivo en LB con rifampicina (50µg/ml) y carbenicilina (50µg/ml) que fue crecido durante 16 a 18 horas, a 28°C. Al día siguiente, los cultivos se recuperaron por centrifugación a 4000rpm, durante 15 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido en medio de infiltración previamente preparado (3ml de medio de infiltración/ml de cultivo centrifugado). Se incubó a temperatura ambiente en agitación suave durante un mínimo de 2 horas. Pasado dicho periodo, los cultivos fueron combinados ajustándose a la OD y el volumen final deseado en cada experimento. Se agroinfiltró esta solución con jeringa sin aguja.

Para llevar a cabo la agroinfección, se añadió además una sustancia surfactante (silwet o fluvius), en diferentes concentraciones según el experimento llevado a cabo.

5.2.1.1. Spray con pulverizador eléctrico

Para la agroinfección basada en spray con pulverizador eléctrico, se vertieron 600ml de medio de agroinfección en el depósito de la pistola eléctrica utilizada. Seguidamente, se rociaron las plantas durante 10-12 segundos por la cara axial de la hoja. Se esperó unos minutos hasta que se absorbiera el líquido y se repitió la operación.

5.2.1.2. Spray con pulverizador por presión manual

Para la agroinfección basada en spray con pulverizador por presión manual, se vertieron 2 litros de medio de agroinfección en el depósito del pulverizador. Seguidamente, se presurizó mediante la bomba manual del pulverizador. Se rociaron las plantas durante 10-12 segundos por la cara axial y abaxial (gracias a la inclinación del dispensador del spray) de la hoja. Se esperó unos minutos hasta que se absorbiera el líquido y se repitió la operación.

5.2.1.3. Inmersión

Para la agroinfección basada en inmersión, se vertieron 600ml de medio de agroinfección en un vaso de precipitado de 600ml. Se cubrieron las plantas con goma espuma. Seguidamente se sumergieron en la solución durante 10s, se sacaron de la solución y volvieron a introducirse, otros 10s (para favorecer el efecto de penetración de la solución con ayuda del surfactante).

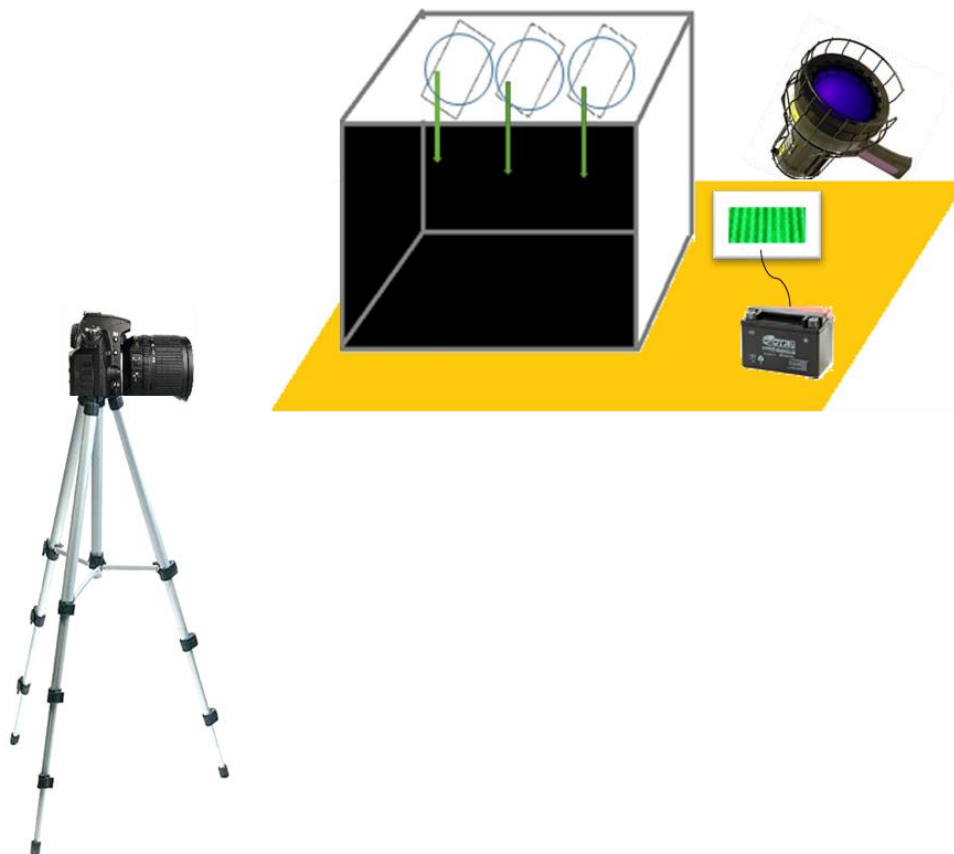
5.2.2. Toma y Procesamiento de imágenes: Protocolos

Para la toma de imágenes se desarrolló un proceso estándar y, por tanto, reproducible a cada sesión fotográfica correspondiente a cada experimento.

Para tomar las fotos se preparó una caja que hacía la función de estudio fotográfico. Esta presentaba tres aperturas en la parte superior del tamaño de la lámpara de Led. La lámpara de Led de color verde se utilizó para excitar el rojo expresado por la proteína reportera DsRed, después el color rojo brillante se capta gracias a un filtro fotográfico rojo. Se cortaron las hojas de todas las plantas fotografiadas, estas hojas se extendieron en la caja.

El objetivo de esta disposición fue que todas las hojas recibieran la misma iluminación y se captara con mayor exactitud el área total. Era importante captar con precisión el área ya que la relacionamos, en este trabajo, directamente con la expresión y producción de proteínas.

Como se muestra en el dibujo, la caja está forrada de cartulina negra mate, tiene tres aperturas en la parte superior para colocar la lámpara de Led verde. Para cada tanda de hojas, correspondientes a una planta, se tomaron 3 fotografías, una por cada posición de la lámpara (posteriormente las 3 imágenes se superponen para tener 1 sola imagen). La cámara siempre colocada en la misma posición sobre un trípode y con distancia focal 50mm.



Esquema 4: representación del estudio fotográfico para la toma de imágenes de la expresión de las proteínas reporteras (DsRed y GFP).

Para tomar las fotografías correspondientes a la expresión de GFP, se utilizó el mismo sistema, sólo con pequeños cambios. Se usaron las aperturas redondas de la caja, ya que la lámpara UV usada tenía forma redonda. Y este caso no se usó filtro fotográfico. La posición de la cámara y la distancia focal se mantuvieron en la misma posición que para captar la expresión de DsRed.

Las fotos, en ambos casos, se tomaron en una sala sin luz.

Para cada tanda de hojas, correspondientes a cada planta, se tomó una fotografía con luz normal para medir el área total. Después, en oscuridad, se tomaron 3 fotografías, una por cada posición de la lámpara. Para captar DsRed, con lámpara Led de color verde y filtro de fotografía rojo. Para GFP, con lámpara UV y sin ningún filtro fotográfico.

- **PROTOCOLO ADOBE PHOTOSHOP CS6: PREPARACIÓN DE ÍMAGENES PARA FIJI**

- Para el área total de las hojas de cada planta.

El primer paso es grabar una macro para repetir el proceso más rápidamente. Una macro es un recurso que sirve para agrupar una serie de operaciones o acciones en un mismo orden y poder reproducirlas posteriormente sobre otra imagen.

Los pasos son los siguientes:

1. Abrir Photoshop, ventana-acciones, nueva acción, grabar las acciones.
2. Procedemos a grabar las acciones que son: crear capa, blanco y negro, hacer blancos los verdes (para queda muy blanca la hoja y muy negro el fondo)
3. Una vez están todas las acciones: pulsar stop en el menú grabar acciones.
4. Comprobar que las acciones se ejecutan correctamente y guardar la imagen para medir el área con FIJI.

- ✓ Para cargar todas las imágenes de una sesión y ejecutar las acciones en un solo paso:

1. Habría que abrir las imágenes en pila, de la siguiente manera: Archivo> secuencia de comandos> cargar archivos en pila> archivos> explorar > seleccionar archivos> resultado
2. Una vez ejecutada la acción: hacer click sobre la acción play, para que se reproduzca en la pila de imágenes el tratamiento que ya habíamos grabado en la primera imagen.



Ejemplo 1: fotografía de las hojas de una planta, después del tratamiento con Photoshop, para medir el área total de las mismas

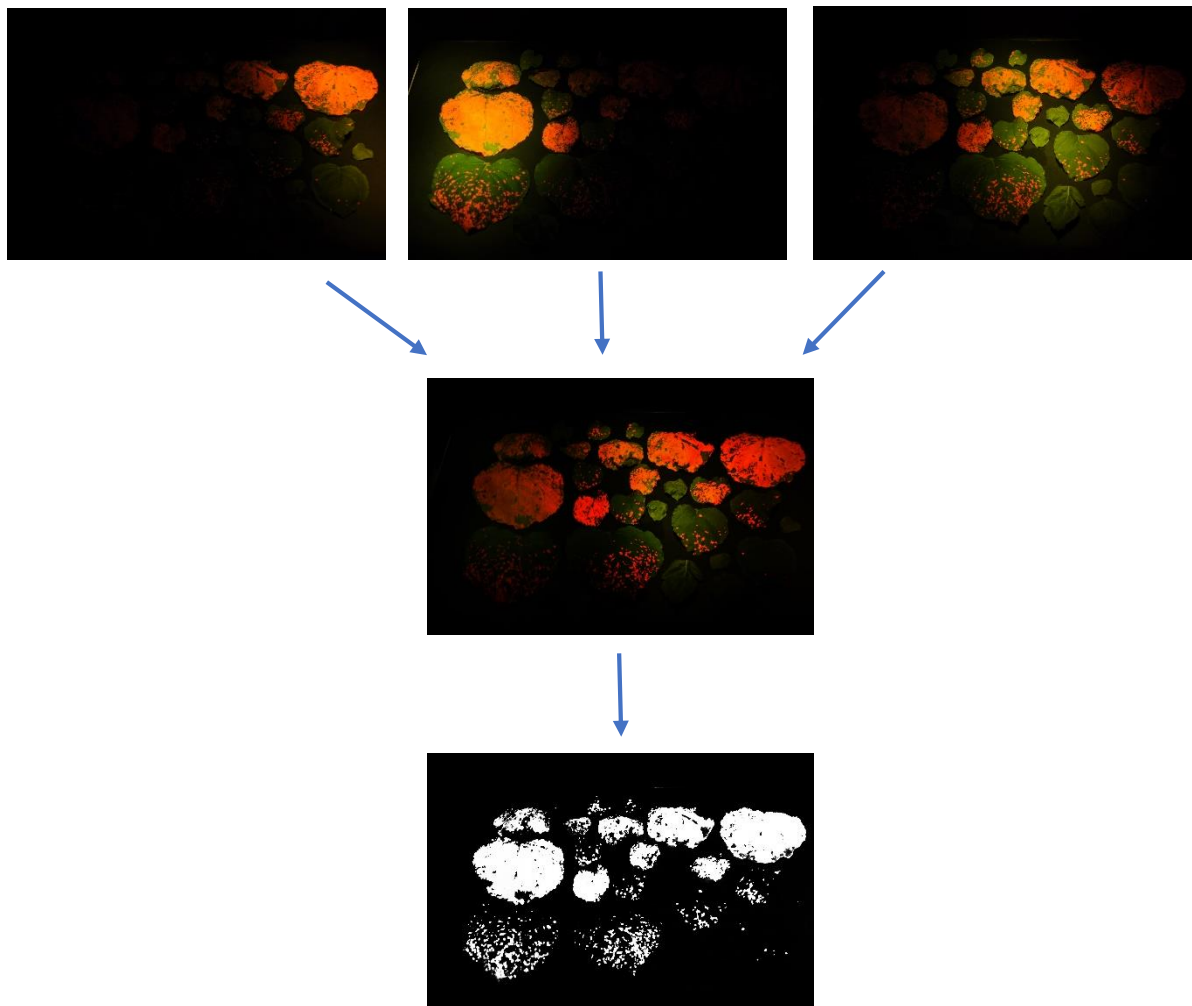
- Para el área en la que se expresa DsRed en las hojas de cada planta.

Para medir el área en la que se expresa DsRed, tenemos 3 imágenes por plante, por lo que estas fueron combinadas para obtener una sola imagen que pueda ser procesada en FIJI.

El primer paso, de nuevo, es grabar una macro para repetir el procesado de estas imágenes más rápidamente.

Los pasos son los siguientes:

1. Abrir Photoshop, ventana-acciones, nueva acción, grabar las acciones.
2. Procedemos a grabar las acciones que son: seleccionar las 3 fotos correspondientes a cada planta, arrastrarlas hasta Photoshop. La fotografía de base será la tomada con la luz en el centro de la caja y sobre esta se superponen las fotografías tomadas con la lámpara a izquierda y a derecha. Ajustar al 30% la opacidad de las dos capas superiores. Acoplar las 3 imágenes. En este momento ya contamos con una sola imagen.
3. Crear capa, blanco y negro, hacer blancos los rojos y negros el resto de colores (para queda muy blanca la zona de la hoja en la que se expresa DsRed y muy negro el fondo)
4. Una vez están todas las acciones: pulsar stop en el menú grabar acciones.
5. Comprobar que las acciones se ejecutan correctamente y guardar la imagen para medir el área con FIJI.



Ejemplo 2: fotografía de las hojas de una planta (bajo luz verde y tomadas con filtro rojo), después del tratamiento con Photoshop, para medir el área de expresión de DsRed.

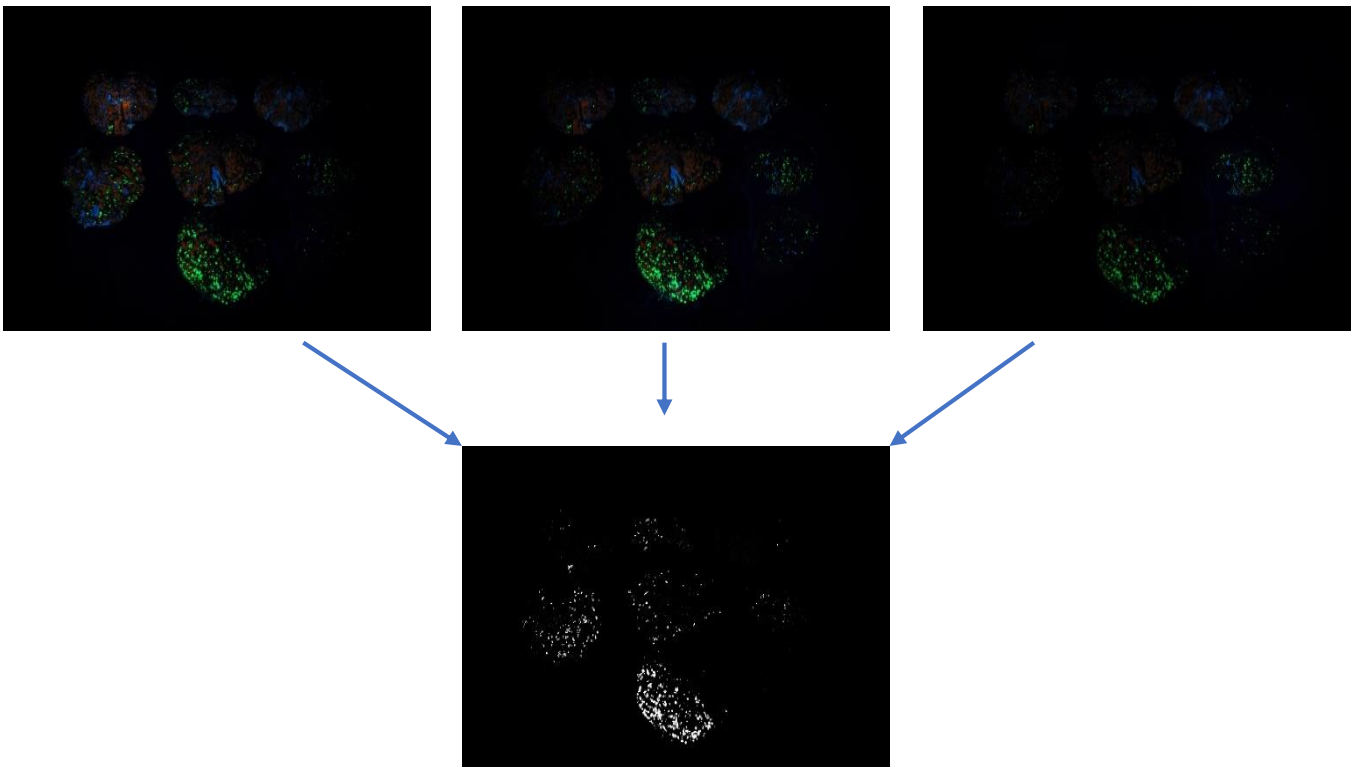
- Para el área en la que se expresa GFP en las hojas de cada planta.

Para medir el área en la que se expresa GFP, tenemos 3 imágenes por planta, por lo que estas fueron combinadas para obtener una sola imagen que pueda ser procesada en FIJI.

El primer paso, de nuevo, es grabar una macro para repetir el procesado de estas imágenes más rápidamente.

Los pasos son los siguientes:

1. Abrir Photoshop, ventana-acciones, nueva acción, grabar las acciones.
2. Procedemos a grabar las acciones que son: seleccionar las 3 fotos correspondientes a cada planta, arrastrarlas hasta Photoshop. La fotografía de base será la tomada con la luz en el centro de la caja y sobre esta se superponen las fotografías tomadas con la lámpara a izquierda y a derecha. Ajustar al 30% la opacidad de las dos capas superiores. Acoplar las 3 imágenes. En este momento ya contamos con una sola imagen.
3. Crear capa, blanco y negro, hacer blancos los verdes y negros el resto de colores (para queda muy blanca la zona de la hoja en la que se expresa GFP y muy negro el fondo)
4. Una vez están todas las acciones: pulsar stop en el menú grabar acciones.
5. Comprobar que las acciones se ejecutan correctamente y guardar la imagen para medir el área con FIJI.



Ejemplo 3: fotografía de las hojas de una planta (tomadas con lámpara UV), después del tratamiento con Photoshop, para medir el área de expresión de la proteína fluorescente GFP.

- **PROTOCOLO PARA MEDIR EL ÁREA CON FIJI (UN PROGRAMA DE IMAGE J)**

La imagen es parte fundamental en la obtención de datos numéricos. En los últimos años, con la adopción de las tecnologías de microscopía automatizados, el volumen y la complejidad de los datos de imagen se ha incrementado hasta el punto de que ya no es factible extraer información sin utilizar el ordenador, la informática y diferentes softwares. El análisis de imágenes computarizado supera las limitaciones y sesgos del observador humano y en muchas cosas lo complementa. Generalmente la informática se usa para procesar imágenes generadas en microscopía de gran número y variedad de muestras biológicas, bajo diferentes condiciones, en alta resolución. Algunas de las cosas que permiten hacer, pueden ser, reconstruir el volumen a partir de un conjunto de imágenes planas que se superponen, seguir ciertos elementos en el espacio y el tiempo o comparar muestras.

El procesamiento de imagen se desarrolló pensando en el arte pero después se ha adaptado y aplicado a la biología. En la actualidad son diversas las plataformas, tanto de pago como libres, que cubren las necesidades del procesamiento de imágenes generadas en el campo de la biología y dirigidas a usuarios que puedan tener baja experiencia en el campo de la imagen, la fotografía, así como su procesamiento.

En este caso nos hemos decantado por la plataforma libre ImageJ. Esta herramienta es destacable porque fue desarrollada principalmente por biólogos y para biólogos. Esto hace que no siga la arquitectura convencional de otros software dirigidos a otras disciplinas.

A partir de ImageJ desarrollaron el software de código abierto FIJI, que actualiza la arquitectura de ImageJ, permite analizar grandes paquetes de imágenes en poco tiempo, permite que los usuarios comuniquen sus necesidades y estas sean incorporadas en nuevas versiones, por lo que los biólogos pueden modificarlo para cubrir las necesidades de la investigación (Schindelin et al., 2012)

- 1.1 Abrir la carpeta que contiene las imágenes que a analizar.
- 1.2. Abrir el programa, FIJI.

1.3. Seleccionar las imágenes en la carpeta, arrastrar la selección al interior de la ventana de FIJI.

1.4. Todas las imágenes quedaran abiertas en FIJI.

1.5. En ese momento, pulsar: Plugins>>Macros>>Record (se abrirá una nueva ventana en la que grabar las acciones deseadas), las acciones seguidas quedaran grabadas y podrán repetirse cuando se desee.

Pasos a seguir:

A. Image>>stacks>>images to stacks>>name>>stacks>>ok

B. Analyze>>set scale>>know distance: 50mm/unit of measurement:mm/global(check)

Para analizar el área de expresión de DsRed, GFP u otra proteína fluorescente:

Analyze>>set scale>>know distance: 20mm/unit of measurement:mm/global(check)

C. Image>>Type>>8bit

D. Process>> Binary>> Make Binary

E. Analyze>> Analyze particles >> mínimo size: 50 / show outlines/ Display Results/Summarize

F. Para analizar el área de expresión de DsRed, GFP u otra proteína fluorescente:

Analyze>> Analyze particles >> mínimo size: 20 / show outlines/ Display Results/Summarize

G. Guardar los resultados en la carpeta que corresponda.

1.6. Todas las acciones habrán sido grabadas. Guardar la Macro con un nombre reconocible para volver a utilizarlo cuando sea necesario.

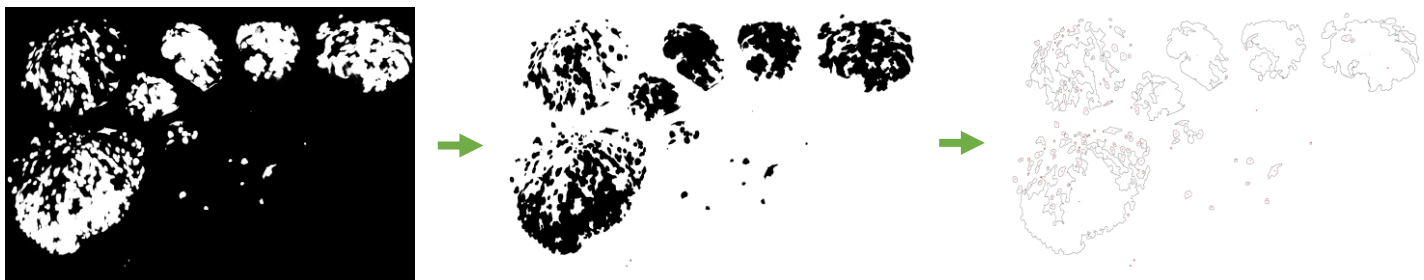
1.7. Para repetir el análisis con otras imágenes que requieren un análisis de iguales características, repetir los pasos 1.1, 1.2, 1.3, 1.4. Después, pulsar Plugins>>Macros>>Install>> El Macro en el que se ha grabado una determinada acción.

De nuevo: Plugins>>Macros>> El Macro en el que se ha grabado una determinada acción.

Cuando se haga dicha selección, todas las acciones que fueron grabadas se reproducirán sobre las nuevas imágenes seleccionadas. Finalmente, obtendremos una tabla de resultados que podremos usar en formato hoja de cálculo.



Ejemplo 4: imagen de todas las hojas de una planta, después de haber sido tratadas con Photoshop (izq). Imagen de las hojas durante el tratamiento con FIJI (centro), Imagen de las ‘outlines’ que delimitan el área de hoja, que medirá el programa FIJI (dcha.).



Ejemplo 5: imagen de la expresión de la proteína fluorescente DsRed de una planta, después de haber sido tratadas con Photoshop (izq.). Imagen de las hojas durante el tratamiento con FIJI (centro), Imagen de las ‘outlines’ que delimitan el área de hoja que expresa DsRed, y que medirá el programa FIJI (dcha.)

5.2.3. Purificación y cuantificación de anticuerpos policlones.

Los anticuerpos fueron purificados mediante cromatografía de afinidad, por afinidad de unión covalente a proteína a. la purificación fue realizada por el servicio de proteómica del IBMCP. La cuantificación se llevó a cabo utilizando la metodología de Bradbord. Los datos se ajustaron a una curva patrón de BSA a partir de la que se calcularon los $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína obtenidos mediante la purificación.

6. Resultados

En este trabajo se considera que la medida del % de expresión, medido como el área de hoja infectada, guarda relación directa con la producción de proteínas en la planta. Es decir, el área infectada indica producción de proteína de interés en las células que producen la proteína fluorescente.

6.1. Métodos y herramientas de Agroinfección, para la expresión transitoria en plantas de *N.benthamiana*.

Con el fin de encontrar una forma alternativa a la agroinfiltración por vacío para agroinfectar a las plantas de *N. benthamiana*, se probaron diferentes herramientas y métodos. Las plantas se rociaron con pistola de spray eléctrica, con pulverizador de presión manual y, por último, se sumergieron en la solución de infiltración. Se utilizó una OD de 0,05 y una concentración de surfactante silwet de 1mL/L, de acuerdo con las concentraciones utilizadas de forma habitual para la agroinfiltración a vacío en el laboratorio 2.10 del IBMCP. A 7 dpi se fotografiaron las hojas de las plantas de *N. benthamiana*. Tras obtener y procesar las fotografías, se obtuvo el porcentaje de área de infección en el total de las hojas de cada planta agroinfectada. Este ensayo se repitió dos veces de forma independiente.

En el primer ensayo el porcentaje del área de las hojas donde se detectó expresión (abreviado como porcentaje de expresión) resultante de las plantas agroinfectadas por inmersión fue de 34,88% frente al 29,48% obtenido por agroinfección con pistola y el 18,31% obtenido por agroinfección con pistola eléctrica. En el segundo ensayo la expresión después de la agroinfección mediante inmersión fue de 32,01% frente al 19,17% y el 26,22% obtenidos por agroinfección con pistola eléctrica y pulverizador respectivamente.

Los resultados indican que el porcentaje de infección es mayor y más reproducible utilizando el método que consiste en sumergir la planta en la solución de agroinfección (figura 1).

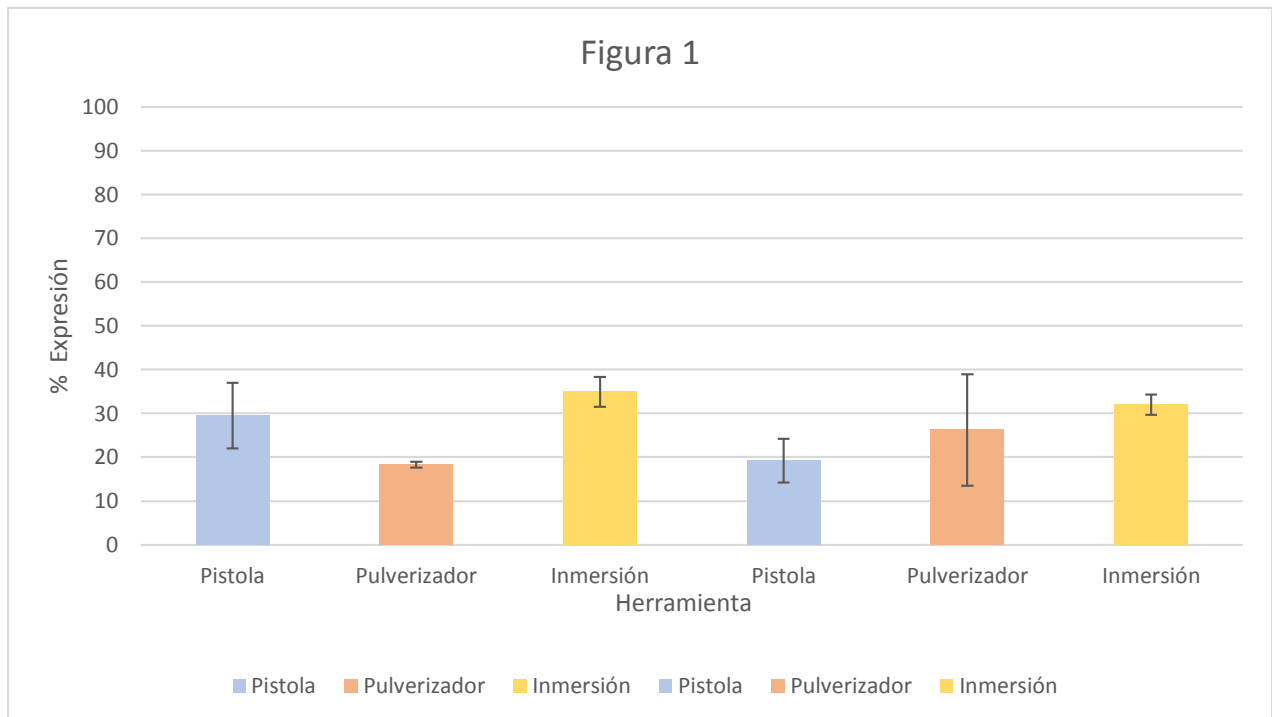


Figura 1: % de Expresión de la proteína fluorescente DsRed, en función de la herramienta utilizada para agroinfectar a las plantas de *N. benthamiana*, en dos experimentos independientes. Las herramientas son: pistola (pulverizador automático), pulverizador (pulverizador manual) e Inmersión. Los colores de mayor intensidad corresponden al % de área infectada (% de la hoja en la que la proteína fluorescente DsRed se está expresando) y los colores de menor intensidad corresponden al % de área no infectada ((% de la hoja en la que la proteína fluorescente DsRed no se está expresando).

Se seleccionó la inmersión, consistente en sumergir las plantas en la solución de agroinfección, como método estándar para los posteriores experimentos de agroinfección llevados a cabo.

6.2. Ajuste de la OD y de la concentración de surfactante.

Una vez seleccionada la inmersión como método para agroinfectar, se ensayó el efecto que tenían diferentes concentraciones del surfactante Fluvius, así como de diferentes OD.

Para el surfactante Fluvius, se probaron 5 concentraciones: 0,01%, 0,05%, 1%, 2% y 4%. La OD utilizada fue 0,05, como en el experimento anterior.

Se vio que el surfactante juega un papel importante en el porcentaje de área expresión en las hojas de *N. benthamiana*. A una concentración de 0,01% y 0,05%, el porcentaje de infección es muy bajo. Este valor aumenta al 1%, 2% y 4% (Figura 2).

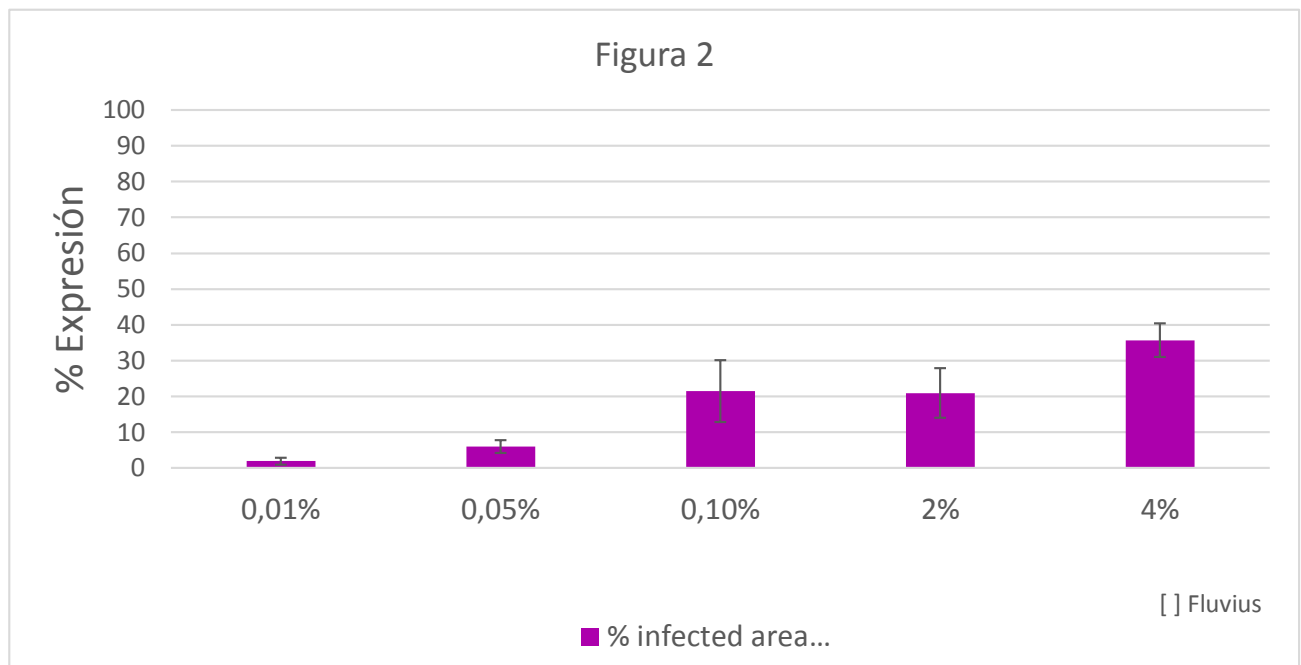


Figura 2: % de Expresión de la proteína reportera fluorescente DsRed en hojas de *N. benthamiana* en función de la concentración de surfactante Fluvius.

A una concentración de 4% de sustancia surfactante se obtienen los mejores resultados en términos de área infectada. A una concentración del 1% y el 2% los resultados son similares en términos numéricos, aunque visualmente la intensidad de la expresión, de la proteína reportera DsRed, era mayor en aquellas hojas que habían sido agroinfectados utilizando un 2% de concentración de surfactante Fluvius.

Para comprobar el efecto de la Densidad Óptica (OD) del cultivo de *Agrobacterium* sobre la expresión, se ensayaron 5 ODs (densidades ópticas) diferentes: 0,01, 0,02, 0,05, 0,1 y 0,2.

La Figura 3 representa el porcentaje del área de las hojas donde se detectó expresión de la proteína reportera DsRed a diferentes OD. El porcentaje de expresión es más bajo para una OD de 0,01. Sin embargo, los valores de expresión son bastante similares a concentraciones entre 0,02, 0,2. Conviene hacer notar que los cultivos de *Agrobacterium* son uno de los elementos que más recursos consumen en el escalado del proceso de agroinfección y, por tanto, si no aportan un aumento significativo a los niveles de producción, conviene minimizar su utilización.

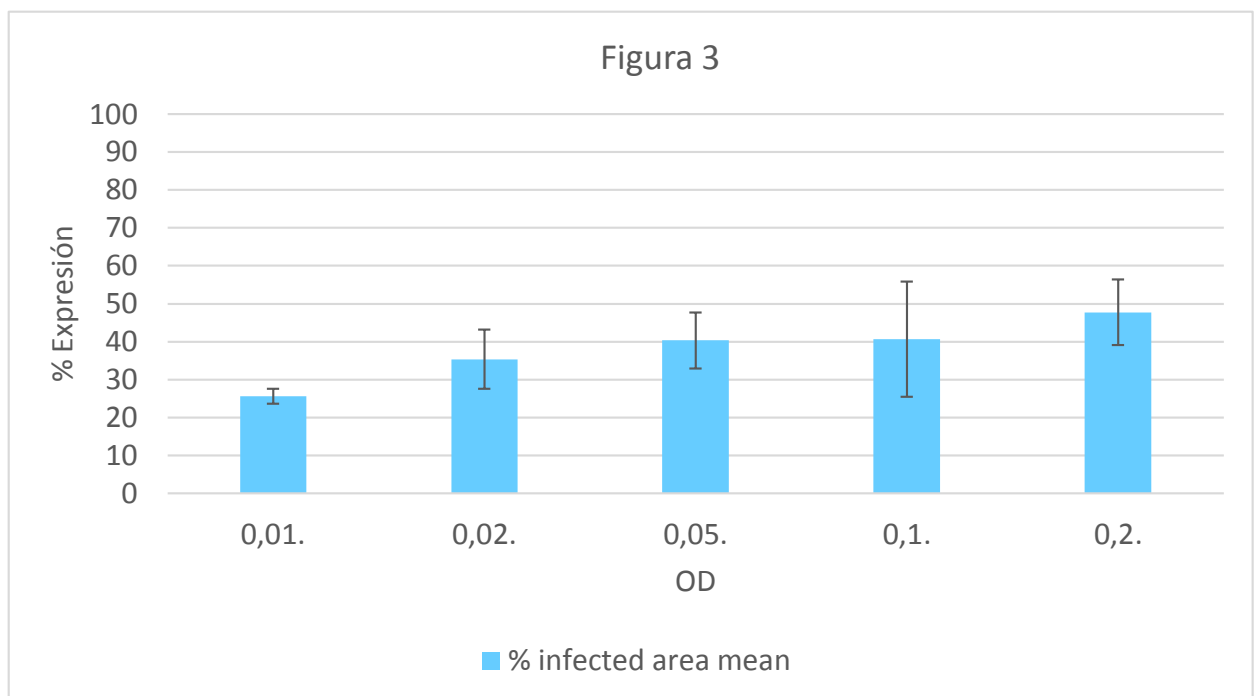


Figura 3: % de Expresión de la proteína reportera fluorescente DsRed en hojas de *N. benthamina* en función de la OD₆₀₀ utilizada para agroinfectar a las plantas.

A partir de los resultados de experimentos anteriores, se decidió utilizar una OD de 0,02 y una concentración de surfactante del 2% en los posteriores experimentos de optimización.

Se usó una OD de 0,02 porque se consideró la OD a la que se obtenía mayor expresión con menor inversión de recursos. De igual manera, la concentración de surfactante utilizada fue 2% aunque a una concentración del 4% la expresión fue mayor. Esto se debe a que en este caso las plantas serán agroinfectadas en dos ocasiones. Esta doble agroinmersión provocaba necrosis en las hojas, por lo que se consideró más adecuado usar una concentración del 2% de surfactante.

6.3. Efecto de la re-agroinfección sobre la expresión.

La facilidad técnica de la inmersión como sistema de agroinfección hace posible que se puedan plantear el empleo de inmersiones sucesivas como estrategia para aumentar la producción. En teoría, en una primera inmersión se transformarían un porcentaje determinado de células, que podría aumentarse con la re-inmersión posterior. Esto, unido al movimiento célula-a-célula del replicón viral podría contribuir a extender la infección y por tanto la expresión recombinante más allá de los niveles máximos del 35% obtenidos en experimentos anteriores con una sola inmersión. Para comprobar el efecto de la re-agroinfección sobre la expresión de proteínas se diseñó el siguiente experimento:

En primer lugar se agroinfectaron a día 1 todas las plantas que se usaron en el experimento, en concreto, 3 réplicas por día, un total de 15 plantas.

A día 1 y pasadas 2 horas desde la primera agroinmersión, se vuelven a agroinfectar las 3 réplicas correspondientes al día 1. Para esta segunda agroinfección la proteína reportera utilizada fue GFP. Este cambio de proteína reportera sirve para, posteriormente, poder medir qué expresión corresponde a la primera agroinfección y qué expresión corresponde a la re-agroinfección.

A día 2, pasadas 24 horas desde la primera agroinfección, se re-agroinfectaron 3 réplicas con GFP.

A día 3, pasadas 48 horas desde la primera agroinfección, se re-agroinfectaron 3 réplicas con GFP.

A día 4, pasadas 72 horas desde la primera agroinfección se re-agroinfectaron otras 3 réplicas con GFP.

Y por último, a día 5, pasadas 96 horas desde la primera agroinfección se re-agroinfectaron las 3 últimas réplicas.

Pasados 7 días desde la primera agroinfección, se tomaron fotografías de todas plantas re-agroinfectadas.

En la siguiente imagen se esquematiza el diseño experimental:

DIA1	DIA2	DIA3	DIA4	DIA5	DIA6	DIA7
XX						
X	X					
X		X				
X			X			
X				X		

DIA1	DIA2	DIA3	DIA4	DIA5
				X
				X
				X
				X
				X

*Ilustración 1: Esquema del diseño experimental para la re-agroinmersión de plantas de *N. benthamiana* y la posterior toma de imágenes fotográficas de las mismas.*

Además, cada día se agroinfectaron 2 réplicas control con las mismas concentraciones de surfactante (2%) y la misma OD (0,02). Estos controles se infectaron con la proteína

reportera DsRed y no fueron re-agroinfectados. Su función fue permitir comparar el porcentaje de expresión de las plantas re-agroinfectadas con la expresión de plantas agroinfectadas una sola vez.

Los resultados se muestran en la Tabla 4:

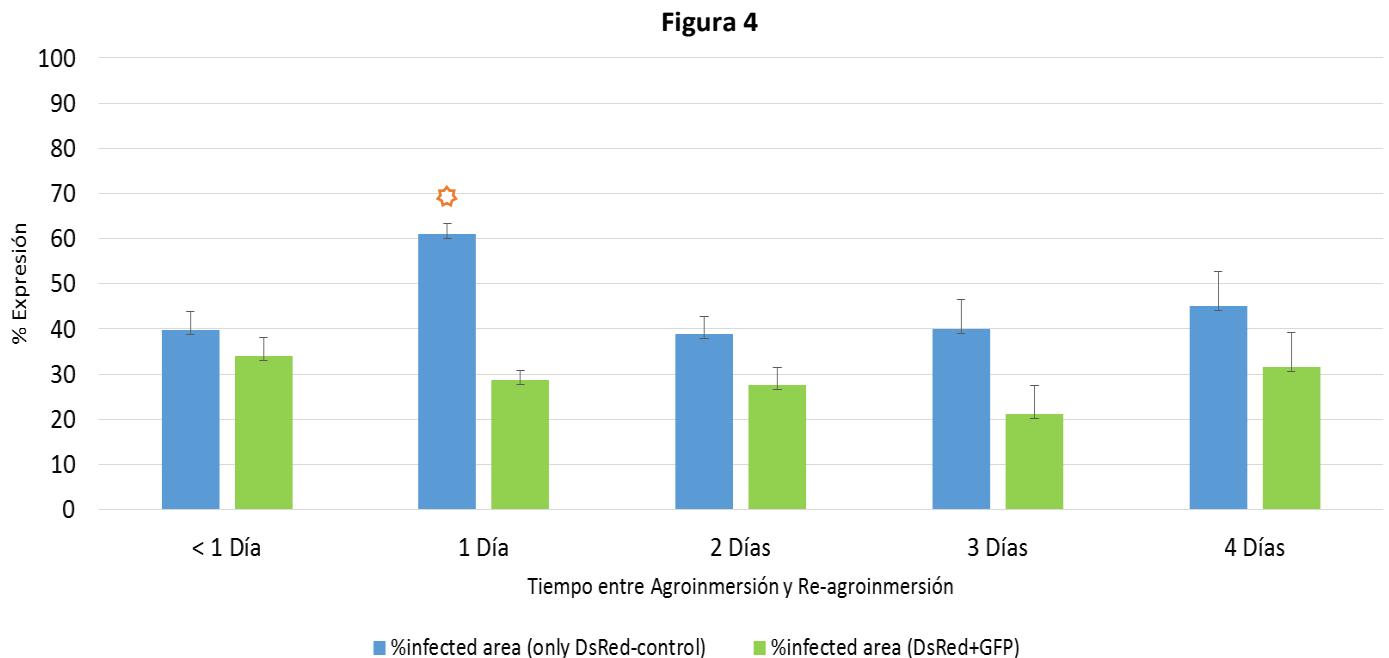


Figura 4: % de Expresión de la proteína reportera DsRed (que sirve como control) en hojas de *N. benthamiana* (representado en azul). % de Expresión del área infectada por las proteínas reporteras fluorescentes DsRed y GFP (por re-agroinfección) en hojas de *N. benthamiana* (representado en verde). En función del tiempo entre la Agroinmersión y la Re-Agroinmersión de las plantas en la solución de Agroinfección.

La gráfica representa el porcentaje de expresión de las plantas agroinfectadas con DsRed y re-agroinfectadas con GFP a diferentes días (representadas en verde en la gráfica). Y como control, agroinfectadas solo con DsRed (representadas en azul en la gráfica).

Como se puede ver la re-agroinfección no aumenta el porcentaje de expresión. A excepción de la expresión de los controles de 1 día, cuyo valor es más alto, la expresión del resto de los controles (agroinfectadas exclusivamente con DsRed), se mantiene en torno al 40% de expresión en todos los casos. El dato de los controles es bastante estable. Sin embargo, las plantas agroinfectadas con DsRed y reagroinfectadas con GFP, muestran, en general, menor expresión que los controles. Esta expresión está en torno al 30%, en torno a un 10% menor que la agroinfección habitual.

6.4. Expresión de un anticuerpo policlonal recombinante

Por último, comprobamos la producción de un anticuerpo policlonal recombinante que se obtendría utilizando los parámetros ensayados para la optimización del proceso de expresión transitoria, mediante Agroinfección sin infiltración. Se utilizó, la Agroinmersión como método, con una solución de *Agrobacterium* de OD₆₀₀ de 0,02, y una concentración de surfactante del 4%, en la solución de agroinmersión. Se utilizaron anticuerpos policlonales, frente al veneno de la serpiente *Bothrops asper*. Se usó un Working Cell Bank de dichos anticuerpos policlonales, que había sido mejorado mediante Phage Display por el laboratorio 2.10 del IBMCP. A 7dpi se recogieron 64,5g de hojas agroinfectadas. Se extrajo el líquido apoplástico por centrifugación. Los anticuerpos, contenidos en el líquido apoplástico, fueron purificados mediante cromatografía de afinidad a proteína a. Después, se cuantificó el contenido mediante la técnica de Bradford. Tras ajustar los resultados a la curva patrón (Figura 5), se obtuvo que la producción de anticuerpo, usando este método, es de 4mg de anticuerpo por kg de peso fresco.

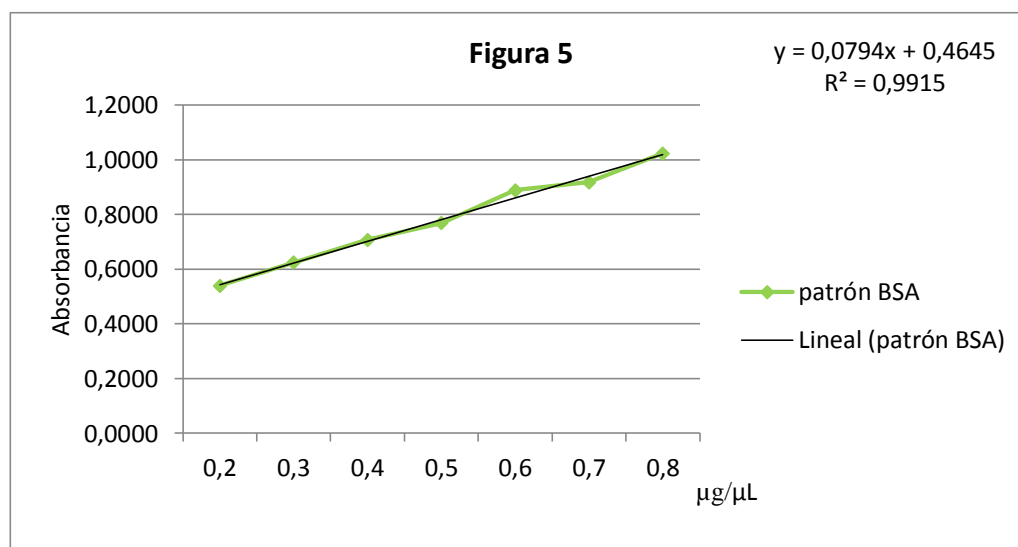


Figura 5: curva de calibrado con patrón BSA.

7. Discusión

Actualmente, las proteínas recombinantes se producen, principalmente, a partir de cultivos de células de mamíferos, insectos y bacterias. En los últimos años, el desarrollo de los vectores virales deconstruidos ha permitido que las plantas se conviertan en una plataforma viable para la producción de proteínas recombinantes. Esto ofrece ventajas por la versatilidad, velocidad, bajo coste, escalabilidad y bioseguridad de la producción de proteínas (Gleba et al., 2004), (Krenek et al., 2015), (Chen et al., 2015). Además, los vectores basados en virus, hacen que la acumulación de proteínas recombinantes en las plantas, sea mucho más alta que la producida con vectores no virales. Esto es debido a la alta replicación y transcripción del virus en las células vegetales (Chen et al., 2015).

La agroinfiltración se presenta como un método sencillo para introducir dichos vectores virales, vía *Agrobacterium*, en la hoja de la planta. La jeringa es la herramienta para la agroinfiltración más utilizada en investigación, ya que ofrece la flexibilidad de introducir múltiples construcciones transgénicas en diferentes áreas, lo que permite realizar múltiples ensayos en una sola hoja (Chen et al., 2015). Sin embargo, la jeringa, como herramienta, tiene al menos dos limitaciones, la imposibilidad de escalar el proceso y que solo puede utilizarse con un número limitado de especies vegetales (Takata et al., 2012). Si pretendemos una producción a gran escala de proteínas recombinantes en plantas, la jeringa no es una buena opción. Para escalar el proceso y obtener mayores cantidades de proteínas, se propone el uso de otras metodologías, que ahorren tiempo, esfuerzo y dinero, pero con las que se obtenga una cantidad de proteína rentable.

El siguiente paso para la escalabilidad del proceso de agroinfiltración, es el uso de cámaras de vacío. Pero esto supone una inversión económica en dichas cámaras y en la robotización que su uso supone. La eficacia de la agroinfiltración a vacío, en términos de producción de proteínas es muy alta. Sin embargo, conseguir una gran cámara de vacío, que permita agroinfiltrar gran cantidad de plantas a la vez, puede que sea rentable para ciertas empresas, pero para otras pequeñas empresas y laboratorios, seguramente la

rentabilidad se encuentre en utilizar un mayor número de plantas transformadas con otras herramientas, ahorrándose la inversión en una cámara de vacío y la robotización (Hahn et al., 2015).

Como alternativa a lo que llamamos agroinfección clásica mediante infiltración a vacío (agroinfiltración), proponemos el uso de la agroinfección sin vacío. A diferencia de la agroinfiltración, en la que la solución de *Agrobacterium* sustituye el volumen líquido del apoplasto, en la agroinfección sin infiltración, la solución de *Agrobacterium* penetra a través de la hoja. Como herramientas de agroinfección alternativas a la infiltración, probamos el spray con pulverizador eléctrico, con pulverizador manual y la simple inmersión de la planta en la solución. Ya se vio que la pulverización de hojas de las plantas con una suspensión diluida de *Agrobacterium* en presencia de un tensioactivo, permite la infección eficaz del 0,9 al 3,5% de las células de las hojas de plantas de *Nicotiana*. Gracias a los replicones virales con su movimiento célula-célula aumentan los niveles hasta aproximadamente un 90% de células de las hojas infectadas. Este procedimiento requiere un tiempo ligeramente más largo para llegar ese efecto, (10-14 días en lugar de 4-7 días en infiltración al vacío), pero los niveles de expresión resultantes son comparables a los de las plantas infiltradas a vacío (Hahn et al., 2015a). En nuestro caso, consideramos que la agro-inmersión es una forma fácil y estable de agroinfectar plantas de *Nicotiana benthamiana*, por lo que usamos la inmersión de las plantas de *N. benthamiana* en la solución de agroinfección, como técnica para optimizar otros parámetros durante todo este trabajo. No obstante, los resultados obtenidos al agroinfectar con pulverizador, tanto automático como manual, eran similares, en términos de área infectada, a los obtenidos con la agro-inmersión (Figura 1).

Al usar estos procedimientos sin vacío, la principal barrera para la penetración foliar de la solución de agroinfección, es la cutícula de la hoja. Por tanto, flanquear esta barrera natural es de gran interés (Gutenberger et al., 2013). Para esto, se usan los surfactantes, que son sustancias tensoactivas conocidos por aumentar la absorción de los agroquímicos sobre la superficie foliar por mejoran la emulsión, dispersión, esparcimiento y adhesión, mediante la modificación del comportamiento de los líquidos

sobre una superficie, como la hoja (Gutenberger et al., 2013). Los tensioactivos se usan comúnmente en la aplicación foliar de productos agroquímicos para mejorar el rendimiento de los mismos. Uno de los mecanismos por los cuales los tensioactivos pueden mejorar el rendimiento es porque solubilizan, o modifican, la barrera de cera epicuticular que cubre la superficie aérea de la planta (Tamura et al., 2001).

En general, la absorción de nutrientes por la superficie de la hoja es un fenómeno fisicoquímico importante, depende de la morfología de la superficie de la hoja y de la formulación química, así como de adyuvantes, tensioactivos asociados, y muchos otros factores físicos, químicos y biológicos (Peirce et al., 2015). El comportamiento biológico de los productos que se aplican utilizando pulverizadores de presión sobre herbáceas, depende de muchos factores, como: la formulación del producto y las propiedades físico-químicas resultantes del líquido de pulverización (Butler Ellis et al., 2004). La unión de *Agrobacterium* a las células de las plantas es un proceso temprano y crítico en la vía de infección. Sin embargo, la base de la interacción planta-bacteria durante la unión aún no se comprende del todo. Este desconocimiento hace que, una vez que la bacteria entra en un tejido de la planta (por ejemplo en la hoja) los pasos que sigue son algo inciertos. Es posible que la forma en la que *Agrobacterium* se une a la planta tenga consecuencias en la eficiencia de transformación, así como en la expresión de la proteína de interés en la planta. En un estudio llevado a cabo con hojas de lechuga, analizaron el comportamiento de *Agrobacterium* en el proceso de fijación al tejido vegetal para mejorar la eficacia de la agroinfección. En este estudio, con hojas de lechuga, encontraron que a mayor concentración de surfactante, mayor volumen de líquido infiltrado en la planta (en ml/g de hoja). Usaron concentraciones crecientes del surfactante, a una concentración de 1ml/l (concentración de surfactante máxima probada) encontraban el máximo volumen de líquido infiltrado, así como la mayor fijación bacteriana a la hoja (Simmons et al., 2014).

En nuestro caso, obtenemos máxima eficacia utilizando 4ml de surfactante por 1l de medio de agroinfección. Esta diferencia puede deberse a que ciertos surfactantes están compuesto por 100% de poliéter de triloxano (como el usado en el estudio de lechuga),

que produce un super-esparcimiento (Wang et al., 2013a). Mientras que el usado en este estudio (con nombre comercial Fluvius), está compuesto de 19,5% de poliéter de triloxano y un 80'5% de poliéter siloxano. Se sabe que los tensioactivos de siloxano mejoran, en gran medida, la capacidad de humectación de soluciones acuosas diluidas sobre sustratos hidrófobos. Pero los surfactantes de trisiloxano disminuyen mucho más la tensión superficial de las soluciones acuosas a concentraciones más bajas que los siloxanos. Por tanto, la capacidad de humectación de los triloxanos es mucho mayor que la de los siloxanos. De hecho, las soluciones acuosas con trisiloxano se propagan sobre sustratos hidrófobos formando una película delgada y el área total de humectación es unas 50 veces más grande que la del agua y 25 más grande que la de las soluciones con tensioactivo convencionales (Wang et al., 2013).

No obstante, se comprueba que el uso de una concentración creciente de surfactante Fluvius, previa a la necrosis, aumenta el volumen de líquido infiltrado, el área media de fijación bacteriana y en nuestro estudio, el área de hoja en la que se expresa la proteína de interés.

Por otra parte, es conveniente introducir cada planta una segunda vez en la solución de agroinfección ya que la eficacia de la pulverización está relacionado con la humectación de superficie de la planta. La difusión a través de la superficie de la hoja mojada, es más fácil que sobre una superficie seca (Tang et al., 2008).

Otro parámetro importante en la eficacia de la agroinfección, es la densidad óptica bacteriana (OD_{600}). En este trabajo, probamos diferentes OD_{600} , para establecer la OD_{600} más baja que provoca una mayor infección en las hojas de las plantas agroinfectadas. En este trabajo se fija la OD_{600} 0,02 como la mínima OD_{600} rentable y con expresión satisfactoria (Figura 3). Los resultados indican que, a concentraciones más altas, como a una OD de 0,2, aumenta la expresión. Sin embargo, el aumento no supera al obtenido a OD 0,02 lo suficiente como para ser rentable. En estudios similares, en los que usan pulverizador como herramienta de agroinfección, con una sustancia surfactante, la OD_{600}

utilizada es de 0,015 (Wang et al., 2013). Este 0,015 es muy similar al 0,02 que fijamos en este trabajo.

En este trabajo se prueba el efecto de re-agroinfección de las plantas. La hipótesis de partida era la posibilidad de que en una re-agroinfección, las células no infectadas en la primera agroinfección, se infectaran en una segunda. Sin embargo, este no fue el efecto obtenido. Esto puede deberse a varias razones. En primer lugar, pese al efecto del surfactante para hacer penetrar la solución de agroinfección, la planta lucha contra la infección. Para ello, el ácido salicílico (SA) derivado del metil salicilato (MeSA) y el metil jasmonato (MeJA), son una de sus principales armas para atenuar la infección en las hojas (Anand et al., 2008), (Robert et al., 2015). Tanto el MeSA como el MeJA, actúan en la respuesta sistémica frente al TMV (Zhu et al., 2014).

Otro aspecto crucial de la respuesta inmune de las plantas es la capacidad de evitar el ataque de patógenos posterior a otro ataque anterior. La activación de los efectores que disparan la inmunidad (ETI), inducen la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) en las hojas distales al sitio de inoculación, lo que confiere a la planta resistencia frente a un amplio espectro de patógenos. La SAR, se basa en la acumulación local de la hormona vegetal ácido salicílico. Esta acumulación está regulada por señales pequeñas que se difunden desde el punto de infección (Henry et al., 2013). Los aumentos de ácido salicílico inducidos por patógenos llevan a profundos cambios en la transcripción de genes (Spoel et al., 2009). Este podría ser uno de los motivos por el que las plantas no aumentan la expresión en una re-agroinfección.

Por último, se probó la eficacia, en términos de producción de anticuerpo. Tras agroinfectar las plantas de *N. benthamiana* por agro-inmersión en la solución con los parámetros optimizados (una única inmersión con OD₆₀₀ 0,02 y 4% de Fluvius), estas se dejaron expresando el anticuerpo policlonal durante 7 días. El rendimiento que se obtuvo fue de 4mg de anticuerpo por Kg de planta. La idea inicial era comparar la producción obtenida, con los parámetros optimizados de este trabajo, para agro-inmersión y para vacío. Finalmente, por limitación de tiempo y contratiempos varios,

sólo obtuvimos resultados referentes a la agroinfección por agro-inmersión que no pudieron compararse con la producción, en iguales condiciones de OD₆₀₀, para la agroinfección a vacío. Sin embargo, disponemos de los datos de producción del laboratorio 2.10. Los compañeros de laboratorio, que trabajan con el mismo anticuerpo utilizado en este trabajo, utilizando una OD₆₀₀ de 0,05, mediante agroinfección por infiltración en cámara de vacío y después de 5-7 días post-infección, obtienen una cantidad de proteína de 0,1 - 0,2 g de proteína por kg de peso fresco. La cantidad de anticuerpo obtenida por agro-inmersión es bastante menor. Creemos que los resultados obtenidos de la agro-inmersión, con OD₆₀₀ 0,02 y utilizando surfactante pueden ser mejorados. Según las publicaciones, cuando se utiliza un método tipo spray, con surfactantes para favorecer la penetración de la solución de agroinfección, es necesario un tiempo de 10 a 14 días para conseguir los mismos resultados que se obtienen en 4 a 7 días cuando se agroinfiltra a vacío (Marillonnet et al., 2005), (Hahn et al., 2015). Por tanto, es posible que agroinfectando plantas de *N. benthamiana* por agro-inmersión, con una OD de 0,02, una concentración del 2% de Fluvius y un período de expresión de entre 10 y 14 días, se aumente la producción del anticuerpo policlonal que nos interesa obtener.

Por tanto, el método de agroinfección alternativa, que se propone en este trabajo, pretende ahorrar dinero, tiempo y esfuerzo. Gracias a la optimización de la densidad óptica, el dinero invertido en los antibióticos y medios necesarios para los cultivos de *Agrobacterium* serían reducidos. Normalmente, la densidad óptica utilizada en el laboratorio 2.10 es del 0,05, mientras que en este trabajo se obtiene una expresión equivalente utilizando una densidad óptica de 0,02. Esto implica la utilización de una menor cantidad de medios de cultivo y un consiguiente ahorro de dinero. En cuanto al método utilizado, la inmersión, permite la transformación transitoria con esfuerzo y recursos mínimos. La inmersión se presenta como un método barato, sencillo y rápido (al igual que lo sería el spray sobre las plantas). Barato, porque no se requiere una inversión en máquinas de vacío, por ejemplo. Sencillo y rápido, porque se consigue la agroinfección de la planta con tan sola sumergirla en la solución durante unos segundos.

8. Conclusiones

Según los experimentales aportados en este trabajo, se puede extraer que:

- Es posible el uso de otras herramientas de agroinfección, distintas a la infiltración a vacío, para la expresión transitoria de proteínas recombinantes, como la pulverización con spray eléctrico, con spray manual de presión o con la simple inmersión de la planta en la solución de agroinfección.
- El uso de una $OD_{600} = 0,02$ permitiría obtener igual resultado, con menos coste, que el uso de una $OD_{600} = 0,2$ superior.
- Añadir una concentración del 4% de surfactante Fluvius a la solución de agroinfección, para pulverización o inmersión, permite una expresión máxima de proteínas en plantas de *N. benthamiana*.
- La re-agroinfección de las plantas de *N. benthamiana* no aumenta la expresión transitoria de proteína.
- La cantidad de anticuerpo policlonal, obtenida de plantas de *N. benthamiana* agroinfectadas por agro-inmersión, a $OD_{600} 0,02$ y Fluvius al 4% y 7 dpi, es mucho menor que la obtenida por agroinfiltración a vacío utilizando una OD superior. Sin embargo, esta producción es susceptible de ser mejorada si se amplía el tiempo de expresión de 7 días a 10-14 días.

9. Bibliografía

- Anand A, Uppalapati SR, Ryu C-M, Allen SN, Kang L, Tang Y, Mysore KS. 2008. Salicylic Acid and Systemic Acquired Resistance Play a Role in Attenuating Crown Gall Disease Caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 146:703–715.
- Butler Ellis MC, Webb DA, Western NM. 2004. The effect of different spray liquids on the foliar retention of agricultural sprays by wheat plants in a canopy. *Pest Manag. Sci.* 60:786–794.
- Chen Q, Lai H, Chen Q, Lai H. 2015. Gene Delivery into Plant Cells for Recombinant Protein Production, Gene Delivery into Plant Cells for Recombinant Protein Production. *BioMed Res. Int. BioMed Res. Int.* 2015, 2015:e932161.
- Chippaux J-P, Massougbdji A, Diouf A, Baldé CM, Boyer LV. 2015. Snake bites and antivenom shortage in Africa. *The Lancet* 386:2252–2253.
- Desai PN, Shrivastava N, Padh H. 2010. Production of heterologous proteins in plants: Strategies for optimal expression. *Biotechnol. Adv.* 28:427–435.
- Fischer R, Vaquero-Martin C, Sack M, Drossard J, Emans N, Commandeur U. 1999. Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30:113–116.
- Geisse S, Voedisch B. 2012. Transient expression technologies: past, present, and future. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 899:203–219.
- Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S. 2005. Magniflection—a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine* 23. Vaccines and Immunisation. Based on the Fourth World Congress on Vaccines and Immunisation:2042–2048.
- Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S. 2007. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18. Plant biotechnology / Food biotechnology:134–141.
- Gleba Y, Marillonnet S, Klimyuk V. 2004. Engineering viral expression vectors for plants: the “full virus” and the “deconstructed virus” strategies. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:182–188.
- Gutenberger A, Zeisler VV, Berghaus R, Auweter H, Schreiber L. 2013. Effects of poly- and monodisperse surfactants on 14C-epoxiconazole diffusion in isolated cuticles of *Prunus laurocerasus*. *Pest Manag. Sci.* 69:512–519.
- Hahn S, Giritch A, Bartels D, Bortesi L, Gleba Y. 2015a. A novel and fully scalable *Agrobacterium* spray-based process for manufacturing cellulases and other cost-sensitive proteins in plants. *Plant Biotechnol. J.* 13:708–716.
- Hahn S, Giritch A, Bartels D, Bortesi L, Gleba Y. 2015b. A novel and fully scalable *Agrobacterium* spray-based process for manufacturing cellulases and other cost-sensitive proteins in plants. *Plant Biotechnol. J.* 13:708–716.

- Henry E, Yadeta KA, Coaker G. 2013. Recognition of bacterial plant pathogens: local, systemic and transgenerational immunity. *New Phytol.* 199:908–915.
- Krenek P, Samajova O, Luptovciak I, Duskocilova A, Komis G, Samaj J. 2015a. Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. *Biotechnol. Adv.* 33. BioTech 2014 and 6th Czech-Swiss Biotechnology Symposium:1024–1042.
- Kwon K-C, Daniell H. 2015. Low-cost oral delivery of protein drugs bioencapsulated in plant cells. *Plant Biotechnol. J.* 13:1017–1022.
- Lacroix B, Citovsky V. 2013. The roles of bacterial and host plant factors in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *Int. J. Dev. Biol.* 57:467–481.
- Lindbo JA. 2007. High-efficiency protein expression in plants from agroinfection-compatible Tobacco mosaic virus expression vectors. *BMC Biotechnol.* 7:52.
- Ma JK-C, Christou P, Chikwamba R, Haydon H, Paul M, Ferrer MP, Ramalingam S, Rech E, Rybicki E, Wigdorowitz A, Yang D-C, Thangaraj H. 2013. Realising the value of plant molecular pharming to benefit the poor in developing countries and emerging economies. *Plant Biotechnol. J.* 11:1029–1033.
- Marillonnet S, Giritch A, Gils M, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y. 2004a. In planta engineering of viral RNA replicons: Efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:6852–6857.
- Marillonnet S, Thoeringer C, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y. 2005. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat. Biotechnol.* 23:718–723.
- Paul M, van Dolleweerd C, Drake PM, Reljic R, Thangaraj H, Barbi T, Stylianou E, Pepponi I, Both L, Hehle V, Madeira L, Inchakalody V, Ho S, Guerra T, Ma JK-C. 2011. Molecular pharming. *Hum. Vaccin.* 7:375–382.
- Paul M, Ma JK-C. 2011. Plant-made pharmaceuticals: Leading products and production platforms. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 58:58–67.
- Peirce CAE, Priest C, McBeath TM, McLaughlin MJ. 2015. Uptake of phosphorus from surfactant solutions by wheat leaves: spreading kinetics, wetted area, and drying time. *Soft Matter.*
<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/sm/c5sm01380a>.
- Pogue GP, Vojdani F, Palmer KE, Hiatt E, Hume S, Phelps J, Long L, Bohorova N, Kim D, Pauly M, Velasco J, Whaley K, Zeitlin L, Garger SJ, White E, Bai Y, Haydon H, Bratcher B. 2010. Production of pharmaceutical-grade recombinant aprotinin and a monoclonal antibody product using plant-based transient expression systems. *Plant Biotechnol. J.* 8:638–654.
- Robert S, Goulet M-C, D'Aoust M-A, Sainsbury F, Michaud D. 2015. Leaf proteome rebalancing in *Nicotiana benthamiana* for upstream enrichment of a transiently expressed recombinant protein. *Plant Biotechnol. J.* 13:1169–1179.

- Simmons CW, VanderGheynst JS, Nitin N. 2014. Attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to leaf tissue in response to infiltration conditions. *Biotechnol. Prog.* 30:1137–1144.
- Spoel SH, Mou Z, Tada Y, Spivey NW, Genschik P, Dong X. 2009. Proteasome-Mediated Turnover of the Transcription Coactivator NPR1 Plays Dual Roles in Regulating Plant Immunity. *Cell* 137:860–872.
- Stoger E, Fischer R, Moloney M, Ma JK-C. 2014. Plant Molecular Pharming for the Treatment of Chronic and Infectious Diseases. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65:743–768.
- Takata N, Eriksson ME. 2012. A simple and efficient transient transformation for hybrid aspen (*Populus tremula* × *P. tremuloides*). *Plant Methods* 8:30.
- Tamura H, Knoche M, Bukovac MJ. 2001. Evidence for Surfactant Solubilization of Plant Epicuticular Wax. *J. Agric. Food Chem.* 49:1809–1816.
- Tang X, Dong J, Li X. 2008. A comparison of spreading behaviors of Silwet L-77 on dry and wet lotus leaves. *J. Colloid Interface Sci.* 325:223–227.
- Tusé D, Tu T, McDonald KA. 2014. Manufacturing Economics of Plant-Made Biologics: Case Studies in Therapeutic and Industrial Enzymes. *BioMed Res. Int.* 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4058100/>.
- Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Fischer R. 2003. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotechnol.* 21:570–578.
- Vinogradova AP, Lebedeva MA, Lutova LA. 2015. [Meristematic characteristics of tumors initiated by *Agrobacterium tumefaciens* in pea plants]. *Genetika* 51:54–62.
- Walsh G. 2014. Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nat. Biotechnol.* 32:992–1000.
- Wang X, Chen L, Bonaccorso E, Venzmer J. 2013a. Dynamic wetting of hydrophobic polymers by aqueous surfactant and superspreader solutions. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* 29:14855–14864.
- Wang X, Chen L, Bonaccorso E, Venzmer J. 2013b. Dynamic Wetting of Hydrophobic Polymers by Aqueous Surfactant and Superspreader Solutions. *Langmuir* 29:14855–14864.
- Wolf A, Mazonot C, Spadoni S, Calvet F, Demoncheaux JP. 2011. [FAV-Africa: a polyvalent antivenom serum used in Africa and Europe]. *Médecine Trop. Rev. Corps Santé Colon.* 71:537–540.
- Wolterink-van Loo S, Escamilla Ayala AA, Hooykaas PJJ, van Heusden GPH. 2015. Interaction of the *Agrobacterium tumefaciens* virulence protein VirD2 with histones. *Microbiol. Read. Engl.* 161:401–410.
- Zhu F, Xi D-H, Yuan S, Xu F, Zhang D-W, Lin H-H. 2014. Salicylic Acid and Jasmonic Acid Are Essential for Systemic Resistance Against Tobacco mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 27:567–577.

