

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos
Dpto. de Producción Vegetal



INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS
Centro de Protección Vegetal y Biotecnología
Laboratorio de Virología e inmunología
Laboratorio de Transformación Genética



INMUNOMODULACIÓN DE LA INFECCIÓN DE *Plum pox virus* MEDIANTE LA EXPRESIÓN ESTABLE Y TRANSITORIA DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES CONTRA LA NIB REPLICASA VIRAL EN PLANTAS DE *Nicotiana benthamiana*

Memoria presentada por:
MAITE GIL CAPITÁN

para optar al grado de Doctora

Directores:
Dr. MARIANO CAMBRA ÁLVAREZ
Dr. LEANDRO PEÑA GARCÍA

Valencia, 2010

D. Mariano Cambra Álvarez, Doctor Ingeniero Agrónomo y D. Leandro Peña García, Doctor en Ciencias Biológicas, investigadores del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias,

CERTIFICAN:

Que D^a Maite Gil Capitán ha realizado bajo su dirección, en el Laboratorio de Virología en inmunología y el Laboratorio de Transformación Genética del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, el trabajo que, con el título **“Inmunomodulación de la infección de *Plum pox virus* mediante la expresión estable y transitoria de anticuerpos recombinantes contra la Nlb replicasa viral en plantas de *Nicotiana benthamiana*”**, presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

Para que así conste a los efectos oportunos, firman el siguiente certificado en Valencia, a 12 de mayo de 2010.

D. Mariano Cambra Álvarez

D. Leandro Peña García

AGRADECIMIENTOS

A pesar de las muchas y largas tardes en el laboratorio, en el invernadero o con la lupa GFP y con la única compañía de las *Nicotianas* que han sido necesarias para llevar este trabajo a buen puerto (o simplemente llegar a puerto), sé que esta obra no es solamente el fruto de mi esfuerzo si no también de la colaboración y el apoyo de mucha gente que me ha acompañado, ayudado y nutrido, intelectual o anímicamente durante esta larga travesía. A todos MUCHAS GRACIAS!

En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a Mariano Cambra y Leandro Peña directores de esta tesis.

A Mariano tengo que agradecerle su confianza y el haberme facilitado siempre los medios más que suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis, aunque en algunas ocasiones no hayan dado todo el fruto que nos hubiera gustado. Pero sobretodo por tu optimismo para ver siempre la parte positiva de los resultados, y enseñarme a verla a mi también.

A Leandro tengo que agradecerle el haberme enseñado a transformar, y no sólo las *Nicotianas*. Por todas las “minireuniones” de pasillo en las que en cinco minutos diseñábamos un experimento o discutíamos unos resultados. Por tus siempre fecundas conversaciones sobre ciencia en general y sobre los recombinantes y resistencia viral en particular. Pero sobretodo por darme siempre ánimos para seguir

Muchas gracias a los dos por vuestra infinita paciencia conmigo, especialmente durante la larga etapa de escritura, porque aunque siempre os he escuchado atentamente reconozco que no siempre os he hecho todo el caso que debiera.

En segundo lugar tengo que agradecer a todos los que me han brindado el apoyo material y técnico necesario para llevar a cabo el trabajo experimental que ha requerido esta tesis.

Necesariamente a los laboratorios de transformación genética y cultivo de tejidos por permitirme disponer de todo lo necesario para obtener las plantas transgénicas. A TODO su personal, por tratarme siempre de maravilla y por ayudarme en todo lo que necesité. Especialmente agradecer a Óscar, por amenizar con su música mis largas tardes en ese

pasillo tan vacío en aquellos tiempos y a Pablo por sacarme de algunos apuros cuando no había nadie más a quien preguntar. Y cómo no gracias a Josep por enseñarme y acompañarme durante la aclimatación de las primeras plantas transgénicas. Y a Magda y Mamen, por la lata que les he dado con la lupa GFP, por animarme siempre y no dejar de preguntarme “para cuando?!?”.

Por supuesto al personal del invernadero, por cuidar de mis Nicotianas y mantenerlas regadas incluso durante los meses de calor, aunque eso significase pasarse por allí algún sábado o domingo. Por facilitarme siempre disponer del material a tiempo, aún cuando les avisara con poca antelación. También, aunque más lejano, al laboratorio de Juan Antonio García y a su personal, por la desinteresada donación del clon de PPV con GFP utilizado en la última parte de la tesis, por la valiosa información sobre el programa informático para poder cuantificar los focos de fluorescencia, y por los consejos sobre agroinfiltración.

No quiero dejar de dar las gracias al departamento (ya desaparecido) de Biología Vegetal del ETSIA, especialmente a Jose Luis Guardiola por aceptarme como alumna de doctorado, y a Pilar Cebrián por su cercanía y por facilitarme tanto los trámites burocráticos. Asimismo agradecer al departamento de Producción Vegetal por adoptarme, y por que es dónde se inscribirá finalmente la Tesis. Además quiero dar las gracias a los evaluadores externos del borrador de la Tesis por sus acertados comentarios que han mejorado notablemente el resultado final.

En tercer lugar GRACIAS a todos los que durante este tiempo han contribuido en distintas etapas con su propio trabajo, o que con pequeños o grandes gestos han facilitado el mío.

A mis compañeros del laboratorio de Virología e Inmunología.

A los que ya no están. Gracias a Olga, por introducirme en el mundo de la molecular y de los recombinantes, por intentar traspasarme, en los tres meses que coincidimos, toda tu “sabiduría” y experiencia y por hacerme ver la realidad desde el principio. Gracias a Nieves, por tus consejos, tus ánimos en los peores momentos y también en los buenos. Gracias a Arantxa, por las tardes compartidas en la etapa pre y por seguir siendo la misma en tu etapa post. Gracias a las dos por contribuir a que trabajar en el laboratorio fuera un placer y por la época más divertida y productiva del mismo. Os echamos de menos!!!

A los que están desde siempre. Gracias a Edson, por ser el mejor compañero de laboratorio que se puede tener, pero sobretodo por ver siempre esa banda (en los westerns) imposible de ver y por enseñarme a interpretar numerosos resultados de PCR. Y por poner siempre tu visión de agrónomo en todas nuestras discusiones. Gracias a M^oCarmen, porque desde el principio me acogió con una gran sonrisa, por que has sido una gran ayuda y por los muchos momentos de risas que hemos pasado juntas dentro y fuera del laboratorio. A Tere, gracias por ayudarme a interpretar las inmunoimpresiones, y por enseñarme que cuando trabajas con proteínas hay que intentarlo todo pero no puedes estar segura de nada. A Antonio (aunque técnicamente ya no es de nuestro lab), gracias por hacerme mucho más fácil el tránsito del PC al MAC.

A los que están desde casi siempre. A Consuelo, gracias por mantener la limpieza y el orden, especialmente en mi bancada y estantería, cosa nada fácil en algunos momentos. Te agradezco sobretodo tu manera franca de decir las cosas y por todo lo que nos hemos reído juntas (y llorado).

A los últimos en llegar. Gracias a Edu por aguantar mis charlas en la sala de becarios, y por todas las conversaciones sobre PPV o sobre cualquier otra cosa que me han ayudado a veces a desconectar y otras a volver a conectar. A Alba (Pío) gracias por animar el laboratorio, por los cotilleos y las risas, esta última etapa no hubiera sido igual si ti.

Y también a los que han estado sólo de paso. Especialmente a Pura y Ana, porque sin vuestra ayuda las inoculaciones en el invernadero y la lectura de síntomas hubieran sido demasiado aburridas e interminables. A Delia, por ser otra sufridora de las transgénicas, por tu trabajo bien hecho y por tu compañía. A Patricia (Pati), per apendre tan ràpid i per tota la feina que vas fer. A Sara, gracias por enseñarme que no es tan fácil estar al otro lado (el de jefa), perdón por lo que pudiera no haber hecho bien.

A toda la gente del laboratorio de Bacteriología, y a Chiqui, por tolerar que me moviera por su laboratorio casi como si fuera el mío, permitir que utilizara muchos de sus aparatos, por los múltiples "préstamos" de material estéril, y por supuesto, por todas las celebraciones comunes que nos han reunido. Gracias especialmente a Clara, Carmina y Javi por estar siempre dispuestos a prestarme cualquier cosa. A Ramón

por sus excentricidades y por mantener la fiesta hasta el final en las cenas de Navidad. Gracias a Paola, Pablo, JM, Victoria, Belén y Mónica mis predecesores, por compartir inquietudes durante la tesis. A Belén por ser la mejor compañera con quien compartir sala de becarios (nuestro territorio durante tanto tiempo). A Victoria por ser un ejemplo a seguir, por enseñarme que todo se puede superar. A Pablo, moltes gràcies per la teua amistad, pero sobretot perque no saps lo important que ha estat per a mi poder continuar parlant en aquesta llengua que, sobretot al principi, em va ajudar a sentirme un poc més a casa. También a las nuevas “becarias-precarias”, Ana, Silvia y Begoña, aunque nuestros tiempos no hayan sintonizado mucho.

Gracias también a la gente del laboratorio de Virología, especialmente a Silvia por saber siempre todo o casi todo de cualquier cosa que te preguntaba, por ayudarme, al principio, con las agroinfiltraciones, y por hacerme disfrutar de tus viajes. Gracias a Susana y a Patricia por la compañía, aunque fuera desde el otro lado del pasillo vuestras risas hacían que me sintiera más acompañada, por las conversaciones de última hora (o altas horas) de la tarde y por hacer del rato de la comida una verdadero momento de “risoterapia”.

Y porque no todo iba a ser trabajar, muchas gracias también al “club de la caipirinha”, especialmente a Jaime por ser el principal proveedor y a Edson por preparar la mejor caipirinha del mundo (no te enfades Jaime), a los de la cervecita de los viernes, a los de la acampada en dónde era??!! y a TODOS los que SINCERAMENTE disfrutasteis aquellos y otros muchos momentos “lúdicos-festivos”.

En cuarto lugar quiero dar las gracias a todos los que desde fuera del IVIA me han animado y soportado mis momentos de bajón o de alegría, pero sobretodo de ausencia.

A mi pequeña familia (mis padres, mi hermano, Gaby, y a mi preciosa sobrina) por quererme tanto a pesar de sufrir doblemente mi ausencia, por estar lejos (aunque no tanto) y por espaciar tanto mis visitas en los últimos tiempos. A mi gran familia (tíos y primos) por esas reuniones multitudinarias cada vez que vuelvo a casa, y por enviarme, siempre que me visitan mis padres, esos roscos y bizcochos que tanto me recuerdan a mi infancia. Y a la Cris y el Javi por compartir tantas cosas en nuestra cabaña del árbol y continuar compartiendo ahora. A la meua familia

adoptiva (de la Costera) per fer-me sentir com a casa, per saber que puc comptar amb vosaltres i perquè em diverteixo tant en la vostra companyia.

A mis amigos. A los “bientreintaytantos”, pels bioesmorssars de nadal, les biomarxes i perquè a pesar d'estar repartits pel món sempre ens trobem a Barna pels nadals. Gracias a Mercé, Cristina, Sonia, Eva G. i Josep. A Rosa i a Kim, por tantos años (son tantos ya?!) de amistad. A Eva F., gracias por muchas cosas pero sobretodo por las largas, largas, largas conversaciones telefónicas que me han ayudado a no desconectarme del todo. Os prometo que a partir de ahora me voy a conectar al skype, voy a contestar todos los mails, las llamadas...

A Silvana por enseñarme a hacer “boludeces”, y por acompañarme en aquel increíble viaje por tu maravilloso país.

A Laura, per fer-me la vida més fàcil en el teu/meu nou poble, pels cafenets, les cervetes, els soparets i les converses filosòfiques.

A Juan y Laura, por atreverse a compartir casa y disfrutar con nosotros del paisaje marroquí.

I a Jose, per regalarme un nou nom cada dia, per compartir les teues obres i les teues il.lusions amb mi, i perquè si els nostres camins no s'hagueren creuat, a la vora del Paraná, segurament, mai haguera començat aquesta tesi.

Y finalmente y para acabar MUCHAS GRACIAS a todos los que habéis pasado por el laboratorio, a todos los que en algún momento (o en muchos) me habéis dado ánimos por los pasillos, a todos los que en alguna ocasión me habéis salvado de dormir en el ivia cuando aún no tenía coche, a todos los que me habéis acompañado durante todo este tiempo.

ÍNDICE GENERAL

Resumen.....	7
Resum.....	9
Summary.....	11
Abreviaturas.....	13
Virus citados.....	15
INTRODUCCIÓN GENERAL	19
1. Anticuerpos recombinantes y sus aplicaciones.....	20
1.1. La molécula de anticuerpo	20
1.2. Diversidad del repertorio de anticuerpos.....	23
1.3. Fragmentos de anticuerpo recombinantes	24
1.4. Obtención de anticuerpos convencionales y recombinantes	29
1.4.1. Anticuerpos policlonales y monoclonales	29
1.4.2. Fragmentos de anticuerpo recombinantes	29
1.4.3. Genotecas de fragmentos de anticuerpo recombinantes	31
1.5. Aplicaciones de los anticuerpos recombinantes: inmunomodulación	32
2. La enfermedad de la sharka y el <i>Plum pox virus</i>	33
2.1. Origen, distribución y síntomas de la enfermedad	33
2.2. El agente causal: <i>Plum pox virus</i>	35
2.2.1. Replicación y expresión del genoma viral.	35
2.2.2. Compartimentalización celular de las proteínas virales.....	38
2.3. Epidemiología.....	39
3. Estrategias de control de las enfermedades virales.....	40
3.1. Resistencia a virus en plantas transgénicas que expresan secuencias virales ...	41
3.2. Resistencia a virus en plantas transgénicas que expresan secuencias de naturaleza no viral	42
3.3. Estrategias de control del virus de la sharka.....	43
OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	49

CAPÍTULO 1

“Obtención de plantas transgénicas estables de *Nicotiana benthamiana* que expresan fragmentos scFv específicos de Nib replicasa de *Plum pox virus*”51

1. INTRODUCCIÓN	53
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	56
2.1 Transformación genética y regeneración de plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	56
2.2. Análisis de las plantas transgénicas	58
2.2.1. Análisis PCR.....	58
2.2.2. Análisis RT-PCR.....	58
2.2.3. Análisis “western blot”	58
2.2.4. Análisis inmunopresión-ELISA	59
2.2.5. Análisis “western blot” indirecto.....	59
3.1. Transformación genética de plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> y análisis de las plantas transgénicas	60
3.2. Expresión de diferentes versiones del fragmento scFv2A en plantas transgénicas	61

CAPÍTULO 2

“Ensayos de protección frente a PPV con plantas transgénicas que expresan los fragmentos scFv específicos de la proteína Nib”69

1. INTRODUCCIÓN	71
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	72
2.1. Preparación del extracto viral estándar de PPV y estimación del número de copias del genoma viral.....	72
2.2. Desafío por inoculación mecánica de PPV	73
2.3. Desafío por inoculación con PPV-GFP	73
2.4. Evaluación de la infección viral	74

2.4.1. Evaluación de síntomas	74
2.4.2. Análisis ELISA-DASI	75
2.4.3. Detección de la señal fluorescente de la GFP	75
2.5. Análisis estadístico.....	75
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
3.1. Ensayo de protección frente a PPV mediante desafío por inoculación mecánica.....	77
3.2. Ensayo de protección frente a PPV mediante desafío por inoculación con PPV-GFP.....	81

CAPÍTULO 3

“Expresión transitoria de fragmentos scFv2A en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>. Evaluación de su capacidad para interferir con la infección viral”	91
--	----

1. INTRODUCCIÓN	93
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	96
2.1. Material vegetal y plásmidos utilizados.....	96
2.2. Expresión transitoria de fragmentos scFv2A.....	96
2.2.1. Método de agroinfiltración	96
2.2.2 Análisis “western blot”	97
2.2.3.ELISA-indirecto.....	97
2.3. Ensayos de interferencia con la infección viral	98
2.3.1. Método de inoculación viral.....	98
2.3.2. ELISA-DASI.....	98
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	99
3.1. Evaluación de la acumulación de los fragmentos scFv2A, NLSscFv2A y 6K2scFv2A en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	99
3.2. Efecto de la expresión transitoria de los fragmentos scFv2A, NLSscFv2A y 6K2scFv2A en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> sobre la infección viral	102

CAPÍTULO 4

“Expresión transitoria conjunta de fragmentos scFv2A y PPV-GFP en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>”	109
1. INTRODUCCIÓN	111
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	113
2.1. Material vegetal y plásmidos utilizados.....	113
2.2. Método de agroinfiltración/agroinoculación.....	113
2.3. Evaluación de la infección viral	113
2.3.1. Análisis ELISA-DASI	113
2.3.2. Análisis “western blot”	114
2.3.3. Análisis inmunopresión-ELISA	114
2.3.4. Seguimiento de la fluorescencia GFP y conteo del número y tamaño de los focos de fluorescencia	114
2.4. Análisis estadístico.....	115
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	115
3.1. Evolución de la infección viral en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> por agroinfiltración con pBI-PPV-GFP.....	115
3.2. Efecto de la expresión estable de fragmentos scFv2A, NLSscFv2A o 6K2scFv2A en la evolución de la infección por PPV-GFP	118
3.3. Efecto de la expresión transitoria de fragmentos scFv2A, NLSscFv2A o 6K2scFv2A en la evolución de la infección por PPV-GFP	123
3.4. Efecto de la expresión conjunta de diferentes fragmentos scFv en la evolución de la infección por PPV-GFP	127
DISCUSIÓN GENERAL	137
CONCLUSIONES	147
BIBLIOGRAFÍA	149

Resumen

Plum pox virus (PPV) es miembro del género Potyvirus, causa la enfermedad de la sharka que tiene un serio impacto agrícola y económico sobre el cultivo de frutales de hueso. La utilización de variedades resistentes es la estrategia más duradera y definitiva en la lucha contra virosis de plantas. Por ello, se realiza un intenso esfuerzo en la búsqueda y obtención de cultivares resistentes o agronómicamente tolerantes frente a infección, ya sea por técnicas clásicas o métodos biotecnológicos.

En este contexto el objetivo general de esta tesis doctoral sería evaluar si la expresión de anticuerpos recombinantes específicos de proteínas de PPV en plantas *Nicotiana benthamiana* puede interferir o inmunomodular la infección viral y servir así como una estrategia para obtener resistencia.

En este trabajo se ha utilizado el fragmento de anticuerpo recombinante scFv2A que consiste en las regiones variables de la cadena ligera y pesada del anticuerpo mAb 2A-IVIA clonadas de forma secuencial y unidas por un péptido de unión o “linker” de forma que sean expresadas como una sola cadena proteica o scFv (del inglés “single chain Fv variable fragment”). Los dos anticuerpos reconocen a la proteína N1b replicasa de PPV que tiene actividad RNA-polimerasa RNA-dependiente (RdRp). La N1b se localiza principalmente en el núcleo de células de plantas infectadas, aunque su función de replicación, presumiblemente, tiene lugar en estructuras membranosas derivadas del retículo endoplásmico (RE) en el citoplasma.

Se transformaron plantas de *Nicotiana benthamiana* con tres versiones del fragmento recombinante scFv2A dirigidas a diferentes compartimentos celulares. Una versión citosólica (scFv2A), una versión nuclear (NLSscFv2A) y otra dirigida a membranas del RE (6K2scFv2A) por la cara citosólica. Se obtuvieron diversas líneas transgénicas: líneas A, líneas N y líneas K transformadas respectivamente con las construcciones scFv2A, NLSscFv2A y 6K2scFv2A. Para evaluar el nivel de resistencia de las diferentes líneas transgénicas, se realizaron ensayos independientes de desafío, mediante inoculación mecánica con extractos de plantas infectadas con virus o bien inoculando con un clon recombinante de PPV

fusionado a GFP (PPV-GFP). Se pudo comprobar que las plantas de las diversas líneas transgénicas de *N. benthamiana* que expresaban los fragmentos scFv2A, 6K2scFv2A o NLSscFv2A presentaban diferentes grados de protección frente a la infección por PPV. En algunas de las plantas se observó una protección parcial, manifiesta por un retraso en la aparición de síntomas o por una menor acumulación viral. En otras se ha observado el bloqueo total de la infección, ya que no han presentado síntomas ni acumulación viral a lo largo del tiempo que duraron los ensayos de desafío. Aunque ninguna de las líneas transgénica ensayadas ha mostrado protección en todas sus plantas a la infección por PPV, al menos con los métodos de inoculación y dosis utilizadas, se puede afirmar que la expresión en plantas de las diferentes versiones del fragmento scFv2A, de alguna forma, es capaz de interferir o inmunomodular el proceso de infección impidiendo su desarrollo normal. Sin embargo, como han apuntado otros autores, el nivel bajo de acumulación de los fragmentos scFv sería un factor que limitaría el efecto de protección ejercido.

Además, combinando la expresión transitoria scFvs mediante agroinfiltración y la agroinoculación del un clon viral PPV-GFP, se ha establecido un método alternativo, más rápido, para ensayar la efectividad los fragmentos scFv frente a la infección viral. Este método ha sido aplicado para evaluar de forma cuantitativa la efectividad de los diferentes fragmentos scFv2A, de forma que sirva de punto de comparación para valorar la eficacia de versiones mejoradas y más estables del fragmento scFv2A o incluso scFv con diferentes especificidades. De esta forma que se podrían seleccionar para la transformación estable los candidato con el mayor grado de efectividad posible y asegurar así el resultado de la estrategia de inmunomodulación en la obtención de resistencia a PPV.

Resum

Plum pox virus (PPV) és membre del gènere Potyvirus, causa la malaltia de la sharka que té un seriós impacte agrícola i econòmic sobre el cultiu de fruiters d'os. La utilització de varietats resistents és l'estratègia més duradora i definitiva en la lluita contra virosi de plantes. Per això es realitza un intens esforç en la busca i obtenció de cultivars resistents o agronòmicament tolerants front a la infecció, ja siga mitjançant tècniques clàssiques o mètodes biotecnològics.

En aquest context l'objectiu general d'aquesta tesi doctoral seria avaluar si l'expressió d'anticossos recombinants específics de proteïnes de PPV en plantes *Nicotiana benthamiana* pot interferir o immunomodular la infecció viral i servir així com estratègia per a obtenir resistència.

En aquest treball s'ha utilitzat el fragment d'anticòs recombinen-te scFv2A que consistix en les regions variables de la cadena lleugera i pesada de l'anticòs mAb 2A-IVIA clonades de forma seqüencial i unides per un péptid d'unió o "linker" de manera que siguen expressades com una sola cadena proteica o scFv (de l'anglès "single chain variable fragment"). Els dos anticossos reconeixen a la proteïna NIb replicasa de PPV que té activitat RNA-polimerasa RNA-dependent (RdRp). La NIb es localitza principalment en el nucli de cèl·lules de plantes infectades, encara que la seua funció de replicació, presumiblement, té lloc en estructures membranoses derivades del reticle endoplàsmic (RE) en el citoplasma.

Es van transformar plantes de *Nicotiana benthamiana* amb tres versions del fragment recombinen-te scFv2A dirigides a diferents compartiments cel·lulars. Una versió citosòlica (scFv2A), una versió nuclear (NLSscFv2A) i una altra dirigida a membranes del RE (6K2scFv2A) per la cara citosòlica. Es van obtenir diverses línies transgèniques: línies A, línies N i línies K transformades respectivament amb les construccions scFv2A, NLSscFv2A i 6K2scFv2A. Amb algunes d'aquestes línies transgèniques es van realitzar assajos independents de resistència a PPV per mitjà d'inoculació mecànica amb extractes de plantes infectades amb virus o bé inoculant amb un clon recombinant de PPV fusionat a GFP (PPV-GFP).

S'ha pogut comprovar que les plantes de les diverses línies transgèniques de *N. benthamiana* que expressen els fragments scFv2A, 6K2scFv2A o NLSscFv2A presenten diferents graus de protecció enfront de la infecció per PPV. En algunes de les plantes s'ha observat una protecció parcial, manifesta per un retard en l'aparició de símptomes o per una menor acumulació viral. En altres s'ha observat el bloqueig total de la infecció, ja que no han presentat símptomes ni acumulació viral al llarg del temps que van durar els assajos de desafiament. Encara que cap de les línies transgènica assajades ha mostrat protecció en totes les seues plantes a la infecció per PPV, almenys amb els mètodes d'inoculació i dosi utilitzats, es pot afirmar que l'expressió en plantes de les diferents versions del fragment scFv2A, d'alguna forma, és capaç d'interferir o immunomodular el procés d'infecció impedit el seu desenvolupament normal. Encara que, com han apuntat altres autors, el baix nivell d'acumulació dels fragments scFv seria un factor que limitaria l'efecte de protecció exercit.

A més a més, combinant l'expressió transitòria scFvs per mitjà d'agroinfiltració i l'agroinoculació d'un clon viral PPV-GFP, s'ha establert un mètode alternatiu, més ràpid, per a assajar l'efectivitat dels fragments scFv enfront de la infecció viral. Aquest mètode ha estat aplicat per avaluar de forma quantitativa l'efectivitat dels diferents fragments scFv2A per a interferir amb la infecció viral, de manera que serveixi de punt de comparació per a valorar l'eficàcia de versions millorades i més estables del fragment scFv2A o scFv amb diferents especificitats. D'aquesta forma es podrien seleccionar per a la transformació estable candidats amb el major grau d'efectivitat possible per assegurar d'aquesta manera el resultat de la estratègia de la immunomodulació en la obtenció de resistència a PPV.

Summary

Plum pox virus (PPV) is member of *Potyvirus* genus, and causes sharka disease. Sharka had a serious agronomic and economical impact on stone fruit crops. The use of resistant varieties is the most long-term and definitive strategy in the fight against viral diseases in plants. Although, great efforts are spend looking for resistant cultivars or at least agronomically tolerant against viral infections, by classical methods or biotechnological technology.

In this context, the main objective of this PhD work would be to evaluate if the expression of recombinant antibodies specific of PPV proteins in *Nicotiana benthamiana* plants can interfere or immunomodulate viral infection, and if it could be use as a strategy to obtain resistance.

In this work, it has been use the recombinant antibody fragment scFv2A, that consist of variable regions from the light and heavy chains of the monoclonal antibody 2A- IVIA (mAb 2A-IVIA) sequentially cloned and joined by a linker peptide, so that they are expressed like an unique protein or single chain Fv fragment (scFv). ScFv2A as well as mAb 2A-IVIA recognize specifically the NIb replicase protein of PPV, what has RNA-dependent RNA-polymerase activity (RdRp). The NIb protein localise mainly in nucleus of infected plant cells, thought his replication activity takes place in membrane structures derived from the endoplasmic reticulum (RE) in the cytosol.

Nicotiana benthamiana plants were transformed with three versions of the scFv2A recombinant fragment addressed to different cell compartments. A cytosolic version (scFv2A), a nuclear version (NLSscFv2A) and a third one addressed to RE membranes but cytosol facing version (6K2scFv2A). Several transgenic lines were obtained: lines a, lines N and lines K, transformed respectively with the constructions scFv2A, NLSscFv2A and 6K2scFv2A. To assess the level of resistance of different transgenic lines independent challenge experiments, by mechanical inoculation or by inoculation with a recombinant PPV clones fused to GFP (PPV-GFP), were performed. The transgenic plants that expressed the scFv2A, 6K2scFv2A o NLSscFv2A fragments showed different levels of protection against PPV infection. In some of them partial

protection was observed, the symptom appearance was delayed and the virus accumulation was lower than in nontransgenic plants. In some of them the infection was totally blocked, they didn't show symptoms or virus accumulation during the period assayed. Although none of transgenic lines assayed showed protection against PPV in all their plants, at least with the inoculum doses and inoculation methods used, it could be stated that expression of different versions of scFv2A fragment in plants is able to interfere or immunomodulate the infection process blocking its normal development. In any case, the low level of accumulation of scFv2A fragments would restrict the protection effect.

Moreover, combining the transient expression of scFv2A fragments by agroinfiltration with the agroinoculation with the recombinant viral clone PPV-GFP, it has been established a quicker alternative methodology to evaluate the effectiveness of scFv fragments to interfere with viral infection. This methodology has been applied to quantitatively evaluate the effectiveness of the different scFv2A versions. This methodology could be used to select new scFv2A versions with improved stability or scFv fragments with new specificities that show the better effectiveness for the stable transformation, and in this way assure the result of immunomodulation strategy for the abstention of PPV resistance.

Abreviaturas

Ab	Anticuerpo
Ag	Antígeno
AIA	Ácido 3-indol acético
AP	Fosfatasa alcalina
BAP	Benzil amino purina
BCIP	Bromocloro indol fosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
cDNA	Ácido desoxiribonucleico complementario
CDR	Región determinante de la complementariedad
CH	Región constante de la cadena pesada de la Ig
CI	Inclusiones citoplasmáticas
CL	Región constante de la cadena ligera de la Ig
CP	Proteína de la cápsida
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dsRNA	RNA de doble cadena
dsFv	Fragmento Fv estabilizado por puentes disulfuro
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ELISA	Ensayo inmunoenzimático (“Enzyme linked immunosorbent assay”)
ELISA-DASI	ELISA doble sandwich de anticuerpos indirecto
ELISA-i	ELISA indirecto
GAM	Anticuerpo de cabra anti-ratón
Gen	Gentamicina
GFP	Proteína verde fluorescente
GUS	β -glucuronidasa
Ig	Inmunoglobulina
Kan	Kanamicina
Kda	Kilodaltons
Mab(s)	Anticuerpo(s) monoclonal(es)
MBP	Proteína de unión a maltosa
MES	Acido 2-Morfolinoetanosulfónico
MS	Murashige-Skoog
mM	Milimolar
MP	Proteína de movimiento

mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NAA	Ácido naftalenacético
NBT	Nitro blue tetrazolio
NI	Inclusiones nucleares
NLS	Señal de localización nuclear
Ni-NTA	Nickel-Ácido Nitrilotriacético
Pab	Anticuerpo policlonal
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PBS	Tampón fosfato salino
PDR	Resistencia derivada del patógeno
PTGS	Silenciamiento génico postranscripcional
PMSF	Fenil metil sulfonil fluorida
PVDF	Polivinildenedifluorida
PVP	Polivinilpirrolidona
Rab(s)	Anticuerpo(s) recombinante(s)
RdRp	RNA polimerasa RNA dependiente
RE	Retículo endoplásmico
Rif	Rifampicina
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Retrotranscripción –PCR
scFv	Cadena simple de fragmentos variables
SDS	Docecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
UV	Ultravioleta
VH	Región variable de la cadena pesada de la Ig
VIGS	Silenciamiento génico inducido por virus
VL	Región variable de la cadena ligera de la Ig

Virus citados

AMCV	<i>Artichoke mottle crinkle virus</i>
CaMV	<i>Caulimoflower mosaic virus</i>
CTV	<i>Citrus tristeza virus</i>
GFLV	<i>Grapevine fanleaf virus</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
LMA	<i>Lettuce mosaic virus</i>
PLRV	<i>Potato leaf roll virus</i>
PPV	<i>Plum pox virus</i>
PVX	<i>Potato virus X</i>
PVY	<i>Potato virus Y</i>
TBSV	<i>Tomato bushy stunt virus</i>
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
TVMV	<i>Tobacco vein mottle virus</i>

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

La enfermedad es un fenómeno exclusivo de los sistemas vivos, que incumbe a todos los niveles de organización biológica. El concepto de enfermedad ha variado considerablemente a lo largo de la historia. Desde el punto de vista de la patología una definición apropiada podría ser: “enfermedad es la disfunción de un proceso causada por una acción continuada, con efectos deletéreos para el sistema vivo, y resultante en la manifestación de síntomas” (Horsfall y Cowling, 1977). Los agentes que mediante su acción continuada llevan al desarrollo de la enfermedad se denominan patógenos.

El grupo de virus patógenos no fue descubierto hasta los últimos años de siglo XIX, seguramente debido a su reducido tamaño y a que son parásitos obligados, aunque la descripción de muchas enfermedades virales data de mucho tiempo antes. El interés por las enfermedades de las plantas en general, y por las causadas por virus en particular, ha ido relacionado en último término con los efectos negativos que ocasionan en la producción y la calidad de la cosecha, y con las pérdidas económicas que ello provoca. Por ello en fitopatología han resultado más operativas definiciones como la que considera enfermedad a toda “alteración fisiológica o anomalía estructural deletérea para una planta, o para cualquiera de sus partes o productos, o que reduce su valor económico” (Stakmann y Harrar, 1957).

En los últimos tiempos esto ha cambiado y el estudio de las enfermedades de plantas, especialmente, las producidas por virus ha tomado interés en sí mismo (Zaitlin y Palukaitis, 2000). Al ser los virus parásitos obligados se establece entre ellos y sus hospedadores una relación mucho más estrecha que en otro tipo de patógenos, puesto que estos dependen totalmente de la maquinaria celular de sus huéspedes para realizar la mayoría de sus funciones. Consecuentemente, el avance en el conocimiento del proceso de infección viral ha aportado también conocimiento sobre fenómenos fundamentales del funcionamiento celular, como por ejemplo el descubrimiento de los mecanismos del silenciamiento génico. Estos conocimientos han repercutido también de forma importante en la manera de luchar contra las enfermedades virales aportando nuevas estrategias para producir plantas resistentes. Por otro lado, la capacidad de los virus de invadir a las plantas y producir en sus células grandes

cantidades de proteínas virales, los ha convertido en vectores de expresión y producción de proteínas de interés biotecnológico.

Por todo ello, la virología vegetal, para proveer de soluciones duraderas a los problemas causados por las enfermedades virales, debería profundizar en el estudio de la biología viral y del funcionamiento de la interacción entre virus y plantas tanto a nivel celular, de individuos como de poblaciones con todas las herramientas disponibles.

1. Anticuerpos recombinantes y sus aplicaciones

1.1. La molécula de anticuerpo

Los anticuerpos (Ab) o inmunoglobulinas (Ig) son una familia de glicoproteínas que intervienen en la respuesta inmunitaria de tipo humoral de los vertebrados. Estas moléculas son producidas por los linfocitos B y cuando el sistema inmunitario del huésped entra en contacto con moléculas extrañas e inmunogénicas, denominadas antígenos (Ag), desencadenan la respuesta inmune (Abbas *et al.*, 1995). Los anticuerpos se caracterizan, en primer lugar, por su gran diversidad de secuencia y por el amplísimo rango de estructuras antigénicas que pueden reconocer y diferenciar. Y en segundo lugar, por su especificidad de unión al motivo o determinante antigénico al que reconocen, llamado epítipo. Cada antígeno contiene diversos epítipos. La unión de un anticuerpo con un epítipo es enteramente no covalente, sin embargo es exquisitamente específica y a menudo muy fuerte. La especificidad y la afinidad o fuerza con la que un anticuerpo se une a su epítipo son dos características fundamentales de los anticuerpos.

Las moléculas de anticuerpo están constituidas por cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras, también idénticas (Figura 1A y B). Las cadenas pesadas al igual que las cadenas ligeras constan de una región variable (en la región N-terminal) y una región constante (en la región C-terminal). Las regiones variables están formadas por un dominio para la cadena ligera (VL) y otro para la cadena pesada (VH), y presentan gran variabilidad de secuencia entre inmunoglobulinas con diferente especificidad. Las regiones constantes están formadas por un dominio (CL) en el caso de las cadenas ligeras y tres o cuatro (CH1, CH2, CH3, CH4) en el caso de las cadenas pesadas

(CH). Las regiones constantes, tienen secuencias ampliamente conservada entre inmunoglobulinas del mismo grupo, lo que permite establecer una clasificación.

En base a la secuencia de la región constante de la cadena pesada se puede dividir a los anticuerpos en un pequeño número de clases y subclases. Los anticuerpos pertenecientes a diferentes clases presentan características fisicoquímicas diferentes. En humanos hay cinco clases o isotipos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Los isotipos IgA e IgG se subdividen, a su vez, en los subtipos IgA1 e IgA2, e IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En ratones hay los mismos isotipos, pero el isotipo IgG se divide en IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. Las cadenas pesadas de todas las moléculas de anticuerpo de un mismo isotipo, o subtipo, comparten grandes regiones de secuencias de aminoácidos idénticos pero diferentes a los de otro isotipo. Estas regiones comunes son las que determinan las funciones efectoras que tendrán de cada uno de los isotipos. También existen dos isotipos de cadenas ligeras, llamados κ y λ , pero estos no intervienen en la función efectora de la molécula de anticuerpo.

La molécula completa de anticuerpo se forma por la unión de una cada cadena pesada con una cadena ligera, y posteriormente la unión entre sí, mediante uniones no covalentes y como enlaces covalentes (Figura 1A y B). Entre la cadena pesada y ligera las interacciones covalentes son en forma de puentes disulfuro entre el dominio CL y dominio CH1. Las interacciones no covalentes surgen de interacciones hidrófobas entre los dominios VH y VL, y entre el dominio CL y CH1. La asociación de los dominios VH y VL produce una oposición especial de forma que los dos dominios yuxtapuestos puedan contribuir de igual forma a la unión al antígeno. En el emparejamiento de las cadenas pesadas también intervienen uniones covalentes en forma de puentes disulfuro en la región entre el dominio CH1 y CH2. También hay intensas interacciones no covalentes entre los dominios CH3, en cambio, no hay muchas interacciones entre los dominios CH2. En este dominio se crea un hueco donde se alojan los oligosacáridos pudiendo interactuar entre ellos contribuyendo a la asociación de las dos cadenas.

El resultado de todas estas interacciones es que el conjunto se pliega formando una estructura tridimensional globular común, la molécula de anticuerpo o inmunoglobulina (Figura 1B). Esta estructura presenta una

dualidad funcional. Las regiones constantes determinan las propiedades biológicas del anticuerpo y están conservadas entre los diferentes grupos de inmunoglobulinas, y las regiones variables conforman los sitios de unión al antígeno o paratopos (Figura 1A y C) y son las únicas responsables de su reconocimiento, es decir, determinan la especificidad el anticuerpo.

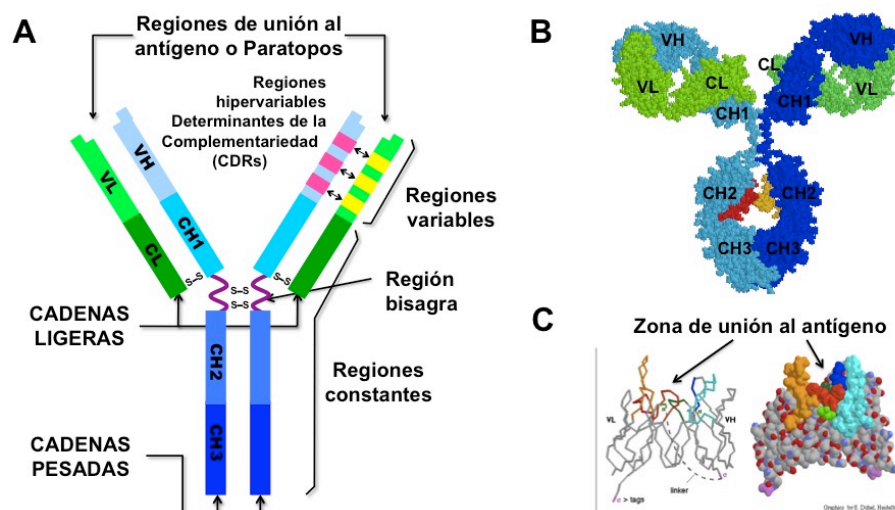


Figura 1

A: Representación esquemática de una molécula de inmunoglobulina G (IgG). B: Esquema tridimensional de la estructura globular de una IgG donde se indican la posición de las regiones variables (VL y VH) y las regiones constantes (CL y CH1, CH2 y CH3). En ambos casos las cadenas ligeras se muestran en verde, y las cadenas pesadas en azul. C: Esquema tridimensional de la disposición de las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) para dar lugar a la zona de unión al antígeno.

En las regiones variables la mayoría de las variaciones en la secuencia de aminoácidos están confinadas a unas regiones concretas que se denominan regiones hipervariables (Figura 1A). En la estructura tridimensional de los anticuerpos las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera quedan juntas formando una superficie que es la que determina el lugar de unión al antígeno, ya que forma una superficie complementaria a su superficie, por ello también se las denomina regiones determinantes de la complementariedad o CDR (complementary

determining regions). Existen tres regiones responsables de la complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) y son las responsables directas de la interacción con el epítipo. El resto de las regiones, también llamadas regiones del armazón, ayudan al correcto plegamiento y orientación de las CDRs para que su estructura tridimensional “encaje” perfectamente con el epítipo que reconocen (Figura 1C). En ellas hay ciertos residuos y características estructurales muy altamente conservados que ayudan a que a pesar de la alta variabilidad de secuencia se mantenga la estructura tridimensional del anticuerpo.

1.2. Diversidad del repertorio de anticuerpos

El repertorio de anticuerpos consiste en todos los anticuerpos que un individuo puede producir en respuesta a la inmunización primaria con un antígeno. Esto está determinado por el número de clones de células B que expresan anticuerpos con diferente especificidad (se estima que más de 10^9) y que existen previamente a la inmunización. Es decir que la información necesaria para generar el enorme y diverso repertorio de anticuerpos está presente en el ácido desoxiribonucleico (DNA, desoxyribonucleic acid) de cada individuo. Sin embargo, si cada una de las cadenas pesadas y ligeras de todas las inmunoglobulinas estuvieran producidas por un gen individual, más de un tercio del genoma que codifica para una proteína funcional sería necesario para generar las 10^9 especificidades diferentes, pero éste no es el caso. Existen diferentes mecanismos moleculares que contribuyen en diferente proporción a crear diversidad.

Los genes funcionales de las cadenas ligeras y pesadas de las moléculas de anticuerpo no existen como tales en el DNA genómico de las células germinales, sino que se acoplan durante la maduración de los linfocitos B. Estos genes son físicamente ensamblados por recombinación somática de diversos segmentos génicos (segmentos variables V, segmentos de unión J y segmentos de diversidad D) hasta completar la secuencia codificante de un par de genes, uno para la cadena ligera y otro para la cadena pesada (Tonegawa, 1983). Este es uno de los mecanismos de variabilidad que constituye la base de la gran diversidad de moléculas de anticuerpo que se pueden llegar a generar.

Otro mecanismo sería, la diversidad de unión, que consiste en que la

unión entre diferentes segmentos no se produce de manera exacta ya que el fenómeno de recombinación que los une puede darse en diferentes nucleótidos (Walter *et al.*, 1995). Asimismo, hay un mecanismo mediado por un enzima que añade nucleótidos, al azar, a los genes ya reorganizados de las inmunoglobulinas, este mecanismo contribuye sobretodo a la diversidad de la CDR3. Esta es la región más hipervariable ya que no requiere la conservación de ningún residuo estructural para mantener su estructura. Esta CDR, especialmente en la cadena pesada, es la que contribuye mayormente a la diversidad del repertorio. Finalmente, la combinación de diferentes cadenas pesadas y ligeras contribuye también a generar variabilidad. En conjunto estos mecanismos generan entre 10^9 y 10^{11} moléculas de anticuerpo diferentes, ocurren antes de que el antígeno aparezca y forman parte de la respuesta inmunitaria primaria (Abbas *et al.*, 1995).

Por último, en la respuesta inmune secundaria, se da el proceso de mutación somática al azar en los genes V que contribuye básicamente a la maduración de los anticuerpos. Durante este proceso sustituciones nucleotídicas o inserciones y deleciones (Goossens *et al.*, 1998; Ohlin y Borrebaeck, 1998; Wilson *et al.*, 1998) incrementan el repertorio de moléculas de anticuerpo permitiendo que se seleccionen los que han mejorado su afinidad por el antígeno (Berek y Milstein, 1987; Allen *et al.*, 1988).

Además de estos mecanismos de diversidad comunes a todos los vertebrados, en ciertas especies como el pollo (Reynaud *et al.*, 1987), la vaca (Parrng *et al.*, 1996) y el conejo (Becker y Knight, 1990) se consigue una mayor variabilidad en el repertorio de moléculas de anticuerpo por un mecanismo de conversión génica. También se ha descrito un mecanismo alternativo en la generación de diversidad del repertorio de anticuerpos de la oveja por mutación somática independiente del antígeno (Reynaud *et al.*, 1995).

1.3. Fragmentos de anticuerpo recombinantes

Los conocimientos actuales sobre la estructura de la molécula de anticuerpo y sobre las secuencias de los genes que las codifican, han hecho posible el diseño de oligonucleótidos específicos que usados como iniciadores para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase

Chain Reaction), permiten su amplificación y aislamiento (Orlandi *et al.*, 1989). Una vez aisladas las secuencias de los genes de las inmunoglobulinas pueden ser clonadas para, mediante expresión en diferentes sistemas heterólogos, obtener los anticuerpos recombinantes (Rabs) (Hoogenboom y Winter, 1992). Mediante ingeniería genética se pueden generar tanto moléculas de anticuerpo completas como fragmentos de anticuerpo más pequeños, con la única limitación de que mantengan su especificidad y capacidad de unión al antígeno.

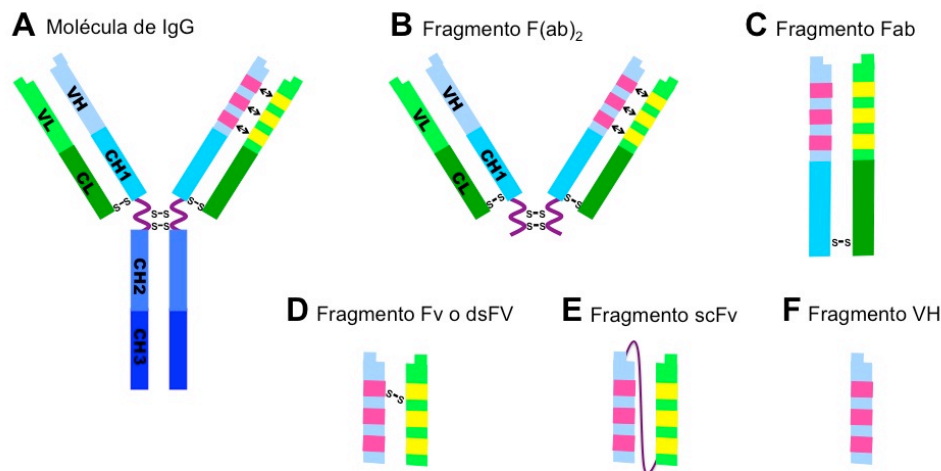


Figura 2

Representación esquemática de la estructura de una IgG (A) y de diferentes fragmentos de anticuerpo que es posible obtener a partir de ella, bien mediante proteólisis enzimática como los fragmentos F(ab)₂ (B) y Fab (C), bien mediante ingeniería de anticuerpos recombinantes como los fragmentos dsFv (D), scFv (E) y VH (F).

El desarrollo de la ingeniería de los anticuerpos ha permitido generar una amplia gama de fragmentos recombinantes de anticuerpos con capacidad de unión al antígeno y finalidades muy diferentes. Se han obtenido formatos bivalentes, como el fragmento F(ab)₂ (Figura 2B); monovalentes, como por ejemplo los fragmentos: Fab (fragmento de unión al antígeno) (Figura 2C), Fv o dsFv (fragmento Fv estabilizado por puentes disulfuro) (Figura 2D), fragmento scFv (cadena simple de fragmentos variables o single chain Fv fragment) (Figura 2E) y el fragmento VH (Figura

2F). Además, se pueden obtener fragmentos trivalentes y tetravalentes con la misma o con diferente especificidad (Figura 3). Igualmente se han construido Rabs fusionados a un amplio rango de moléculas, incluyendo: enzimas, toxinas, liposomas y biosensores (Figura 3). Algunos de estos fragmentos como F(ab)² y Fab pueden generarse también por digestión enzimática de la molécula de inmunoglobulina, en cambio los fragmentos scFv, dsFv, VH y todos sus derivados multivalentes o fusionados a otras moléculas, sólo pueden ser generados por ingeniería genética.

El fragmento Fv representa, después del dominio o fragmento VH (Davies y Riechmann, 1995), la unidad mínima de una molécula de anticuerpo con capacidad de unión al antígeno (Givol, 1991). Tiene un peso molecular de aproximadamente 25 Kda y los dominios VH y VL que lo forman están estabilizados por puentes disulfuro (Glockshuber *et al.*, 1990; Reiter *et al.*, 1995) por lo que también se le denomina fragmento dsFv.

El fragmento scFv o cadena simple de fragmentos variables es similar al fragmento Fv excepto en que los dos dominios VH y VL son sintetizados como un único polipéptido, estando covalentemente unidos por un pequeño péptido sintético o "linker" que hace de conector (Bird *et al.*, 1988; Glockshuber *et al.*, 1990). Este péptido conector es una entidad flexible que no altera la estructura de los dominios variables, su tamaño oscila entre 15 y 20 aminoácidos y suele ser rico en glicina y serina (Argos *et al.*, 1990). La orientación de los dominios VH y VL puede influir en la capacidad de unión al antígeno y su efecto puede variar según la secuencia de cada scFv y del péptido conector empleado (Desplancq *et al.*, 1994). El formato scFv tiene la ventaja, además de su pequeño tamaño, de que al sintetizarse en una sola molécula facilita la unión de los dos dominios variables y minimiza los problemas de plegamiento o disociación que se producen cuando las dos cadenas se sintetizan por separado. Por ello, la cadena simple de fragmento Fv o scFv es el formato de anticuerpo recombinante más simple y además el más utilizado en muchas de las aplicaciones de los Rabs.

Los avances en ingeniería de proteínas han permitido, siguiendo diversas estrategias, el diseño de fragmentos recombinantes de anticuerpos más complejos (Figura 2). Se han conseguido derivados bivalentes o biespecíficos (Dejonge *et al.*, 1995) mediante la unión de dos scFv con la misma o diferente especificidad. Ello se ha logrado mediante el

uso de un péptido de unión adicional que conecta el extremo carboxiterminal de una scFv con el extremo aminoterminal de otra (Mallender y Voss, 1994). Aunque la estrategia más efectiva para producir moléculas multiméricas ha sido la de reducir la longitud, de 9 a 5 residuos, del péptido conector que une la VH y VL de los fragmentos scFv. De esta forma no se permite el plegamiento en forma de scFv ya que queda una estructura más rígida que se puede unir a otra idéntica. Incluso se ha observado que en estos casos se pueden producir moléculas tri y tetravalentes.

Otra estrategia ha sido utilizar los propios dominios constantes de las inmunoglobulinas ya que de por sí tienden a formar oligómeros (Figura 2). También se han usado otros péptidos más pequeños como motivos de homo o hetero-dimerización, por ejemplo cremalleras de leucina (Kostelny *et al.*, 1992), hélices anfipáticas (Pack y Plückthun, 1992; Pack *et al.*, 1993) o estreptoavidina (Dübel *et al.*, 1995) (Figura 3). Asimismo, se pueden generar fragmentos scFv fusionados a enzimas, estreptoavidina u otras proteínas, incluso toxinas y biosensores de forma que puedan utilizarse para diferentes propósitos y en diferentes aplicaciones.

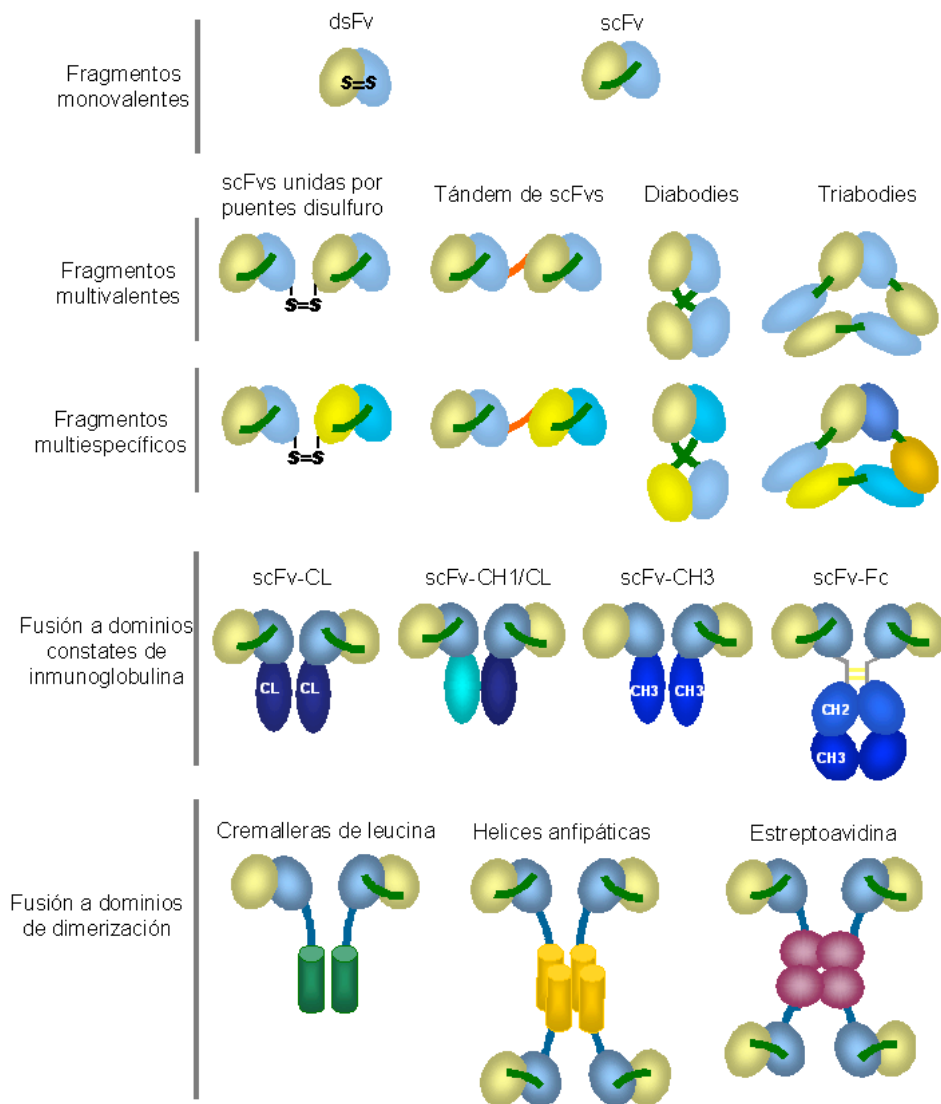


Figura 2
 Representación esquemática de diferentes fragmentos recombinantes de anticuerpo monovalentes, multivalentes y multiespecíficos, generados por fusión a distintos dominios proteicos. (O. Esteban. Tesis doctoral, Universidad de Valencia, 2001)

1.4. Obtención de anticuerpos convencionales y recombinantes

1.4.1. Anticuerpos policlonales y monoclonales

La vía clásica de producción de anticuerpos es la inmunización de animales, frecuentemente conejos o cabras, mediante inyección de antígenos vía intravenosa y/o intramuscular siguiendo un protocolo de inmunización (Harlow y Lane, 1988). Una vez inmunizado un animal y desencadenada la respuesta inmune, el conjunto de células B productoras de anticuerpos secretarán éstos al suero y líquidos intersticiales en una respuesta primaria denominada policlonal. Esta respuesta supone la formación de anticuerpos contra diferentes epítomos del antígeno, producidos cada uno de ellos por un clon determinado de linfocito B. El suero obtenido de estos animales, o antisuero, contiene anticuerpos específicos de diferentes epítomos del antígeno introducido, aproximadamente un 10%, pero también otros que forman parte de su patrimonio inmunitario con otras especificidades.

La tecnología de hibridomas (Kohler y Milstein, 1975) supuso un enorme avance ya que permitió obtener anticuerpos específicos de un único epítomo o determinante antigénico y producirlos de forma indefinida. Los denominados anticuerpos monoclonales son el producto de una célula de hibridoma procedente de la fusión de un linfocito B con una célula de mieloma de ratón. El hibridoma mantiene la capacidad de multiplicarse indefinidamente (propiedad de las células de mieloma) y de producir y secretar al medio de cultivo grandes cantidades de un único anticuerpo específico de un solo epítomo (propiedad de los linfocitos B). El hibridoma puede mantenerse en cultivo *in vitro*, ofreciendo la posibilidad de obtener de forma ilimitada y reproducible moléculas de anticuerpo idénticas.

1.4.2. Fragmentos de anticuerpo recombinantes

Como ya se ha mencionado, las secuencias que codifican los genes de anticuerpos pueden ser amplificadas, aisladas y clonadas (Hoogenboom *et al.*, 1992). Mediante expresión heteróloga se pueden generar fragmentos de anticuerpo que retengan totalmente su especificidad y capacidad de unión al antígeno. Para la obtención de las secuencias que codifican las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de la molécula de anticuerpo el primer paso es la obtención de

ácido ribonucleico mensajero (mRNA, messenger ribonucleic acid). Este mRNA inicial se puede obtener a partir de células de hibridomas ya establecidos productores de anticuerpos monoclonales con una determinada especificidad, a partir de linfocitos B de animales inmunizados o incluso de linfocitos B de animales no inmunizados (Figura 3).

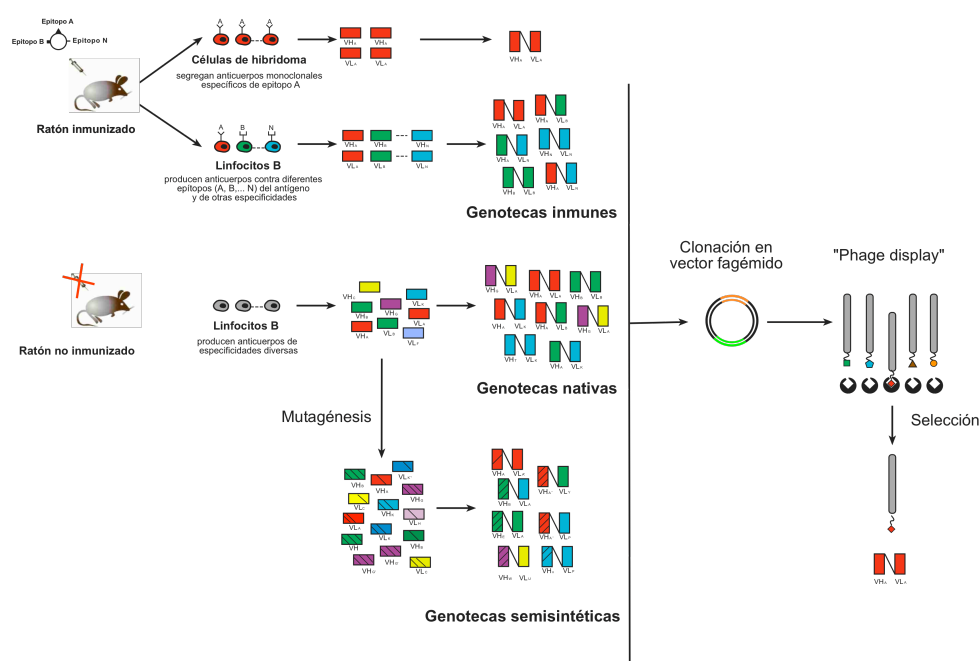


Figura 3
Estrategias empleadas para la obtención de fragmentos scFv específicos a partir de líneas celulares de hibridoma o de genotecas combinatoriales de fragmentos scFv.

Posteriormente mediante transcripción reversa del mRNA obtenido y con iniciadores específicos de las regiones variables de las inmunoglobulinas, se pueden generar fragmentos de DNA complementario (cDNA) que son de nuevo amplificados por PCR (Orlandi *et al.*, 1989). Los productos resultantes de la amplificación de las secuencias de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas se pueden clonar en vectores apropiados según el uso que se desee hacer de ellos. Cuando el mRNA inicial proviene de linfocitos B, con este proceso se obtiene una colección

diversa de secuencias codificantes de genes de anticuerpo o genoteca con especificidades diversas.

La traducción de estas secuencias de cDNA para generar moléculas proteicas capaces de unirse a un antígeno se puede realizar mediante algún huésped heterólogo o *in vitro*. Uno de los huéspedes más utilizados para generar fragmentos de anticuerpo son los bacteriófagos. Los dominios VH y VL, ya sea en formato scFv o Fab, pueden ser expresados como proteínas de fusión a las proteínas PIII o pVIII de la capsida del fago filamentoso M13 o de otros fagos. De esta forma, los fragmentos de anticuerpo quedan expuestos sobre la cubierta del fago y además resultan funcionales. Este proceso da lugar a la tecnología de exposición de proteínas en la superficie de fagos o “phage display” por su denominación en inglés (Figura 3) (Smith, 1985; McCafferty *et al.*, 1990). Esta tecnología permite, mediante ciclos de enriquecimiento frente a un antígeno determinado, seleccionar y separar del resto los fragmentos de anticuerpo específicos de ese antígeno. La aplicación de esta tecnología para la generación de bancos combinatoriales de secuencias VH y VL o genotecas, ha constituido un hito muy importante en la ingeniería de anticuerpos, que además permite almacenar y propagar fácilmente el DNA de los clones obtenidos (Hoogenboom, 2005). Igualmente se han utilizado otros huéspedes como levaduras (“yeast display”) (Kieckhefer *et al.*, 1997) o incluso células de mamífero (Ho *et al.*, 2006) para la expresión heteróloga de anticuerpos recombinantes y su posterior selección frente al antígeno de interés.

Además, también existe la posibilidad de realizar la traducción de las secuencias codificantes de los fragmentos de anticuerpo recombinantes *in vitro* sin utilizar ningún sistema celular, por ejemplo mediante las tecnologías conocidas como “ribosome display” o “mRNA display” (Hanes y Plückthun, 1997) por su denominación en inglés.

1.4.3. Genotecas de fragmentos de anticuerpo recombinantes

Existen diferentes tipos de genotecas o repertorios de fragmentos scFv disponibles: a) genotecas inmunes procedentes de células del bazo de ratones inmunizados, con lo cual los fragmentos scFv que contengan reconocerán principalmente a un antígeno determinado (Burton *et al.*, 1991; Persson *et al.*, 1991), b) genotecas nativas, en las que el repertorio

de secuencias de anticuerpo procede de células B de donantes no inmunizados (Marks *et al.*, 1991; Sheets *et al.*, 1998; Vaughan *et al.*, 1998; Söderlind *et al.*, 2001), por lo que los fragmentos scFv que contienen no tendrán una especificidad predeterminada y c) genotecas semisintéticas que están constituidas por moléculas de anticuerpo en las que uno o varios CDRs del dominio VH o VL han sido reemplazados por diversas combinaciones al azar de aminoácidos, creando así, artificialmente, gran diversidad de fragmentos scFv (Barbas *et al.*, 1992; Nissim *et al.*, 1994). A partir de genotecas de fragmentos scFv expresados en la superficie de fagos es posible seleccionar directamente fragmentos scFv altamente específicos, y que pueden reconocer un amplio repertorio de antígenos, comparables en afinidad a los anticuerpos generados por un animal en una respuesta inmune secundaria. Además, la afinidad y/o estabilidad de los fragmentos scFv seleccionados puede ser mejorada por mutagénesis dirigida o aleatoria (Jirholt *et al.*, 1998) o por implantación de CDRs (Söderlind *et al.*, 2000). De los repertorios así generados se realizará una reselección frente al antígeno y de este modo se pueden obtener nuevos fragmentos scFv de alta afinidad y con una variabilidad generada artificialmente que se añadiría a la existente en el repertorio innato del animal.

Estas técnicas además de evitar el uso de animales y el proceso de inmunización, permiten obtener fragmentos scFv con relativa rapidez. El no tener que pasar por un proceso de inmunización es especialmente ventajoso cuando se desea obtener anticuerpos contra moléculas poco inmunogénicas o incluso tóxicas para el animal. Además, las técnicas de selección permiten obtener fragmentos scFv contra epítomos poco inmunogénicos o poco abundantes.

1.5. Aplicaciones de los anticuerpos recombinantes: inmunomodulación

La alta afinidad y especificidad de los anticuerpos permite que cuando estas moléculas son expresadas en una célula u organismo puedan modular e incluso inhibir la función de la proteína o molécula frente a la que reaccionan. Esta característica los ha convertido en importantes herramientas para la investigación experimental pero también para aplicaciones médicas (Fischer *et al.*, 2003; Nölke *et al.*, 2003).

El primer ejemplo de su utilización en plantas fue en 1992 (Owen *et*

al., 1992), se expresó en plantas de tabaco un fragmento scFv específico de fitocromo. Semillas transgénicas de estas plantas mostraron un control aberrante de la germinación. Otros experimentos demostraron con éxito la modulación del metabolismo de flavonoides (Santos *et al.*, 2004) y de la biosíntesis de poliaminas (Nölke *et al.*, 2005) utilizando fragmentos scFv frente a enzimas clave de estas vías metabólicas. La función de hormonas de plantas como el ácido abscísico (Artsaenko *et al.*, 1995) o las giberelinas (Shimada *et al.*, 1999) también ha sido objeto de estudio mediante este sistema.

Su aplicación en la interferencia con patógenos fue demostrada por primera vez frente a *Artichoke Mottled crinkled virus* (AMCV) (Tavladoraki *et al.*, 1993). También se ha aplicado a otros patógenos como el phytoplasma causante del stolburn (Le Gall *et al.*, 1998) o frente a proteínas del estilete de nemátodos (Baum *et al.*, 1996). Además se han desarrollado fragmentos scFv específicos de *Fusarium* fusionados a péptidos antifúngicos que expresados en *Arabidopsis thaliana* conferían resistencia frente a dicho patógeno (Peschen *et al.*, 2004).

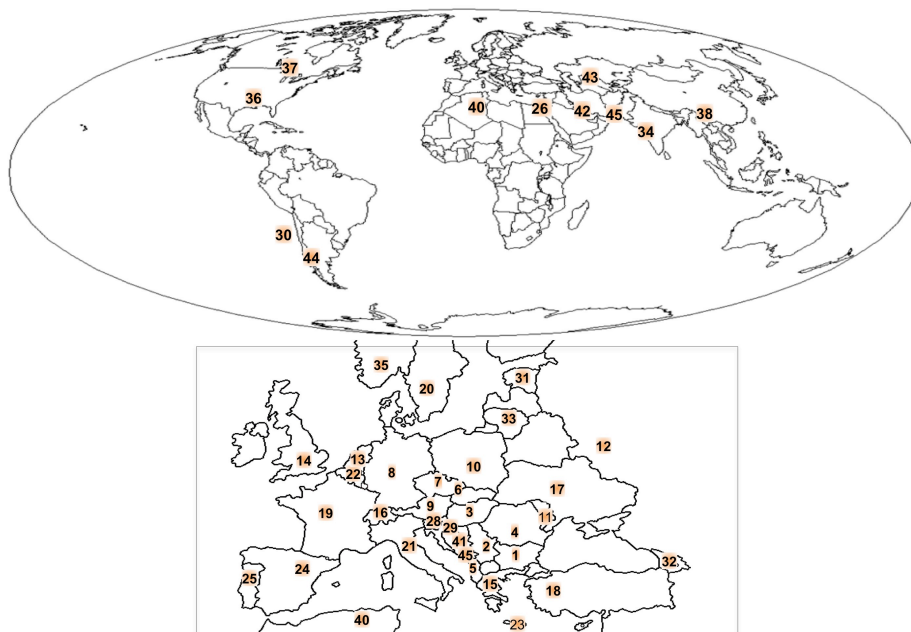
2. La enfermedad de la sharka y el *Plum pox virus*

2.1. Origen, distribución y síntomas de la enfermedad

La enfermedad de la sharka, una de las enfermedades más serias de las que afectan a las especies de *Prunus* (Cambra *et al.*, 2006a). La sharka se detectó por primera vez en 1917-18, en plantaciones de ciruelos y albaricoqueros en Bulgaria, pero su naturaleza viral no fue descrita hasta 1932, cuando Atanasoff (Atanassof, 1932) la llamó enfermedad de la "sharka" (viruela en lengua eslava). Desde entonces, el virus se ha dispersado progresivamente a gran parte del continente Europeo incluyendo la costa mediterránea y los países del este (Roy y Smith, 1994). Más recientemente, se ha encontrado tanto en América del sur como del norte (Chile, USA, Canadá y Argentina) (Levy *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 2001; Dal Zotto *et al.*, 2006) y en Asia (Kazakhstan, China y Pakistán) (Spiegel *et al.*, 2004; Navratil *et al.*, 2005; Kollerova *et al.*, 2006) (Figura 5).

Esta enfermedad afecta a las principales especies de frutales de hueso del género *Prunus*, especialmente al albaricoquero, ciruelo europeo y japonés, melocotonero, nectarino, almendro, cerezo y guindo (Llácer y

Cambra, 2006). Sin embargo, hay otras especies vegetales que, aunque no se han encontrado infectadas de forma natural, pueden hacerlo bajo condiciones experimentales.



- | | | |
|------------------------------------|-------------------------------|---|
| 1. Bulgaria (1917) D, M | 17. Ukraine (1967) | 33. Lithuania (1995) D |
| 2. Serbia (1935) D, M, Rec | 18. Turkey (1968) D, M, Rec | 34. India (1995) |
| 3. Hungary (1938) D, M, C | 19. France (1970) D, M, C | 35. Norway (1998) D |
| 4. Rumania (1941) D, M, Rec, C | 20. Sweden (1970) | 36. United States of America (1999) D |
| 5. Albania (1947) D, M, Rec | 21. Italy (1973) D, M, Rec, C | 37. Canada (2000) D, W |
| 6. Slovakia (1950) D, M, Rec | 22. Belgium (1974) D | 38. China (2000) |
| 7. Czech Republic (1952) D, M, Rec | 23. Cyprus (1982) M | 39. Jordan (2001) M |
| 8. Germany (1956) D, M | 24. Spain (1984) D | 40. Tunisia (2002) D |
| 9. Austria (1961) D | 25. Portugal (1984) D | 41. Bosnia y Herzegovina (2004) D, M, Rec |
| 10. Poland (1961) D, M | 26. Syria (1986) D, M | 42. Iran (2004) |
| 11. Moldova (1962) C | 27. Egypt (1987) EA | 43. Kazakhstan (2004) D |
| 12. Russia (1962) D, C | 28. Slovenia (1987) D, M | 44. Argentina (2004) D |
| 13. The Netherlands (1965) D | 29. Croatia (1988) D, M | 45. Pakistan (2006) D, Rec |
| 14. United Kingdom (1965) D | 30. Chile (1992) D | 46. Montenegro (2007) D, M, Rec |
| 15. Greece (1967) D, M | 31. Estonia (1994) | |
| 16. Switzerland (1967) | 32. Georgia (1994) | |

Figura 5

Situación de dispersión mundial de la enfermedad de la sharka. Los números del mapa indican el orden de aparición de la enfermedad, entre parentesis se muestra el año de la primera detección o descripción, también se indica a continuación se indican los tipos de aislado existentes en cada país. (Las referencias se encuentran en EPPO Bulletins vol. 4(1) 1974, vol. 24 (3) 1994 and vol. 36 (2) 2006).

Dentro de estas últimas se encuentran diversas especies del género *Nicotiana* (*N. benthamiana*, *N. clevelandii* y *N. occidentalis*), y las especies *Pisum sativum* y *Chenopodium foetidum* (Németh, 1986; Virscek Marn et al., 2004; Llácer, 2006). El ciclo vegetativo corto de estas plantas, en contraposición al de los frutales de hueso, hace de ellas una herramienta indispensable para el estudio biológico y molecular de la infección por PPV.

Los síntomas de la sharka varían mucho según el aislado, el huésped, la localización geográfica y la época del año. En frutales, los primeros síntomas aparecen en primavera en forma de anillos y manchas cloróticas en algunas hojas. En los frutos suelen aparecer manchas, anillos, depresiones y deformaciones, además, en el caso del albaricoquero pueden presentar anillos en los huesos, mal sabor y una caída precoz (Llácer y Cambra, 2006). Los síntomas producidos en los frutos impiden muchas veces su consumo en fresco y su utilización en la industria. En herbáceas los síntomas se caracterizan por manchas cloróticas en las hojas, y deformaciones cuando la infección está muy avanzada. En el caso de los árboles frutales, muchos de ellos no presentan síntomas los primeros años de la infección lo que resulta especialmente peligroso para la dispersión de la enfermedad.

La condición de pandemia de la enfermedad de la sharka y su importancia socioeconómica debido a las pérdidas económicas que produce (Cambra et al., 2006a), han impulsado una intensa actividad investigadora encaminada no solo a mejorar las técnicas para su diagnóstico sino también la gestión y control de la enfermedad, tratando de conocer los aspectos básicos de la biología molecular del virus y su interacción con sus hospedadores naturales o experimentales.

2.2. El agente causal: *Plum pox virus*.

2.2.1. Replicación y expresión del genoma viral.

El agente causal de la enfermedad de la sharka es el *Plum pox virus* o PPV, es miembro del género *Potyvirus* de la familia *Potyviridae*. El genoma de PPV, como el resto de potyvirus, consiste en una molécula de RNA de cadena simple y polaridad positiva, que se encapsida formando partículas flexuosas y en forma de varilla de aproximadamente 660-750 nm

de longitud y 12,5-29 nm de anchura (Figura 6A). El RNA genómico de PPV está formado por 9786 nucleótidos en la mayoría de aislados, además tiene una proteína 5' terminal (VPg) y una cola de poly A en el extremo 3' terminal (Figura 6B).

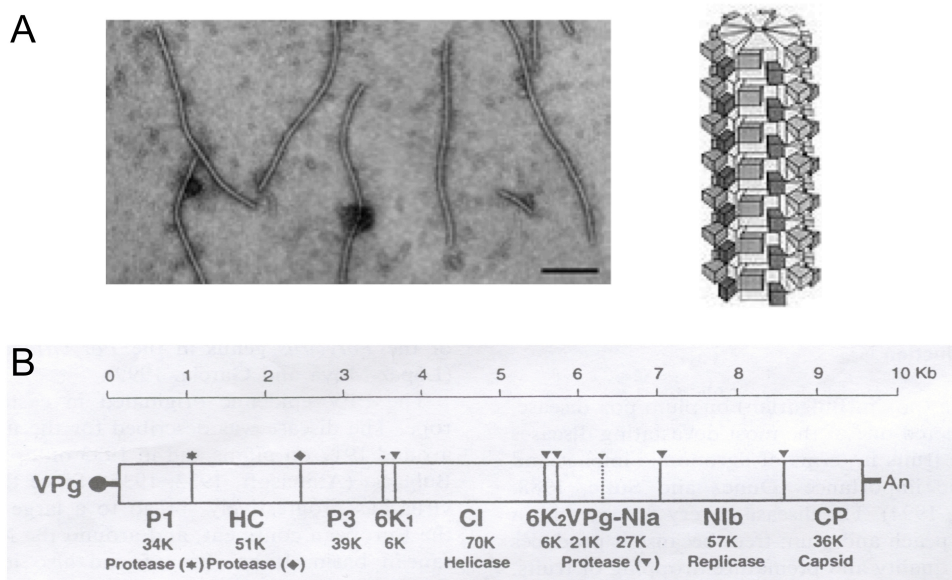


Figura 6
Microfotografía de partículas víricas de PPV y diagrama esquemático de su estructura en forma de varilla (panel A). Esquema del genoma viral donde se indican las proteínas codificadas, su tamaño (K=Kda) y los lugares dónde cortan las diferentes proteasas virales (panel B).

En el genoma de PPV existe una única y larga pauta de lectura abierta (ORF, "open reading frame"), que se inicia desde el segundo codón AUG dando lugar a una única poliproteína de aproximadamente 355 Kda y dejando sin traducir una región de aproximadamente 220 aminoácidos, no codificante en el extremo 3'. Una vez traducida la poliproteína se inicia un proceso en cascada por la acción de al menos 3 proteasas generándose como mínimo 10 productos proteicos maduros (Figura 6B): las proteínas P1, HCPro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, N1a, N1b y la proteína de la capsida (CP, capsid protein) (Merits *et al.* 2002). Recientemente se ha descubierto una nueva ORF más corta, alojada dentro del cistron P3 de la poliproteína

y que se traduce en una pauta de lectura con dos aminoácidos de desplazamiento (Chung *et al.*, 2008). Esta ORF se denomina pippo, y su secuencia está muy conservada entre los virus de la familia *Potyviridae*.

Las proteínas P1 y HCPro son, respectivamente, serina y cisteína proteasa, que cortan en su propio extremo C-terminal (García *et al.*, 1993). El procesamiento de la zona central y carboxi terminal de la poliproteína de PPV es llevada a cabo por el dominio proteasa C-terminal de la proteína NIa (García *et al.*, 1989). El dominio N-terminal de la proteína NIa. El proceso de maduración de la poliproteína de PPV es un proceso que está, muy probablemente, altamente regulado y tiene un papel muy relevante en el control de la infección de PPV. Una característica importante de la proteasa NIa de los Potyvirus es la especificidad de cada una por su propio lugar de corte (García y Laín, 1991; Parks y Dougherty, 1991). Esto resulta de gran interés para aplicaciones biotecnológicas, y se ha explotado en el desarrollo de vectores de expresión derivados del genoma de PVV (García *et al.*, 2006).

La NIB es una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp: "RNA dependent RNA polymerase") y se considera la responsable de la replicación del genoma de los potyvirus (Hong y Hunt, 1996) utilizando la proteína VPg como cebador. La actividad replicasa completa no ha sido purificada, aunque si se ha conseguido la replicación *in vitro* utilizando extractos de células infectadas enriquecidas con fracciones de membrana de RE y de vesículas del tonoplasto (Martín y García, 1991). Estos resultados indicarían que el complejo de replicación requiere la interacción diversas proteínas virales, aunque seguramente también de la planta, que todavía no ha sido totalmente identificadas. En el caso de TEV se ha propuesto que, en el direccionamiento de los complejos de replicación a los lugares de replicación en las membranas del RE, interviene la proteína 6K2. Mediante análisis mutacional se ha visto que para la amplificación de genoma viral de "*Tobacco vein mottling virus*" (TVMV) también se requiere la proteína P3 (Klein *et al.*, 1994). La proteína CI de PPV tiene actividad NTPasa y helicasa (Laín *et al.*, 1990; Fernández *et al.*, 1995), ambas requeridas para la función de replicación del RNA viral (Fernández y García, 1997). Otros estudios muestran que esta proteína de PPV (Gómez De Cedron *et al.*, 2006) y otros potyvirus (Carrington *et al.*, 1998) parece estar involucrada en el movimiento célula a célula.

La proteína HCPro de los potyvirus, inicialmente PVY y TEV, fue la primera proteína que se demostró que interfería con el mecanismo de defensa de las plantas mediado por silenciamiento del RNA (Brigneti *et al.*, 1998; Kasschau y Carrington, 1998; Anandalakshmi *et al.*, 2000), posteriormente ha sido confirmado también para PPV y otros potyvirus (Tenllado *et al.*, 2003; Varrelmann *et al.*, 2007). Asimismo se ha relacionado a esta proteína con la amplificación del genoma, el movimiento viral (Kasschau *et al.*, 1997), y la transmisión por pulgones (Berger *et al.*, 1989; Wang, R. Y. *et al.*, 1998b; Ruiz-Ferrer *et al.*, 2005).

La CP tiene como principal función la encapsidación del genoma viral, pero al igual que el resto de proteínas potyvirales, se han descrito su relación con otras funciones, como son el movimiento célula a célula, el movimiento a larga distancia en la planta o la transmisibilidad por pulgón mediante su interacción con HCPro.

2.2.2. Compartimentalización celular de las proteínas virales

Las proteínas de PPV al igual que del resto de los potyvirus se acumulan en diferentes compartimentos celulares de las células infectadas dando lugar a estructuras características de la infección con estos virus, como ya señalaron las primeras observaciones de células infectadas realizadas (Van Oosten y Van Bakel, 1970; Hiebert *et al.*, 1984; Martín *et al.*, 1992).

La proteína CI, denominada así porque se acumula en el citoplasma formando inclusiones citoplásmicas (CI, cytoplasmic inclusions) cilíndricas, en forma de molinete, que son uno de los síntomas típicos de la infección por potyvirus, y también se han visto asociadas a plasmodesmos en estudios realizados con otros potyvirus (Rodríguez-Cerezo *et al.*, 1997; Roberts *et al.*, 1998).

Las proteínas N1b y N1a, denominadas así por los términos en inglés "nuclear inclusions" (NI), se asocian formando inclusiones cristalinas principalmente en el núcleo, aunque también lo hacen en el citoplasma (Martín *et al.*, 1992). En algunos potyvirus como el *Tobacco etch virus* (TEV) se han identificado y caracterizado secuencias de señalización nuclear (NLS, nuclear signalling sequences) en las secuencias de las proteínas N1a y N1b. Además, se ha comprobado, mediante fusión a una proteína marcadora, que la NLS de la proteína N1a de dicho virus resulta

eficaz para el transporte al núcleo de dicha proteína (Carrington *et al.*, 1991).

La acumulación intracelular del resto de proteínas no estructurales de PPV es menos evidente, aunque la colocalización de algunas de ellas con las inclusiones cristalinas se ha descrito en ocasiones (Martín y Gélie, 1997).

2.3. Epidemiología

La enfermedad de la sharka se encuentra en casi todos los países en los que hay una importante producción de frutales de hueso. El tráfico ilegal de material vegetal y la falta de controles más exhaustivos a la hora de intercambiar material de propagación aparentemente sano, suponen la principal vía de dispersión de PPV a larga distancia. Una vez que la sharka se ha establecido en un área, la diseminación a corta distancia es realizada por diversas especies de pulgones de forma no persistente. En las condiciones españolas mediterráneas, *Aphis spiraecola*, *A. gossypii* y *Myzus persicae* son los principales vectores responsables de la dispersión natural de la enfermedad (Capote *et al.*, 2008).

Existen varios tipos de aislados de este virus, que varían en su sintomatología, epidemiología y agresividad. Estas diferencias han sido serológica y molecularmente descritas (Cambra, *et al.*, 2006a; Candresse y Cambra, 2006; James y Glasa, 2006) dando lugar a 6 tipos: PPV-D (Dideron), PPV-M (Marcus), PPV-C (Cherry), PPV-EA (El Amar), PPV-W (Winona) y PPV-Rec (recombinante entre D y M). De todos ellos, los tipos más ampliamente extendidos son PPV-D y PPV-M, su principal diferencia reside en la capacidad de infectar melocotonero. Los aislados tipo M se caracterizan, en general por su mayor agresividad, más rápida dispersión y por causar síntomas mucho más graves en hojas, flores y frutos de melocotonero que los aislados tipo D. El tipo PPV-EA (Myrta *et al.*, 2006) de Egipto es mucho menos frecuente y está limitado a determinadas áreas geográficas. El tipo PPV-C (Fanigliulo *et al.*, 2003), que infecta cerezos, y el PPV-W de Canadá (James y Varga, 2005) son grupos más divergentes. El tipo PPV-Rec (Glasa *et al.*, 2004), fue el último descrito, está ampliamente extendido y sus aislados se caracterizan por derivar de un evento único de recombinación cuyo punto de rotura se localiza en el gen de la NIB replicasa. Por último se describió un posible nuevo tipo (Serçe *et al.*, 2009)

formando por diversos aislados de Turquía, por lo que se le denomina PPV-T, y que se caracterizarían por un evento único de recombinación en la secuencia de la proteína HC-Pro .

En España únicamente existe dispersión de aislados tipo PPV-D. Estos aislados causan daños en albaricoquero (*Prunus armeniaca*) y en ciruelo europeo (*P. domestica*), produciendo graves pérdidas en variedades tempranas de los mismos, pero afecta poco a ciruelo japonés (*P. salicina*). Sin embargo, no se dispersan de forma naturalmente entre cultivares de melocotonero y tampoco infectan a almendros y cerezos. En julio de 2002 fue detectado en España (Aragón) un aislado tipo M, pero fue rápidamente erradicado de la zona impidiéndose así su dispersión (Cambra M.A. *et al.*, 2003).

3. Estrategias de control de las enfermedades virales

Una vez que los virus consiguen sobrepasar los mecanismos de defensa de las plantas es difícil la curación de las enfermedades que provocan al no ser efectivos los tratamientos químicos contra ellos sin afectar también a las células vegetales. Por todo ello las enfermedades virales causan serios problemas e importantes pérdidas económicas en la producción agrícola en todo el mundo.

Las medidas preventivas, que incluyen un buen control sanitario, la utilización de material libre de virus para la propagación vegetativa y como fuente de semillas, son especialmente importantes en zonas donde la enfermedad no ha sido introducida. La aplicación de programas de cuarentena y erradicación, y el control de los vectores que transmiten los virus son fundamentales para evitar la propagación de la enfermedad en zonas con baja incidencia de la misma. Sin embargo, la estrategia más duradera y definitiva en la lucha contra las virosis vegetales es la utilización de cultivares resistentes a la enfermedad. Por todo ello se invierten numerosos recursos tanto materiales como económicos en la búsqueda y obtención de plantas resistentes a virus.

Los métodos clásicos de cruzamientos genéticos se ven limitados en ocasiones por la escasez de fuentes de resistencia en parentales compatibles, o por la naturaleza poligénica de algunos caracteres de resistencia. Pero además existe el inconveniente de que además de ser resistentes deben mantener características agronómicas adecuadas.

Los métodos biotecnológicos basados en la transformación genética, que permite la introducción de secuencias génicas en plantas independientemente de su origen, han ampliado enormemente las posibilidades de obtener plantas resistentes a virus. Estos métodos permiten transferir genes de resistencia naturales entre especies no compatibles, y así crear nuevas variedades resistentes. Asimismo se pueden transferir genes o secuencias heterólogas cuyas expresión tenga actividad antiviral en su más amplio sentido, en algunos casos por interferencia con alguna función viral y en otros por el desencadenamiento de las reacciones de defensa de la planta que se inducen de forma natural en respuesta a infecciones virales.

Las principales ventajas de la obtención de resistencia mediante plantas transgénicas es que se pueden aplicar a cultivares de interés agronómico sin alterar sus propiedades fenotípicas, y también que el mismo gen o secuencia se pueden aplicar a diferentes especies afectadas por el mismo virus

3.1. Resistencia a virus en plantas transgénicas que expresan secuencias virales

La resistencia derivada del patógeno (PDR, pathogen derived resistance”) (Sanford y Johnston, 1985) es un fenómeno por el cual la expresión en plantas de genes o secuencias génicas de un patógeno protege de los efectos producidos por la infección de dicho patógeno o incluso patógenos relacionados.

Esta aplicación se demostró que funcionaba contra virus de plantas por primera vez mediante la expresión del gen de la CP de *Tobacco mosaic virus* (TMV) en plantas de tabaco (Powell *et al.*, 1989) y de tomate (Nelson *et al.*, 1988). La efectividad práctica de la PDR para controlar virus (Nelson *et al.*, 1987) de plantas se ha establecido de forma firme a través de numerosos estudios independientes en los que se han conseguido plantas resistentes a casi todas las familias de virus de plantas en numerosos cultivos (Voinnet, 2001; Lindbo y Dougherty, 2005; Macdiarmid, 2005).

Inicialmente se pensó que la proteína tenía que ser expresada para producir resistencia. Pero más tarde se ha demostrado que la mayoría de los casos la resistencia inducida por los transgenes virales está mediada

por el RNA a través del mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS, "Post-transcriptional gen silencing"), o también denominado silenciamiento del RNA y considerado como un mecanismo de defensa de la planta frente a virus (Voinnet, 2001; Lindbo y Dougherty, 2005; Voinnet, 2005; Waterhouse y Fusaro, 2006). La inducción del silenciamiento del RNA por un transgen viral causa la degradación específica del genoma del virus invasor, que ha de tener una alta homología de secuencia con el transgen introducido en la planta. De todo ello resulta un fenotipo resistente a la enfermedad.

Para conferir resistencia mediante este mecanismo se han utilizado construcciones de genes virales completos o truncados de las proteínas CP, RdRp, proteasas y proteínas de movimiento (MP, movement protein); secuencias de RNA satélite, RNA defectivos interferentes y regiones no codificante; secuencias de DNA repetidas e invertidas de forma que generen RNA de doble cadena (dsRNA). A pesar de los tremendos avances en este campo la única forma de identificar fenotipos resistentes es de forma empírica, lo que implica la transformación de plantas y la posterior realización de ensayos de protección.

3.2. Resistencia a virus en plantas transgénicas que expresan secuencias de naturaleza no viral

Existen estrategias que han utilizado multitud de recursos genéticos de naturaleza diversa para generar plantas resistentes a virus. En primer lugar se han transferido con éxito genes de resistencia entre diferentes especies. Por ejemplo, se ha obtenido resistencia a TMV mediante la introducción del gen *N* de tabaco a plantas de tomate (Whitham *et al.*, 1996), y la introducción del gen *w5* de tomate en plantas de tabaco confirió resistencia a toposvirus (Spassova *et al.*, 2001). Más recientemente se ha demostrado que la evolución genética artificial se puede usar para incrementar la efectividad de este tipo de transgenes de resistencia natural (Farnham y Baulcombe, 2006).

Asimismo se pueden utilizar genes de inhibidores naturales de alguna función viral. Posibles candidatos son las proteínas inactivadoras de la actividad de los ribosomas, aisladas de diversos órganos de *Phytolacca americana*, y que inactivarían la traducción a proteína de los

genomas virales. Aunque estas proteínas serían potencialmente tóxicas también para las células de la planta, se han obtenido mediante ingeniería genética variantes menos tóxicas que confieren resistencia a virus al ser expresadas en plantas (Wang, P. G. *et al.*, 1998; Zoubenko *et al.*, 2000; Van Damme *et al.*, 2001). Otras estrategias incluyen el uso del enzima de mamíferos 2',5'-oligoadenilato sintetasa (Truve *et al.*, 1993), uno de los componentes de la vía de degradación de RNA implicada en actividad antiviral inducida por interferones en células de mamíferos. Igualmente se han transformado plantas de tabaco con inhibidores de cisteína proteinasas para obtener resistencia frente a potyvirus (Gutiérrez-Campos *et al.*, 1999)

En los últimos años la expresión de anticuerpos recombinantes específicos de proteínas virales está siendo objeto de una gran atención (Prins *et al.*, 2008).

3.3. Estrategias de control del virus de la sharka

La dispersión de la enfermedad de la sharka no puede ser frenada de forma eficiente mediante la aplicación de insecticidas para el control de los pulgones vectores de su agente causal. Esto es debido a que PPV, al igual que otros potyvirus, es transmitido de forma no persistente, y en consecuencia, el virus puede ser inoculado por pulgones virulíferos durante periodos muy cortos de prueba previos a la alimentación.

PPV ha sido reconocido como el principal patógeno que afecta a los frutales de hueso e incluido en las listas oficiales de cuarentena. De hecho, en muchos países PPV está sometido a un control estricto (Lebas *et al.*, 2006; Levy, 2006), basado principalmente en medidas de cuarentena, programas de erradicación, uso de material certificado y libre de virus, etc. Estas medidas de contención, sobretodo la erradicación, son especialmente útiles en lugares donde los niveles de infección son moderados y bajos. Sin embargo, para que éstas tengan éxito han de aplicarse poco tiempo después de la introducción de la enfermedad en una región o país, y además es importante que haya un control estricto en su aplicación. Al mismo tiempo requieren de medios tecnológicos que permitan la detección fiable y en momentos iniciales de la enfermedad, y también el apoyo tanto político como de los agricultores para su ejecución.

Por ejemplo, en grandes áreas de Canadá y Estados Unidos se están llevando a cabo desde el año 2000 dos programas diferentes con la intención de erradicar la enfermedad (Gottwald, 2006; Ramel *et al.*, 2006). Aunque a pesar de todos los controles, en muchos países se ha pasado de una fase de erradicación insatisfactoria a tener que establecer medidas de contención para el control de la enfermedad (Mumford, 2006; Myrta *et al.*, 2006). Un buen complemento a las medidas de cuarentena y erradicación sería la utilización de material vegetal con certificación de que está libre de virus.

En los lugares en los que la enfermedad ya está muy extendida no son útiles las medidas de contención. Por ello, paralelamente a estas medidas de control, numerosos esfuerzos en diversos países están focalizados al desarrollo de cultivares de *Prunus* resistentes a PPV. Se han explorado tanto estrategias de cruzamientos clásicos, aprovechando resistencias naturales, como estrategias basadas en las últimas técnicas biotecnológicas.

En albaricoquero y ciruelo, se han identificado algunas fuentes de resistencia en especies de interés agronómico y los progresos en la mejora genética están más avanzados (Badenes y Llácer, 2006; Decroocq *et al.*, 2006; Hartmann y Neumüller, 2006; Karayiannis, 2006; Thompson, 2006). Por el contrario, a pesar del rastreo masivo de germoplasma de melocotonero no se han podido encontrar fuentes de resistencia. Actualmente los esfuerzos se centran en utilizar la resistencia identificada en *P. davidiana* mediante hibridación interespecífica (Decroocq *et al.*, 2005).

Paralelamente, se han explorado vías alternativas para generar plantas resistentes a PPV. Las principales estrategias llevadas a cabo se han basado en la obtención de plantas transgénicas que expresan secuencias virales y que inducen resistencia frente al virus. Inicialmente el gen de la CP fue el más utilizado en los intentos por inducir este tipo de resistencia. Mediante dicha estrategia se obtuvieron plantas transgénicas de *Nicotiana* resistentes a PPV (Regner *et al.*, 1992; Ravelonandro *et al.*, 1993; Jaquet *et al.*, 1998). En general, el grado de resistencia era inversamente proporcional al nivel de acumulación de CP, por lo que el mecanismo debe estar mediado por el silenciamiento e inducido por el RNA viral. Posteriormente estas estrategias se han aplicado a especies de

Prunus. Este último es el caso de los ciruelos transgénicos C5 (Ravelonandro *et al.*, 1997; Scorza y Ravelonandro, 2006) cuya resistencia ha sido probada también en condiciones naturales de campo (Hily *et al.*, 2004; Malinowski *et al.*, 2006).

Además existen otros ejemplos, en plantas herbáceas, de obtención de resistencia a PPV mediante la transformación con secuencias de otras proteínas virales (Wittner *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 1998; Tavert-Roudet *et al.*, 1998; Barajas *et al.*, 2004; Di Nicola-Negri *et al.*, 2005; Zhang S.C. *et al.*, 2006) en las que también se establecen fenómenos de silenciamiento.

A pesar del éxito de estas estrategias, la existencia de las proteínas supresoras de silenciamiento, codificadas por los propios genomas virales, entre ellas la HC-Pro de potyvirus, cuestionan la durabilidad de este tipo de resistencias a largo plazo. Por ello resulta de especial interés la evaluación de vías alternativas y/o complementarias, como puede ser la expresión de anticuerpos recombinantes específicos de PPV, para inducir resistencia. Y aunque sus aplicaciones en patología vegetal son todavía limitadas tiene a su favor el hecho de que no implica el genoma viral.

OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

En la introducción previa se ha puesto en evidencia la importancia de la enfermedad de la sharka. La utilización de cultivares resistentes es una estrategia crítica para el control a largo plazo de dicha enfermedad.

En la actualidad se llevan a cabo diversos programas de mejora genética para obtener variedades resistentes que tengan a la vez características agronómicas adecuadas. La principal limitación de esta estrategia es el largo proceso que implica la selección de híbridos resistentes con aceptable comportamiento agronómico y adaptados a las condiciones locales y que puede tardar mucho tiempo en dar sus frutos. Además, se han aplicado con éxito estrategias basadas en la transformación genética con secuencias del genoma viral, obteniéndose ciruelos resistentes a la enfermedad. Sin embargo, la posibilidad de pérdida de la resistencia debida los supresores de silenciamiento que conlleva esta aproximación induce a la búsqueda de nuevas vías alternativas y/o complementarias de generar resistencia.

La expresión en plantas de anticuerpos específicos de proteínas virales con la intención de inmunomodular su actividad ha resultado útil para interferir con la infección en distintos virus de animales y humanos. Su utilización en virología vegetal empieza a ser cada vez de más interés, puesto que no sólo representa una prometedora estrategia para obtener plantas resistentes a la sharka, si no que además puede utilizarse para profundizar en el conocimiento de la biología molecular de su agente causal *PPV*.

En función de estos antecedentes se ha planteado el objetivo general de evaluar la capacidad de fragmentos de anticuerpo recombinantes específicos de *PPV* de interferir con la infección viral mediante su expresión en plantas. Este objetivo general se puede dividir en los siguientes objetivos específicos que han sido abordados en los diferentes capítulos de la presente memoria de tesis doctoral:

1. Obtención de plantas de líneas transgénicas de *Nicotiana benthamiana* que expresen versiones del fragmento recombinante scFv2A específico de la NIb replicasa de PPV dirigidas a diferentes compartimentos celulares: el citoplasma (scFv2A), la membrana del retículo endoplásmico (6K2scFv2A) y el núcleo (NLSscFv2A).
2. Evaluación de la protección conferida por la expresión de dichos fragmentos recombinantes frente a la infección por el virus de la sharka, mediante diferentes métodos de inoculación viral.
3. Evaluación del nivel de acumulación y duración de la expresión transitoria, mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, de los fragmentos scFv2A en hojas de *Nicotiana benthamiana*.
4. Establecimiento de un sistema rápido y cuantitativo para la evaluación de la capacidad de fragmentos scFv específicos de PPV de interferir con la infección viral.

CAPÍTULO 1

“Obtención de plantas transgénicas estables de *Nicotiana benthamiana* que expresan fragmentos scFv específicos de N1b replicasa de *Plum pox virus*”

1. INTRODUCCIÓN

Desde que se demostró la posibilidad de generar moléculas funcionales de anticuerpos en plantas y que éstas retenían sus propiedades de unión a su antígeno (Hiatt *et al.*, 1989; Düring *et al.*, 1990) se han sucedido un gran número de trabajos en los que se han expresado con éxito diferentes versiones de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo recombinantes (Rabs): anticuerpos completos (Voss *et al.*, 1995; Baum *et al.*, 1996), fragmentos Fab (De Neve *et al.*, 1993; De Wilde *et al.*, 1996), fragmentos scFv (Owen *et al.*, 1992; Bruyns *et al.*, 1996) y fragmentos scFv biespecíficos (Artsaenko *et al.*, 1995) entre otros. Su expresión, además, ha sido dirigida tanto a compartimentos intra como extra celulares.

La expresión en plantas de anticuerpos recombinantes tiene fundamentalmente dos finalidades. En un primer caso, las plantas se utilizan como sistemas de expresión heteróloga y los Rabs producidos se utilizarán fuera de ellas, como herramientas de diagnóstico o en aplicaciones terapéuticas (Marasco, 2001; Giddings *et al.*, 2000; Fischer *et al.*, 2003) entre otros. En un segundo caso, el objetivo sería el de inmunomodular o inducir cambios en algún proceso o función de la planta en la que son expresados. El proceso que se desea modificar depende normalmente de una molécula, generalmente una proteína, a la que el Rab reconoce, a la cual se une de forma específica y modifica su función (Conrad y Manteuffel, 2001; Jobling *et al.*, 2003; Miroshnichenko *et al.*, 2005; Gahrtz y Conrad, 2009). Dependiendo de la finalidad o el uso que se quiera hacer de ellos, se escogerá la producción de Rabs completos o de diferentes fragmentos recombinantes de anticuerpo, y su expresión será dirigida al compartimento celular más adecuado.

La vía natural de síntesis de los anticuerpos en las células de mamíferos es la vía secretora. Las cadenas de Ig se sintetizan como precursores que son transportados al lumen del retículo endoplásmico (RE) al que son dirigidos mediante secuencias señal. Después de eliminar esas secuencias en el retículo, se unen a ellos las chaperoninas que ayudan a su correcto plegamiento y ensamblaje dando lugar a la molécula completa de anticuerpo. Posteriormente, los anticuerpos son secretados al espacio extracelular, o permanecen unidos a la membrana citoplasmática, donde actuarán de receptores. Este proceso puede darse también en

células vegetales. Los Rabs se pliegan y ensamblan de forma eficiente en el RE de células de plantas (Hiatt, 1990; Ma *et al.*, 1995), ya que existen chaperoninas homólogas a las del RE de las células de mamíferos (Nuttall *et al.*, 2002) y a que las secuencias señal de direccionamiento al RE y posteriormente a la vía secretora son reconocidas independientemente de su origen (Denecke *et al.*, 1992). En cambio, el citoplasma no es un buen compartimento para la expresión de Rabs, ya que su ambiente reductor no es el más adecuado para favorecer el plegamiento y por tanto, el buen funcionamiento de los mismos. De hecho, sólo se ha conseguido expresar Rabs completos dirigiendo su expresión al RE y posteriormente al apoplasto.

No obstante, para muchos de los usos a los que se destinan los Rabs, especialmente en inmunomodulación, la región de anticuerpo que resulta crucial es únicamente el sitio de unión al antígeno, es decir, los dominios variables situados en la región N-terminal de cada una de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) que forman la Ig. En estos casos resultan más útiles formatos como las cadenas únicas de fragmentos variables de anticuerpo ó scFv (del inglés "single chain variable fragment"). Estos fragmentos no requieren procesamiento post-traducciona ni ensamblaje de varias cadenas, como requieren los anticuerpos completos. Además, para su uso en inmunomodulación, su menor tamaño respecto de la molécula completa de anticuerpo, facilita que puedan unirse e interferir con epítomos crípticos, no superficiales en la estructura del antígeno. Pero sobre todo, la mayor ventaja es que pueden ser expresados intracelularmente, y su expresión puede ser dirigida, mediante secuencias señales adecuadas, a los diferentes compartimentos celulares de las células eucariotas. Se ha demostrado que los fragmentos scFv son capaces de adoptar la conformación correcta para ser moléculas funcionales incluso en el ambiente reductor del citoplasma celular de plantas, aunque generalmente se acumulan a niveles muy bajos en este compartimento. Esta es una característica fundamental puesto que cuando se desea inmunomodular la actividad de proteínas que ejercen su función en el citoplasma es necesaria su expresión en dicho compartimento celular.

En trabajos previos en nuestro laboratorio se obtuvo el fragmento de anticuerpo recombinante scFv2A, a partir de células de hibridoma que

secretaban el anticuerpo monoclonal 2A (Mab2A). Este fragmento fue clonado y caracterizado (Esteban *et al.*, 2003) y se determinó que reconocía un motivo conservado de la proteína Nlb de todos los aislados de PPV analizados. La proteína Nlb tiene actividad RNA-polimerasa RNA-dependiente (RdRp) (Hong 1996), y se localiza principalmente en el núcleo de células de plantas infectadas, pero su función de replicación, presumiblemente, tiene lugar en estructuras membranosas derivadas del RE en el citoplasma (Martín *et al.*, 1995). Por ello, se construyeron diferentes versiones del fragmento scFv2A (Esteban, 2001). La primera versión consistió en la secuencia scFv2A sin ningún tipo de secuencia señal (scFv2A) para su expresión en citoplasma. En la segunda versión, para dirigir su expresión al núcleo, a la secuencia del fragmento scFv2A se le añadió la secuencia correspondiente a 72 aminoácidos de la región aminoterminal de la proteína NIa de TEV (NLSscFv2A). Dicha secuencia es una señal de transporte nuclear (NLS) bipartita (Carrington *et al.*, 1991) y muy bien definida que ha demostrado actuar de forma muy eficiente para el transporte a núcleo de diversas proteínas de fusión (Schaad *et al.*, 1996). En la tercera versión, se fusionó al extremo C-terminal del fragmento scFv2A la secuencia del péptido 6K2 de TEV (6K2scFv2A). Se ha demostrado que este péptido está involucrado en dirigir el complejo de replicación del RNA de TEV hacia la membrana derivada del RE y que puede mediar el transporte de proteínas heterólogas a membranas del RE y anclarlas por la cara citoplasmática del mismo (Schaad *et al.*, 1997).

Estas tres versiones del fragmentos scFv2A (scFv2A, NLSscFv2A y 6K2scFv2A (Esteban, 2001) se emplearon para transformar genéticamente plantas de *N. benthamiana*. En este capítulo se describe la obtención de plantas transgénicas estables de *N. benthamiana* que expresan fragmentos scFv específicos de la proteína Nlb replicasa de PPV.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Transformación genética y regeneración de plantas de *Nicotiana benthamiana*

Los plásmidos pBI-NLSscFv2A, pBI-6K2scFv2A y pBI-scFv2A (Esteban, 2001)(Figura 7) fueron transferidos por electroporación a la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58 (pMP90) (Koncz y Schell, 1986), generando las cepas recombinantes AtC58/pBI-NLSscFv2A, AtC58/pBI-6K2scFv2A y AtC58/pBI-scFv2A que fueron cultivadas a 28°C en medio de selección (medio Luria Bertani (LB) suplementado con 100 µM rifampicina (Rif), 100 µM de gentamicina (Gen) y 50 µM de kanamicina (Kan)) (LB-Rif₁₀₀Gen₁₀₀Kan₅₀). Las colonias transformadas con el plásmido de interés se identificaron por PCR con pares de iniciadores específicos de los fragmentos NLSscFv2A, 6K2scFv2A y scFv2A, NLSfor / VKback, 6K2for / VKback y VHfor / VKback, respectivamente (Figura 8).

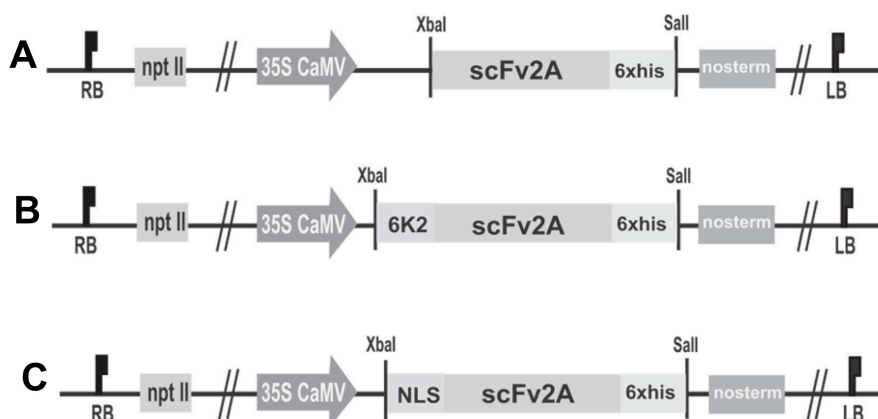


Figura 7

Diagrama esquemático de las diferentes construcciones del anticuerpo recombinante scFv2A (A) versión citosólica, sin ninguna señal (scFv2A), (B) versión nuclear (NLSscFv2A) y (C) versión citosólica pero anclada a la membrana del RE (6K2scFv2A). La secuencia de señalización nuclear (NLS) de la proteína Nla y el péptido 6K2 de TEV se insertaron "in frame" en el extremo aminoterminal de la proteína scFv2A. En el extremo carboxiterminal se insertaron 6 histidinas de forma que se produjera una proteína de fusión que pudiera ser detectable.

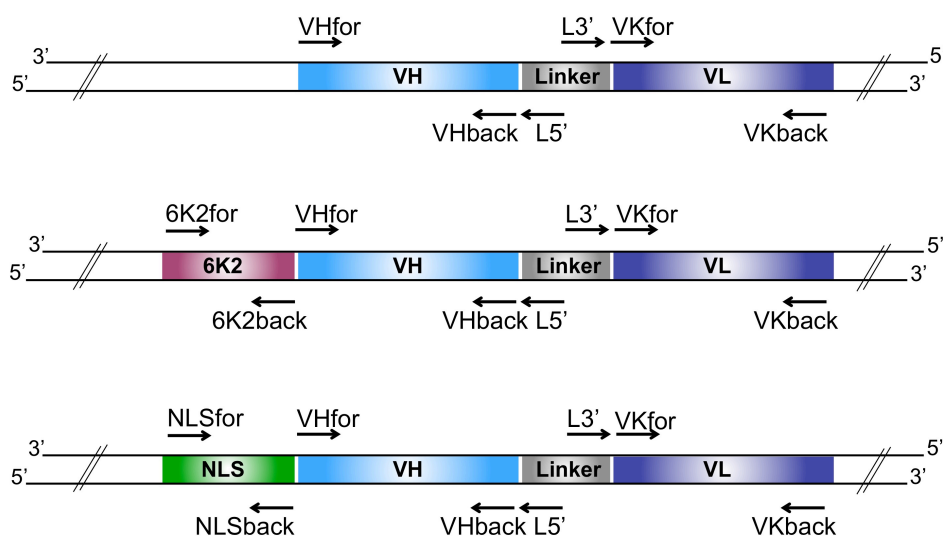


Figura 8
 Diagrama esquemático donde se muestra la posición en la que anillan los diferentes iniciadores utilizados para los análisis de las plantas transgénicas mediante PCR y RT-PCR.

Un cultivo (10^7 cfu/ml) de cada una de estas cepas recombinantes se empleó para la transformación de discos de hojas de plantas de *N. benthamiana* cultivadas *in vitro* según Horsch *et al.* (Horsch *et al.*, 1985) con algunas modificaciones. El medio de regeneración utilizado contenía citoquinina zeatina (1mg/l) en lugar de benzil amino purina (BAP) y ácido naftalenacético (NAA). La selección de las plantas transformadas se realizó en medio Murashige-Skoog (MS)(Murashige y Skoog, 1962) agar suplementado con 150 μ g/ml de kanamicina (MS-agar-kan₁₅₀). Las plantas R₀ resistentes a kanamicina se transfirieron primero a medio de enraizamiento, similar al de Horsch *et al.* pero con la adición de ácido 3-indol acético (AIA) (1 mg/l), y posteriormente a macetas con substrato estéril. Tras el período de aclimatación las plantas se mantuvieron en el invernadero cubiertas con bolsas de papel para evitar cruzamientos entre ellas y se dejaron crecer hasta que produjeron semillas. Las semillas de

estos primeros transformantes se hicieron germinar en medio MS-agar suplementado con 200 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina (MS-agar-kan₂₀₀) para obtener la siguiente generación de plantas R₁. Este proceso se repitió hasta obtener un 100% de germinación en MS-agar-kan₂₀₀, obteniéndose así plantas homocigotas para los transgenes.

2.2. Análisis de las plantas transgénicas

2.2.1. Análisis PCR

Se extrajo DNA genómico a partir de dos discos de hoja (Llop *et al.*, 1999) de cada una de las plantas R₀ resistentes a kanamicina y de sus descendientes (R₁, R₂ y R₃). La integración de las secuencias scFv2A (líneas A), NLSscFv2A (líneas N) y 6K2scFv2A (líneas K) en el genoma de la planta se analizó mediante PCR usando, respectivamente, los siguientes pares de iniciadores: VHfor / VKback, NLSfor / VKback y 6K2for/ VKback (Figura 8).

2.2.2. Análisis RT-PCR

Se aisló RNA a partir de cuatro discos de hoja, de cada una de las plantas R₀ resistentes a kanamicina con el kit RNeasy Plant (Qiagen), según las indicaciones del fabricante. A partir de 100 μg de RNA total se analizó la presencia del mRNA de los fragmentos scFv2A, NLSscFv2A y 6K2scFv2A mediante RT-PCR en un solo paso, usando los enzimas transcriptasa reversa AMV y *taq* DNA polimerasa (Promega). Se utilizaron los mismos iniciadores que para el análisis PCR (Figura 8).

2.2.3. Análisis “western blot”

Se obtuvo un extracto de proteína total a partir de hojas de *N. benthamiana* transgénicas. Para ello se trituró de forma mecánica el material en 5 volúmenes de tampón de extracción de proteínas (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2 mM (NH₄)₂SO₄, 10% glicerol (v/v), 0.1% Tween 20 (v/v), 1 mg/ml leupeptina, 1 mg/ml pepstatina y 2 mM PMSF en bolsas individuales de malla fina (Bioreba). Seguidamente se centrifugaron los extractos a 13.000g durante 30 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, se mezcló con tampón de muestra (5:1

v/v) (60 mM Tris-HCl, 25% glicerol, 2% SDS, 14 mM β -mercaptoetanol) y se incubó 3 minutos a 95°C. Una vez atemperado se tomaron 40 μ l para analizarlos mediante SDS-PAGE 14%. Tras la separación electroforética, las proteínas se electrotransferieron a membranas de PVDF (Millipore). Las membranas se bloquearon con tampón fosfato salino con 3% de albúmina de suero bovino (PBS-3% BSA) y se incubaron a 37°C, primero con un anticuerpo monoclonal anti-6xhis (1:1000) (Invitrogen) durante 2 h, y seguidamente con un anticuerpo anti-IgM fusionado a fosfatasa alcalina (GAM-AP) (1:5000) (Sigma) durante 1 h y 30 min, ambos anticuerpos se diluyeron en PBS-1% BSA. El revelado se realizó incubando con el substrato BCIP-NBT en tabletas (Sigma-Fast, Sigma).

2.2.4. Análisis inmunoimpresión-ELISA

Se realizaron impresiones de hojas y tallos de plantas de *N. benthamiana* de cada una de las líneas transgénicas sobre membranas de nitrocelulosa (Terrada 2000). Tras ser bloqueadas con PBS-3% BSA, las membranas se incubaron a 37°C, primero con un anticuerpo monoclonal anti-6xhis (1:1000) (Invitrogen) durante 2 h, y seguidamente con GAM-AP (1:5000) (Sigma) durante 1 h y 30 min. Ambos anticuerpos se diluyeron en PBS-1%BSA. El revelado se realizó incubando con substrato BCIP-NBT (Sigma-Fast, Sigma).

2.2.5. Análisis “western blot” indirecto

La proteína Nlb expresada en *Escherichia coli* fusionada a proteína de unión a maltosa (MBP, maltose binding protein) y una vez purificada, fue separada electroforéticamente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), con geles del 11%, y seguidamente electrotransferida a membranas de PVDF. Tras ser bloqueadas con PBS-3%BSA, las membranas se incubaron durante toda la noche a 25°C con extractos de hojas de *N. benthamiana* transgénica, obtenidos según el apartado 2.2.3. A continuación se incubaron a temperatura ambiente, primero con un anticuerpo monoclonal anti-6xhis (1:1000) (Invitrogen) durante 3 h, y seguidamente con GAM-AP (1:5000) (Sigma) durante 1 h y 30 min. Ambos anticuerpos se diluyeron en PBS-1%BSA. El revelado se realizó incubando con el substrato BCIP-NBT (Sigma-Fast, Sigma).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Transformación genética de plantas de *Nicotiana benthamiana* y análisis de las plantas transgénicas

Se generaron diferentes líneas transgénicas de *N. benthamiana*: líneas A o citoplásmicas transformadas con la construcción pBI-scFv2A, líneas N o nucleares transformadas con la construcción pBI-NLSscFv2A y líneas K o de RE transformadas con la construcción pBI-6K2scFv2A. Se obtuvieron al menos dieciséis transformantes R₀ independientes de cada una de las construcciones, que fueron seleccionados por su resistencia a kanamicina.

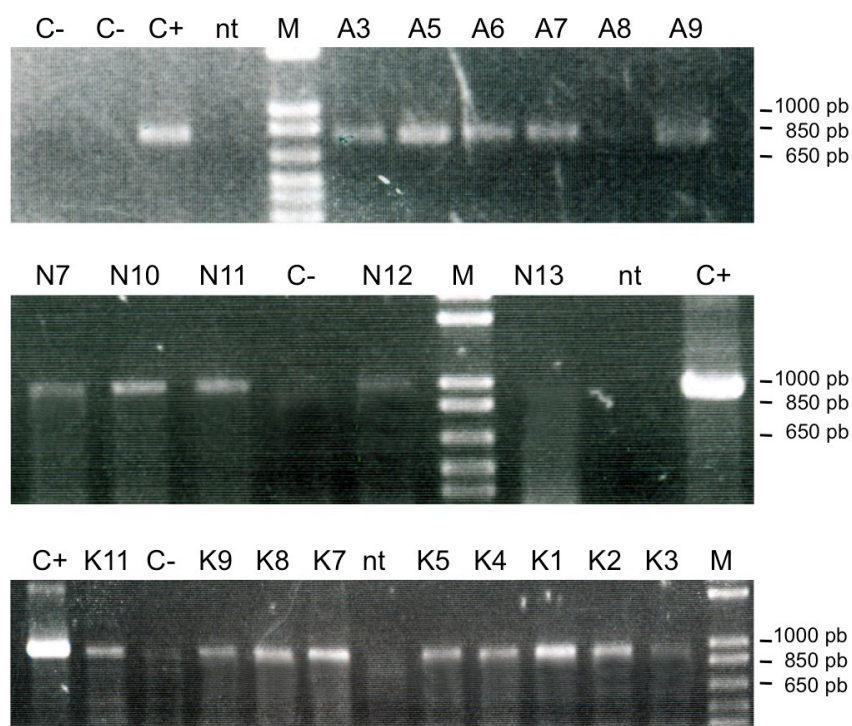


Figura 9
Amplificación de los transgenes de los fragmentos scFv2A (A3, A5, A6, A7, A8 y A9), NLSscFv2A (N7, N10, N11, N12 y N13) y 6K2scFv2A (K11, K9, K8, K7, K5, K4, K1, K2 y K3) mediante PCR a partir de DNA genómico de diferentes plantas transgénicas R₀. M: marcador de peso molecular, nt: planta no transformada. C+: control positivo, C-: control negativo sin muestra de DNA.

La integración de la secuencia codificante de los fragmentos scFv2A, 6K2scFv2A y NLSscFv2A en el genoma de las plantas R_0 transformadas se confirmó mediante amplificación por PCR a partir de DNA genómico (Figura 9). El fragmento de DNA del tamaño correcto fue detectado en 10 de 15 plantas de la línea A que crecieron en presencia de kanamicina, 10 de 16 de la línea N y 16 de 16 de la línea K. Por el contrario, no se observaron bandas en ninguna de las plantas control, no transformadas, que se analizaron.

3.2. Expresión de diferentes versiones del fragmento scFv2A en plantas transgénicas

La expresión de mRNA fue confirmada, mediante RT-PCR con iniciadores específicos para cada una de las construcciones (Figura 10A) en todas las plantas R_0 transgénicas que fueron PCR positivas, y también en las plantas R_1 analizadas. No se obtuvo amplificación en las plantas control, ni tampoco en las reacciones paralelas en las que se omitió el enzima *AMV* transcriptasa reversa como control de contaminación con DNA (Figura 10B).

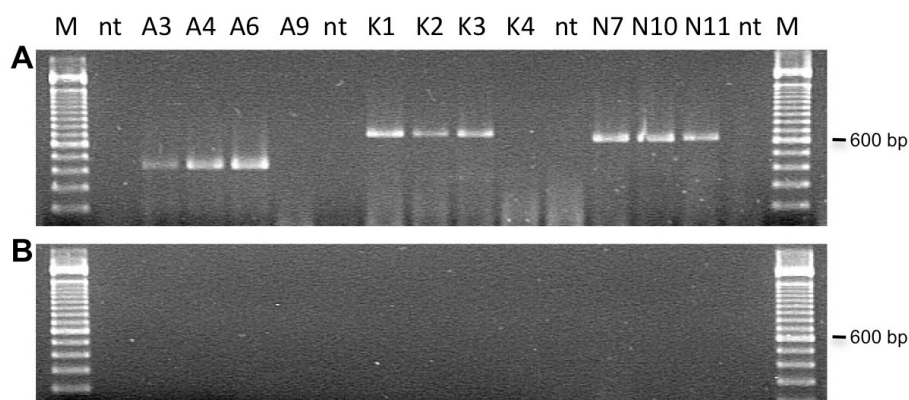


Figura 10
Amplificación del RNA de los transcritos de los fragmentos scFv2A (A3, A4 y A6), 6K2scFv2A (K1, K2 y K4) y NLSscFv2A (N7, N10 y N11) a partir de RNA de diferentes plantas transgénicas. M: marcador de peso molecular 10 Kb nt: planta no transformada.

La acumulación de la proteína scFv2A se detectó mediante inmunoimpresión-ELISA en las plantas transgénicas R₀ K1 y K2 (Figura 11), aunque posteriormente no se detectó con claridad su acumulación en plantas transgénicas R₁ de ninguna de las líneas transgénicas. También se realizaron análisis de “western blot” y se observó una banda del tamaño esperado en algunas plantas transgénicas de la progenie R₁ de la línea K1 (~35kDa) y de la línea N11 (~37kDa) (Figura 12). La acumulación de la proteína scFv2A no se pudo detectar, con estas dos técnicas, en ninguna planta transgénica de las líneas A. La dificultad para detectar la presencia de los fragmentos scFv, especialmente el scFv2A, no se debería, en principio, a un silenciamiento transcripcional de los módulos 35S-scFv o a una terminación anticipada de la transcripción, ya que, cuando se evaluó mediante RT-PCR la presencia del mRNA de los fragmentos scFv, en la mayoría de las plantas transgénicas analizadas, se detectaron bandas del tamaño esperado que no se amplificaban cuando se eliminaba de la reacción el enzima transcriptasa reversa (Figura 10B). Además, la secuenciación de los productos de RT-PCR indicó que tampoco existían mutaciones que implicaran un cambio del marco de lectura o un truncamiento prematuro de la traducción de la proteína.

Se ha descrito que el ambiente reductor del citoplasma puede producir un plegamiento ineficiente de los fragmentos scFv por el que una parte de las proteínas sintetizadas formarían agregados que serían rápidamente degradados por proteasas celulares (Biocca *et al.*, 1995), lo que conllevaría niveles muy bajos de acumulación en el citoplasma celular. Únicamente algunos fragmentos scFv con secuencias muy determinadas que son termodinámicamente más estables se acumulan en mayor cantidad de forma soluble en el ambiente reductor del citoplasma (Tavladoraki *et al.*, 1999; Desiderio *et al.*, 2001 De Jaeger *et al.*, 1999). Muy probablemente, lo que ocurre en la mayoría de las plantas transgénicas analizadas en este trabajo es que el nivel de acumulación está por debajo del límite de detección de las técnicas de “western blot” e inmunoimpresión-ELISA. Tampoco se puede descartar que el problema sea debido a la degradación de las seis histidinas (6xhis) de la cola carboxi terminal del fragmento scFv2A. Se ha comprobado que esto ocurre con scFvs marcadas con 6xhis o con el epítipo c-myc expresados en *E. Coli*. Cuando los sobrenadantes de expresión se filtran por columnas de

agarosa unidas a proteína-L, que se une específicamente a fragmentos scFv, se obtienen dos bandas de tamaños similares. Una de ellas se detecta con los anticuerpos anti-6xhis o anti-c-myc, en cambio la otra no, porque resulta ser un producto de degradación ya sin las secuencias marcadoras (Das *et al.*, 2005).

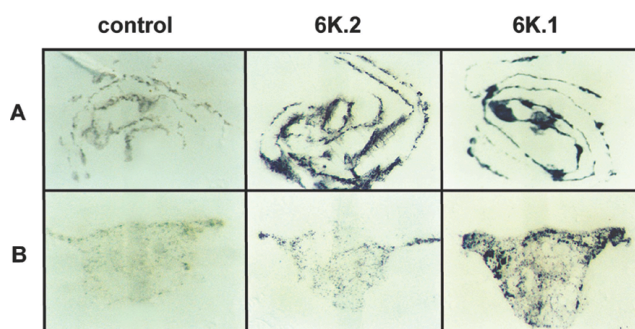


Figura 11
Análisis de inmunopresión-ELISA de hojas (A) y pecíolos (B) de plantas transgénicas R₀ de *N. benthamiana* de las líneas K1 Y K2. Como control se utilizó una planta no transformada

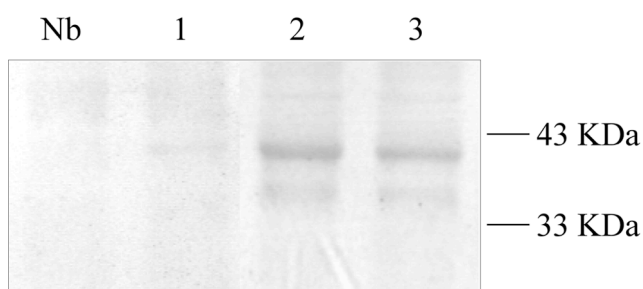


Figura 12
Detección por “western blot” de los fragmentos de anticuerpo recombinante 6k2scFv2A y NLSscFv2A en plantas transgénicas de la progenie R₁. Nb: planta de *N. benthamiana* no transformada. Carril 1: planta transgénica N11.8, carril 2: planta transgénica K1.9 y carril 3: planta transgénica K1.13.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores parece que la acumulación de la proteína en líneas K, en las que sería mayor que en las

líneas citoplásmicas (A) y nucleares (N), ya que se ha detectado tanto por “western blot” como por inmunoprecipitación-ELISA. En algunos trabajos se ha descrito que la fusión a dominios transmembrana puede ser un medio de estabilizar la estructura de algunos scFvs y mejorar sus niveles de acumulación (Schillberg *et al.*, 2000). Todo ello podría indicar que el péptido 6K2 fusionado al fragmento scFv2A le daría más estabilidad al anclarlo a la membrana.

Para determinar si las plantas transgénicas estaban produciendo los fragmentos scFv2A y si estos eran capaces de reconocer la proteína Nlb replicasa, se realizó un nuevo análisis “western blot” (ver “western-blot” indirecto en material y métodos). Se incubaron membranas de PVDF, a las que se había electrotransferido previamente la proteína Nlb replicasa fusionada a MBP, con extractos proteicos de plantas transgénicas, y seguidamente con los Mab anti-6xhis y GAM-AP. En todos los casos, se observó una banda correspondiente al tamaño de la Nlb-MBP (Figura 13A y B), la misma banda se observó cuando la incubación se realizó con el Mab 2A (específico de la Nlb) (Figura 13D). En cambio, no se obtuvo ningún tipo de señal cuando estas membranas fueron incubadas con extractos de plantas no transgénicas (Figura 13C) o plantas transgénicas que expresaban el fragmento scFv3DF1 no específico de PPV, tampoco se obtuvo señal cuando la membrana se incubó únicamente con el anticuerpo secundario (GAM-AP). Todo ello indica que los extractos de las plantas transgénicas contienen una proteína capaz de unirse específicamente a la Nlb de PPV. Es decir, que las proteínas scFv2A, 6K2scFv2A y NLSscFv2A expresadas en *N. benthamiana* transgénicas son capaces de reconocer específicamente a su antígeno Nlb, al menos en condiciones desnaturizantes.

En el análisis “western blot” indirecto se utilizaron diferentes concentraciones de Nlb-MBP. Cuando el análisis se realizó con extractos de plantas transgénicas de las progenies R₂ y R₃ no pareció que estas plantas acumulasen mayor cantidad de proteína scFv2A que sus progenitores, ya que en todos los casos únicamente se detectó la banda de 200 ng, mientras que la incubación de las mismas membranas con el Mab 2A (específico de la proteína Nlb de PPV) o con sobrenadantes de cultivos de *E. coli* que expresaba el fragmento scFv2A, se detectaron las bandas de 200 y 20 ng de Nlb-MBP. El hecho de que no se observe

mayor acumulación de la proteína ni siguiera en plantas homocigotas, como se ha descrito en otros casos (Prins *et al.*, 2005), sugiere que el bajo nivel de acumulación de scFv2A es debido, no a un problema de bajo nivel de expresión, sino a alguna limitación para la acumulación de la proteína, seguramente más relacionada con su secuencia de aminoácidos y la estabilidad intrínseca de su estructura que con otros factores externos. En otros casos también se ha observado que mediante autofecundación de plantas transgénicas que expresan scFvs se ha podido incrementar su producción en el apoplasto pero no en el citoplasma (Zimmermann *et al.*, 1998).

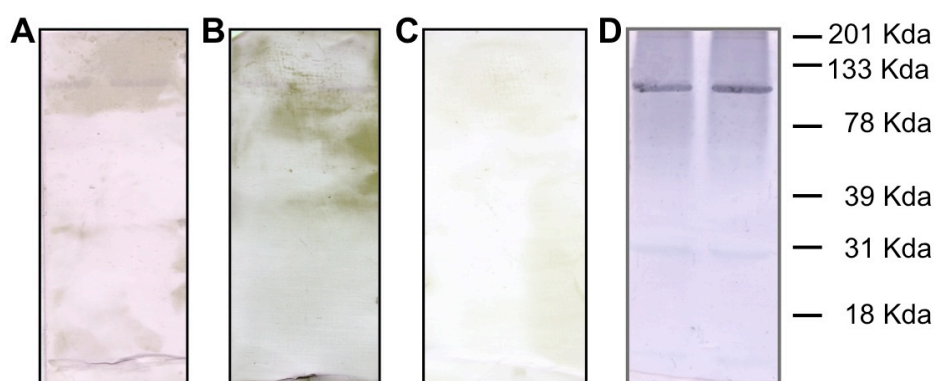


Figura 13

Detección de N1b, separada electroforéticamente y fijada a un membrana de PVDF, utilizando extractos de plantas transgénicas de *N. benthamiana* que expresan el fragmento scFv2A. Las diferentes membranas se incubaron con: (A) extracto de hojas de *N. benthamiana* transgénica de la línea A citoplásmica, (B) con extracto de hojas de *N. benthamiana* transgénica de la línea N nuclear. (C) con extracto de hojas de *N. benthamiana* no transgénica y (D) con el anticuerpo monoclonal 2A.

En algunas ocasiones se ha apuntado que los fragmentos scFv procedentes de hibridomas tienen una estabilidad más limitada que los obtenidos de genotecas de “phage display”, ya que en este último caso, el propio procedimiento de aislamiento podría hacer que se seleccionen scFvs más estables en condiciones reductoras, aunque no siempre los fragmentos scFv obtenidos de genotecas son, con seguridad, más estables. De cualquier modo, los fragmentos procedentes de un anticuerpo

monoclonal segregado por un hibridoma, como lo es el fragmento scFv2A, son también muy valiosos ya que normalmente están muy bien caracterizados y, como en este caso, se conoce exactamente cual es el epítipo que reconocen. Además, existen datos preliminares de experimentos en los que se utilizaron complejos de replicación de PPV parcialmente purificados de que el Mab 2A es capaz de interferir con la actividad RdRP *in vitro* (V. Escribano, E. Rodríguez-Cerezo y J.A. García, resultados no publicados). El fragmento scFv2A tiene la misma especificidad que dicho anticuerpo monoclonal (Esteban *et al.*, 2003), por lo que dichos resultados animan a su expresión en plantas para estudiar cual puede ser su efecto *in vivo* sobre la infección de PPV.

La proteína N1b de PPV se localiza predominantemente en el núcleo de células infectadas, donde se asocia a la N1a para formar cuerpos de inclusión (Li *et al.*, 1997), aunque se desconoce cual podría ser su función en este compartimento celular. Hasta el momento no hay datos del posible efecto de la expresión de scFvs en el núcleo sobre la infección por potyvirus, aunque se ha utilizado la expresión nuclear de scFvs para inmunomodular diversas proteínas del “*Human immunodeficiency virus*” (HIV) (Sibler *et al.*, 2003; Tewari *et al.*, 2003). Por lo tanto, las plantas transgénicas que expresan el fragmento recombinante NLSscFv2A podrían aportar valiosos conocimientos sobre la función de dicha proteína.

Igualmente se sabe que la replicación de los potyvirus tiene lugar en estructuras derivadas de membranas del RE (Schaad 1997), aunque se desconoce como se organizan estos complejos de replicación. Si que se conoce que el péptido 6K2 de TEV es una proteína integral de membrana que se asocia de forma específica, en presencia o ausencia de factores virales, a membranas derivadas del RE. Esta proteína tiene un tipo de señal de localización que se ancla a la membrana del RE por la cara citoplasmática. Se supone que su función es dirigir a productos de procesamiento parcial de la poliproteína viral hacia estructuras de membrana, presumiblemente implicadas en la formación de los complejos de replicación del virus. Por tanto, parece probable que fusionar este péptido a la secuencia del fragmento scFv2A aumente la probabilidad de que el anticuerpo coexista con la proteína N1b y pueda interactuar con ella y llegar a interferir con su función.

En este trabajo, aunque se ha intentado la inmunolocalización mediante microscopía electrónica, no se ha podido confirmar la localización intracelular de los fragmentos NLSscFv2A y 6K2scFv2A debido a diversas dificultades. En primer lugar, el epítipo (6xhis) que llevan los fragmentos recombinantes, tras el procesamiento a que se sometió a las muestras, no fue reconocido por el anticuerpo específico anti-6xhis utilizado. También se empleó el producto Nickel-ácido nitrilo triacético) (Ni-NTA) que se une específicamente a polihistidinas, fusionado a nanopartículas de oro (Ni-NTA Nanogold) (Nanoprobes) para poder detectarlo mediante microscopía electrónica. La señal que se obtuvo, tras la incubación de las muestras y su observación al microscopio, fue demasiado escasa para poder determinar con fiabilidad la localización intracelular de los fragmentos scFv. Además, se observó que había marcaje inespecífico debido a proteínas ricas en histidina, especialmente en el núcleo. Muy probablemente, estos problemas se agudizaron por el bajo nivel de acumulación de los fragmentos scFv.

La expresión de diversos fragmentos scFv, incluso con niveles de acumulación indetectables, ha demostrado producir interferencia con la función biológica de su antígeno (Xiao *et al.*, 2000). Por ello, a pesar de que los niveles de acumulación del fragmento scFv2A son bajos, lo que no ha permitido su localización celular, se ha considerado que la expresión de los fragmentos scFv2A en plantas puede ser suficiente para interferir con la infección de PPV. Pero además, estas plantas pueden ser buenos modelos para estudiar la función de la proteína NIb y su papel durante la infección viral.

CAPÍTULO 2

**“Ensayos de protección frente a
PPV con plantas transgénicas que
expresan los fragmentos scFv
específicos de la proteína Nlb”**

1. INTRODUCCIÓN

La ingeniería de anticuerpos junto con técnicas de transformación genética han proporcionaron durante los últimos años nuevas estrategias para la lucha contra los patógenos de plantas. Entre ellas, la inmunomodulación que se basa en la expresión en la planta, de anticuerpos o fragmentos recombinantes de genes de anticuerpo (Rabs) específicos de alguna proteína del patógeno para impedir, alterar o inmunomodular la interacción huésped-patógeno. Esta estrategia ha sido usada con éxito para interferir con patógenos de humanos (Marasco, 2001) y otros animales, y las aplicaciones en patógenos de plantas, especialmente virus, son cada vez más abundantes (Goldbach *et al.*, 2003; Prins *et al.*, 2008).

El potencial de los Rabs para interferir con la infección viral en plantas fue demostrado por primera vez en plantas transgénicas que expresaban fragmentos recombinantes de regiones variables en cadena simple (scFv) específicos de la proteínas de la capsida (CP) del *Artichoke mottled crinkle virus* (ACMV) (Tavladoraki *et al.*, 1993). Posteriormente, durante la década de 1990, hubo una creciente actividad para desarrollar estrategias de resistencia a virus basadas en la inmunomodulación mediante la expresión en plantas de Rabs específicos de diferentes CPs virales (Voss *et al.*, 1995; Fecker *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 2000). Sin embargo, en muchos de los casos el éxito que se obtuvo fue limitado ya que las plantas transgénicas sólo mostraron retraso en la aparición de síntomas o protección parcial contra los efectos de la infección viral.

Las nuevas estrategias para lograr una inmunomodulación más eficaz de la infección viral pasan por producir fragmentos scFv con mayor estabilidad en citoplasma, de forma que su acumulación sea más estable y efectiva (Villani *et al.*, 2005). También existe la posibilidad de utilizar la expresión de Rabs que se unen a dominios conservados y funcionales de las proteínas no estructurales, por ejemplo las asociadas con la replicación (Boonrod *et al.*, 2004) u otras funciones virales (Prins *et al.*, 2005; Gargouri-Bouzid *et al.*, 2006; Zhang M.Y. *et al.*, 2008). Las proteínas implicadas en la replicación se acumulan en cantidades menores, que la CP, y normalmente requieren una modulación más sofisticada en sus niveles de expresión para controlar correctamente el proceso de

replicación, con lo cual éste debería ser un modo más efectivo de interferir con la infección viral.

En este capítulo se evalúa la capacidad de protección frente a la infección por PPV que poseen las plantas de las líneas transgénicas A, N y K que expresan el fragmento scFv2A (específico de la proteína N1B replicasa) en el citoplasma, el núcleo y el RE respectivamente tal como se ha descrito en el capítulo anterior.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Preparación del extracto viral estándar de PPV y estimación del número de copias del genoma viral

Para la inoculación mecánica se utilizó el aislado de PPV 3.3 RB/Nb, de tipo D y no transmisible por pulgón (PPV-D-NAT) (GenBank: AF172350.1) (Maiss *et al.*, 1989). Se preparó un extracto estándar a partir de hojas sintomáticas de *N. benthamiana* infectadas con dicho aislado de PPV. Para ello se trituró 1 peso de material vegetal en 10 volúmenes de tampón de extracción de frutales (PBS + 0.2% DIECA + 0.2% polivinilpirrolidona (PVP), pH 7,4-7,2) (Cambra *et al.*, 1994), se filtró a través de 4 capas de gasa, se hicieron alícuotas que se congelaron inmediatamente y se almacenaron congeladas a -80° C hasta su utilización.

Para la estima del número de copias de RNA del genoma viral en dicho extracto, se extrajo RNA con el kit RNAeasy (Qiagen) según el protocolo de la casa comercial. El RNA obtenido se usó como molde para amplificar mediante RT-PCR la región nucleotídica (243 bp) comprendida entre los iniciadores P1 y P2 específicos de PPV (Wetzel *et al.*, 1991), dicha secuencia se insertó en el vector pGem-T (Promega Inc.). El plásmido junto con el inserto una vez linearizado se usó como molde para la obtención *in vitro* de retrotranscritos (340 nucleótidos), que incluían la secuencia de PPV más 63 nt del plásmido, para ello se utilizó el kit Megascript T7 (Ambion) seguido de un tratamiento de digestión del DNA con el enzima *Dnasa I*. Posteriormente se purificaron los retrotranscritos mediante una extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol. La cantidad de RNA (μ g) obtenida tras la purificación se cuantificó midiendo su absorbancia a 240 nm. Para la conversión de microgramos de

RNA de cadena simple (ssRNA) a picomoles se consideró el peso molecular promedio de un nucleótido (340 Da) y el número de bases del transcrito (N_b) y se aplicó la siguiente fórmula: pmol de ssRNA = $\mu\text{g de ssRNA} \times (10^6 \text{pg}/1\mu\text{g}) \times (1 \text{pmol}/340 \text{pg}) \times (1/N_b)$.

Finalmente, se utilizó la constante de Avogadro (6.023×10^{23} moléculas/mol) (Avogadro, 1811) para estimar el número de moléculas de transcrito por microlitro de solución. Posteriormente, se prepararon diluciones decimales seriadas, de concentraciones conocidas, para generar una curva estándar que se utilizó para la posterior cuantificación de la concentración de transcritos en los extractos de plantas infectadas. Finalmente, se analizó el número de copias de RNA del genoma viral en el extracto mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real en el aparato ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) según Olmos *et al.* (2005).

2.2. Desafío por inoculación mecánica de PPV

El extracto viral estándar de plantas infectadas con PPV se inoculó mecánicamente utilizando carborundum como abrasivo.

Se utilizaron plantas de *N. benthamiana* Kan^R de la progenie R₁ de diferentes líneas transgénicas. Cinco líneas que expresaban el fragmento scFv2A (líneas A3, A4, A5, A6 y A7), tres el fragmento 6K2scFv2A (líneas K1, K2 y K3) y cuatro el fragmento NLSscFv2A (líneas N7, N10, N11 y N12). Se utilizaron como control plantas no transformadas pero sí regeneradas *in vitro* (NT). También se utilizaron plantas transgénicas que expresan el fragmento scFv3DF1 (líneas DF) específico para la CP de *Citrus tristeza virus* (CTV) (Terrada 2000), y que no reconoce ninguna proteína de PPV, y plantas transgénicas transformadas con el vector pBI sin inserto (líneas vacío). En cada planta se inocularon dos hojas basales.

Se realizaron dos ensayos de resistencia independientes, utilizando dos diluciones diferentes del extracto viral estándar.

2.3. Desafío por inoculación con PPV-GFP

El vector pBI-PPV-GFP contiene una copia completa de cDNA del genoma de PPV con el gen *gfp* insertado entre las proteína N1b y CP del virus de forma que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) funcional a la vez que produce el resto de proteínas virales. Todo ello bajo el

promotor 35S de CaMV (*Caulimovirus mosaic virus*). A este clon recombinante se le denominará PPV-GFP a partir de ahora. Este virus recombinante deriva del aislado Rankovic (R3) de PPV-D y la quimera PPV-GFP (Fernández-Fernández *et al.*, 2001).

La inoculación con el clon viral unido a GFP se realizó pinchando la superficie de las hojas con una punta de pipeta de 200 μ l impregnada con un cultivo de *A. tumefaciens* recombinante ($OD_{600} = 0.8$) portador del vector pBI-PPV-GFP (*AtC58/pBI-PPV-GFP*). En cada planta se realizaron dos pinchazos un una misma hoja.

Se efectuaron dos experimentos independientes. En el primer experimento se utilizaron plantas de *N. benthamiana* transgénicas de la progenie R₁ de diferentes líneas transgénicas. Cuatro líneas transgénicas que expresaban el fragmento scFv2A (línea A3, A4, A5 y A6), dos el fragmento 6K2scFv2A (líneas K1 y K2) y cuatro el fragmento NLSscFv2A (líneas N7, N10, N11 y N12). La hoja inoculada se mantuvo en la planta durante todo el periodo que duró el experimento. En el segundo experimento se utilizaron plantas de *N. benthamiana* transgénicas de las progenies R₁ y R₃ de las líneas A3, K1 y N11. En este caso la hoja inoculada se arrancó a los 15 días post inoculación (dpi) para su análisis.

En ambos experimentos se utilizaron como control líneas de plantas no transformadas pero sí regeneradas *in vitro* (líneas NT) y líneas de plantas que expresaban el fragmento scFv3DF1 específico de CTV (Terrada *et al.*, 2000) (líneas DF).

2.4. Evaluación de la infección viral

2.4.1. Evaluación de síntomas

En los ensayos de desafío mediante inoculación mecánica se evaluó la aparición de síntomas típicos de infección por PPV en *N. benthamiana* cada tres días durante un periodo de 30 días. En los ensayos de desafío mediante inoculación con PPV-GFP se observó la presencia de síntomas a los 15 y 30 dpi.

2.4.2. Análisis ELISA-DASI

La acumulación de PPV en hojas apicales (no inoculadas) y/o inoculadas se determinó mediante ELISA-DASI tanto en los ensayos de inoculación mecánica, como en los de inoculación con PPV-GFP. Para ello se tapizaron placas Maxisorp™ (Nunc) con una solución de 1 µg/ml de anticuerpos policlonales (Pabs) frente a PPV en tampón carbonato y se incubaron durante 4h a 37°C. Después del lavado de la placa, se añadieron 200 µl de extracto de hojas de *N. benthamiana* y se incubaron a 4°C durante toda la noche. La detección del virus se realizó incubando a 37°C con el anticuerpo monoclonal 5B-IVIA (1:1000) durante 2h, y seguidamente con GAM-AP (1:5000) (Sigma) durante 1 h y 30 min, ambos Ab se diluyeron en PBS-1%BSA. Se utilizó el kit comercial 5B (AMR Lab), según el protocolo EPPO 2004 (EPPO Bull., 2004). El revelado de la placa se realizó con el substrato *P*-nitrofenilfosfato (Sigma). Posteriormente, se midió la absorbancia de las muestras a 405 nm (abs 405 nm).

A los valores de abs 405 nm obtenidos para las plantas infectadas se le restó el valor de abs 405 nm obtenido frente a plantas no inoculadas (control negativo) y se dividió por el valor de abs 405 nm obtenido frente al extracto viral estándar de plantas infectadas con PPV (control positivo). Los extractos usados como control negativo y positivo fueron los mismos para todos los análisis realizados.

2.4.3. Detección de la señal fluorescente de la GFP

En los ensayos de desafío por inoculación con PPV-GFP, se evaluó la difusión de la infección viral por observación de la fluorescencia de GFP en las plantas inoculadas bajo una lupa de fluorescencia modelo M216FA (Leica). Se usaron filtros de excitación y barrido a 480/40 nm y 510 nm, respectivamente. Las fotografías se tomaron con una cámara DC500 acoplada a la lupa.

2.5. Análisis estadístico

Análisis de los resultados de los ensayos de desafío. Puesto que la variable de interés es dicotómica (sana/enferma) se utilizó la regresión logística mediante modelo lineal generalizado (McCullagh y Nelder, 1989).

Se realizaron comparaciones de la forma que se explica a continuación. Para el análisis de los datos de abs 405 nm, se asumió que la variable tiene una distribución normal y se aplicó modelo de la análisis de la varianza. Se compararon los valores de las diferentes líneas con el control. En los experimentos en los que el grupo control no alcanzó el 100% de infección, se comparó el porcentaje de infección obtenido para cada línea transgénica con el porcentaje de infección del grupo control. En los experimentos en los que el control alcanzó el 100% de infección, se compararon únicamente los porcentajes de infección de las líneas transgénicas entre ellas.

Los tres grupos de plantas control (plantas no transformadas (NT), transformadas con el vector vacío (líneas vacío) y transgénicas que expresan el fragmento scFv3DF1 (líneas DF) específico de CTV) se utilizaron como un único grupo control, ya que su comportamiento fue similar y no se detectaron diferencias significativas entre ellos.

Para el análisis de los datos de abs 405 nm, se asumió que la variable tenía una distribución normal y se aplicó un modelo de análisis de la varianza. Se compararon los valores de las diferentes líneas con el control.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Ensayo de protección frente a PPV mediante desafío por inoculación mecánica

Se realizaron ensayos de desafío mediante la inoculación mecánica de extractos de plantas infectadas con PPV. La finalidad de dichos ensayos fue, en primer lugar determinar si la expresión de los fragmentos scFv2A en plantas de *N. benthamiana* producía alguna interferencia con la infección viral, y seguidamente, evaluar el nivel de protección frente a la infección por PPV de diferentes líneas transgénicas obtenidas. Se utilizaron dos dosis diferentes de inóculo correspondientes a 11.710×10^6 y 5.018×10^6 copias de RNA viral por ml consideradas respectivamente, de acuerdo con ensayos previos de infectividad, como alta y moderada. Después de inocular las plantas se observó periódicamente la aparición de síntomas típicos en hojas nuevas no inoculadas producidos por la infección sistémica de PPV (Figura 14). Las plantas en las que se detectaron síntomas se consideraron infectadas y las que se mantuvieron sin síntomas al final del experimento se consideraron como no infectadas. En todas ellas se verificó mediante ELISA-DASI la ausencia de virus.



Figura 14

Síntomas típicos causados por infección sistémica de PPV en hojas de *N. benthamiana* (izquierda y centro). Hoja sin síntomas (derecha).

Los porcentajes de plantas infectadas a los 30 dpi en cada una de las líneas transgénicas ensayadas se resumen en la Tabla 1. Para la dosis de inóculo mayor (11.710×10^6 copias RNA viral/ml) las líneas transgénicas K1, A3 y N11 mostraron un menor número de plantas infectadas que las líneas control. Los porcentajes de infección de plantas infectadas en la línea K1 (74%) y A3 (85%) fueron significativamente menores ($p=0.001$ y $p=0.021$

respectivamente) comparados con los observados en las plantas control (~100%). El porcentaje de infección de la línea N11 (88%) aunque menor que en las plantas control no fue significativamente diferente según el análisis estadístico ($p=0.051$). El resto de líneas transgénicas ensayadas mostraron porcentajes de infección similares a los de las plantas control, a esta dosis de inóculo.

Líneas transgénicas	Dosis de inóculo (copias RNA viral / ml)			
	11.710×10^6		5.018×10^6	
	Porcentaje de plantas infectadas	valor Pr	Porcentaje de plantas infectadas	valor Pr
NT	96 (47/49)		79 (15/19)	
vacío	98 (40/41)		83 (24/29)	
DF	97 (31/32)		76 (28/38)	
control	97 (118/122)		78 (67/86)	
A3	85* (29/34)	0,021	40* (4/13)	0,017
A4	100 (34/34)	0,999	77 (10/13)	0,937
A5	100 (24/24)	0,999	42* (13/31)	0,001
A6	n.d.		57* (12/21)	0,057
A7	n.d.		68 (21/31)	0,264
K1	73* (17/23)	0,001	48* (16/33)	0,002
K2	100 (24/24)	0,999	53* (15/28)	0,015
K3	100 (24/24)	0,999	82 (23/28)	0,634
N7	100 (20/20)	0,999	92 (11/12)	0,291
N10	96 (26/27)	0,912	85 (22/26)	0,461
N11	87* (28/32)	0,051	16* (3/19)	<0,0001
N12	100 (17/17)	0,999	82 (14/17)	0,684

Tabla 1

Evaluación de la infección viral en plantas R_1 de diversas líneas transgénicas que expresan los fragmentos recombinantes scFv2A (líneas A), 6K2scFv2A (líneas K) y NLSscFv2A (líneas N) y en plantas control a los 30 dpi. Los grupos de plantas control no transformadas (NT), transformadas con el vector vacío (líneas vacío) y transgénicas que expresan el fragmento scFv3DF1 (líneas DF) específico de CTV, se utilizaron como un único grupo control para el análisis estadístico. Los porcentajes de infección se muestran en negrita. Las fracciones entre paréntesis se indican el número de plantas infectadas respecto del número total de plantas inoculadas. Se marca con un asterisco las líneas que muestran diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con respecto al grupo control. N.d.: no determinado.

Se realizó un nuevo experimento disminuyendo la dosis de inóculo (5.018×10^6 copias RNA viral/ml). A esta nueva dosis se observó que un

mayor número de líneas transgénicas mostraron porcentajes de infección significativamente menores que los de los controles, y además las diferencias entre los porcentajes de infección de las líneas transgénicas y los de las plantas control fueron también mayores. Solamente el 40% de las plantas de la línea A3, el 48% de la línea K1 y el 16% de la línea N11 fueron infectadas de forma sistémica, comparando con las plantas control de las que resultaron infectadas el 80%. También otras líneas transgénicas como la A5 (42%) y la K2 (48%), que no se diferenciaron de los controles en el experimento realizado con mayor dosis de inóculo, mostraron porcentajes de infección significativamente menores ($p=0.001$ y $p=0.015$ respectivamente) que los del control.

Estos datos indicarían que la expresión de los fragmentos scFv2A, 6K2scFv2A y NLSscFv2A produce a algún tipo de interferencia con la infección viral de PPV, y que este efecto es específico del fragmento scFv2A, ya que plantas que expresan un scFv no específico de PPV (las líneas DF) presentan niveles de infección similares a las plantas control no transgénicas. El nivel de protección estaría relacionado con el nivel de inóculo utilizado en los ensayos de desafío, y como han apuntado otros autores, seguramente el nivel de acumulación de los fragmentos scFv sería uno de los factores importantes que limitaría los efectos de protección. Los resultados cualitativos de acumulación de scFv presentados en el capítulo anterior no permiten establecer una correlación rigurosa entre el nivel de acumulación del fragmento scFv2A y el nivel de protección que produce. Sin embargo se puede constatar, en primer lugar, que a menor dosis de inóculo utilizada se obtienen mejores resultados de protección tanto en el número de líneas como en el número de plantas resistentes, y en segundo lugar, que las líneas con mayor número de plantas resistentes son aquellas en las que se ha podido detectar la presencia de proteína scFv con la mayoría de técnicas utilizadas (líneas K1 y N11).

El seguimiento periódico de la aparición de síntomas permitió observar algunas diferencias en la evolución del porcentaje de infección en las diferentes líneas transgénicas. En las líneas A el número de plantas infectadas creció rápidamente en los primeros días tras la inoculación, pero en algunas de ellas (línea A3) el porcentaje de infección se mantuvo por debajo del de las plantas control hasta el final del experimento. En las

líneas K ocurrió algo parecido. Sin embargo en las líneas N10, 11 y 12 hubo un retraso en la aparición de síntomas (Figura 15). En estas líneas el porcentaje de plantas infectadas, entre los 9 y 12 dpi, fue menor comparado con los de las plantas control y el resto de líneas transgénicas.

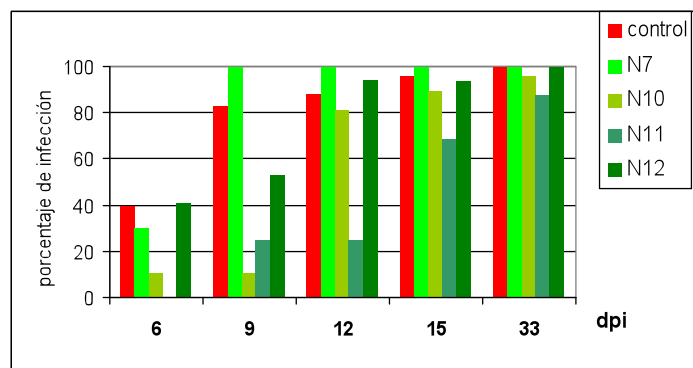


Figura 15

Evolución de la infección por PPV en las líneas transgénicas N inoculadas mecánicamente con el aislado 3.3 RB/Nb. dpi: días post-inoculación.

No obstante, al final del experimento sólo la línea N11 mantuvo menor número de plantas infectadas que el control. En el caso de esta línea, además, el grado de protección fue remarcablemente más pronunciado a la dosis de inóculo más baja utilizada, a esta dosis el 84% del total de plantas de la progenie R_1 de la línea NLS11 fueron resistentes a la infección por PPV. En conjunto, estos datos podrían indicar una posible función de la N1b en el núcleo relacionada de alguna forma con el proceso de replicación que tiene lugar en el citoplasma. Se ha hipotetizado que la compartimentalización de diferentes proteínas virales podría jugar un papel importante en regular la cantidad disponible de proteína activa en cada etapa de la infección viral. La NLSscFv2A podría, por tanto, interferir con la correcta compartimentalización de la N1b (Li y Carrington, 1993). El diferente grado de protección mostrado por la línea NLS11 a las dos dosis de inóculo utilizadas podría ser consistente con esta idea. A dosis de inóculo moderadas los niveles de NLSscFv2A en la planta pueden bloquear suficiente N1b para desequilibrar la concentración de N1b requerida para la replicación de PPV y, a su vez, alterar el curso de la

replicación viral. Por el contrario, a dosis de inóculo elevadas, en las que habrá mayor concentración de Nlb, es esperable que los niveles de NLSscFv2A sean insuficientes para bloquear la cantidad de Nlb necesaria para desequilibrar la relación de Nlb entre el núcleo y el citoplasma y, por tanto, no influir sobre el resultado final de la infección.

3.2. Ensayo de protección frente a PPV mediante desafío por inoculación con PPV-GFP

En estos ensayos de desafío la inoculación del virus se efectuó pinchando una hoja basal con una punta de pipeta impregnada con un cultivo de *A. tumefaciens* recombinante portador del vector pBI-PPV-GFP para conseguir que el inicio de la infección fuese localizado. Cuando se observó la hoja inoculada bajo una lupa y con luz fluorescente, entre los 6 y 10 dpi (Figura 16) se pudo apreciar un halo fluorescente alrededor del lugar donde se produjo la incisión con la punta. Posteriormente se observó como la fluorescencia se extendió hasta alcanzar alguna zona vascular y a partir de entonces, se inició, a través de los haces vasculares (Figura 16), el movimiento del virus hacia la zona apical de la planta originándose así la infección sistémica.

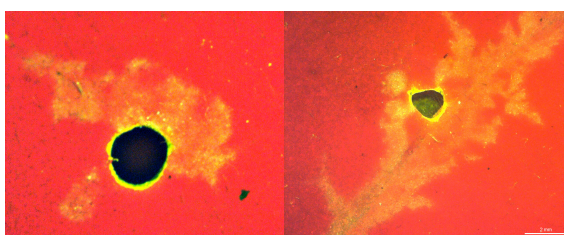


Figura 16

Observación de la señal fluorescente emitida por la GFP tras después de inocular hojas de *N. benthamiana* con una punta impregnada con un cultivo de *A. tumefaciens* recombinante portador del vector pBI-PPV-GFP. La foto de la izquierda se tomo a los 6 dpi y la de la derecha a los 12 dpi.

Después de la inoculación se evaluó la acumulación de virus en las hojas jóvenes totalmente expandidas de la parte superior de las plantas inoculadas a los 15 y 30 dpi. El análisis se realizó mediante ELISA-DASI (abs 405 nm) Los resultados permitieron establecer cual era el número de plantas infectadas. En la Tabla 2 se resumen los porcentajes de plantas

infectadas en las diferentes líneas transgénicas y control.

Líneas transgénicas	Porcentaje de plantas infectadas			
	15 dpi		30 dpi	
control	100^a	(12/12)	100^a	(12/12)
A3	10^{cef}	(1/10)	60^{bce}	(6/10)
A4	40^{cdg}	(4/10)	80^{bce}	(8/10)
A5	30^{cef}	(3/10)	50^{bdf}	(5/10)
A6	25^{cef}	(4/16)	94^{bce}	(15/16)
K1	100^a	(11/11)	100^a	(11/11)
K2	100^a	(10/10)	100^a	(10/10)
N7	90^{bdf}	(9/10)	100^a	(10/10)
N10	50^{bdf}	(5/10)	90^{bce}	(9/10)
N11	42^{cdf}	(5/12)	92^{bce}	(11/12)
N12	80^{bdf}	(8/10)	100^a	(10/10)

Tabla 2

Evolución de la infección por PPV en plantas R₁ de varias líneas transgénicas A, K y N y plantas control inoculadas con PPV-GFP. El porcentaje de infección se indica en negrita. Cada fracción representa el número de plantas en las que se detectó virus mediante ELISA-DASI respecto al número total de plantas inoculadas. dpi: días post-inoculación. Diferente combinación de letras indica diferencias significativas ($p > 0.01$).

En primer lugar hay que destacar que el 100% de las plantas control ya están infectadas a los 15 dpi, mientras que todas las líneas A (A3, A4, A5 y A6) y dos líneas N (N10 y N11) presentaron porcentajes de infección, al menos, un 50% menores que los de las plantas control. Siendo las líneas A las que presentaban niveles de infección menores entre 10 y 40%. A los 30 dpi los porcentajes de infección aumentaron en las líneas transgénicas, si bien la línea A5 todavía mantuvieron porcentajes de infección significativamente diferentes del los de las plantas control y del resto de líneas transgénicas. También se pudo observar que el nivel de acumulación viral en hojas jóvenes infectadas de forma sistémica de muchas de las plantas transgénicas era menor que en las plantas control (Figura 17). Incluso en las líneas K1 y K2 que tienen el mismo porcentaje de infección que las control, la mitad de sus plantas acumula menor cantidad de virus que las control (Figura 17). Asimismo y a pesar de la gran variabilidad entre plantas de las mismas líneas transgénicas, los valores medios de abs 405 nm de las plantas infectadas obtenidos para las

líneas A6 y K2 fueron significativamente menores comparados con los de las plantas control (Figura 18).

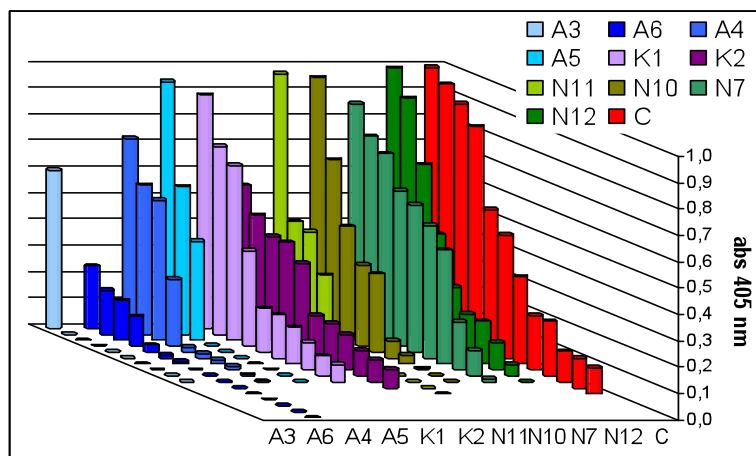


Figura 17

Análisis mediante ELISA-DASI de la acumulación de PPV en extractos de hojas apicales (no inoculadas), de plantas R₁ de diferentes líneas transgénicas. Las plantas fueron inoculadas con PPV-GFP y el análisis se realizó a los 15 dpi. Las columnas representan el valor de abs 405 nm para cada una de las plantas analizadas, una vez restado el valor obtenido frente a plantas no inoculadas (control negativo) y dividido por el valor obtenido frente al extracto viral estándar de plantas infectadas (control positivo).

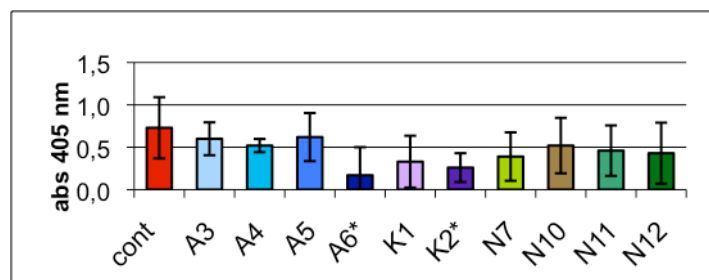


Figura 18

Representación de los valores promedio acumulación de PPV (abs 405 nm) para cada una de la líneas transgénicas. El análisis se realizó en extractos de hojas apicales infectadas de plantas R₁. Las plantas fueron inoculadas con PPV-GFP y el análisis se realizó a los 15 dpi. Las columnas y las barras muestran las medias y el error estándar para cada una de las líneas transgénicas. Se marca con un asterisco los valores que resultaron significativamente diferentes ($Pr \leq 0.001$) que del grupo de plantas control.

Para un segundo ensayo, se escogieron las líneas A3, K1 y N11 que fueron las que dentro de cada grupo mostraron menores porcentajes de

infección en los experimentos de inoculación mecánica. Se inocularon plantas de la progenie R₁ y R₃ de dichas líneas transgénicas de la misma forma que en el experimento anterior, pero a los 15 dpi se desprendieron las hojas inoculadas y se estimó el nivel de acumulación viral de las mismas (Figura 19). Como se puede observar, en los dos grupos de plantas control, plantas no transgénicas (NT) y transgénicas que expresan un anticuerpo no específico de PPV (DF), los valores ELISA resultaron muy similares en todas ellas.

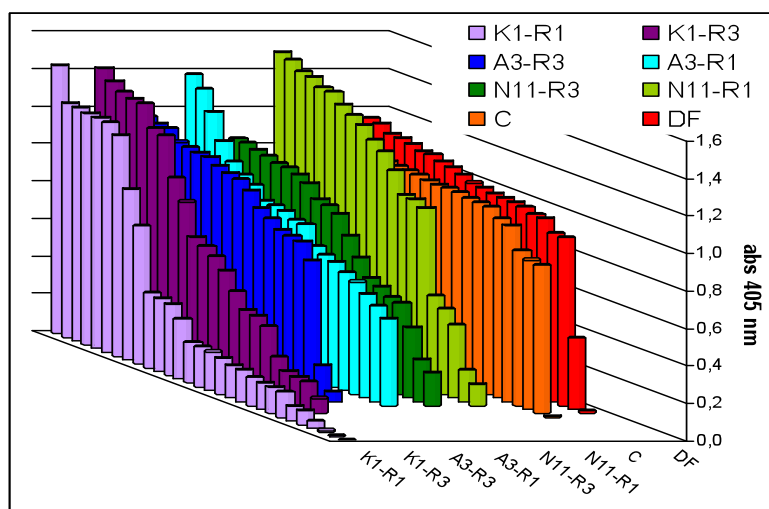


Figura 19

Análisis mediante ELISA-DASI de la acumulación de PPV en extractos de hojas inoculadas con PPV-GFP en plantas R₁ y R₃ de las líneas transgénicas A3, K1 y N11. Las plantas fueron inoculadas con PPV-GFP y el análisis se realizó a los 15 dpi. Las columnas representan el valor de abs 405 nm para cada una de las plantas analizadas, una vez restado el valor obtenido frente a plantas no inoculadas (control negativo) y dividido por el valor obtenido frente al extracto viral estándar de plantas infectadas (control positivo).

En cambio, dentro de las líneas transgénicas muchas de las plantas presentaron valores ELISA inferiores a los de las plantas control, especialmente en la línea K1 tanto entre las plantas de la R₁ como de la R₃. En esta línea los valores medios de acumulación viral (abs 405 nm) fueron menores comparados con los de las plantas control (Figura 20), pero sólo en la línea K1-R₁ estas diferencias fueron significativas.

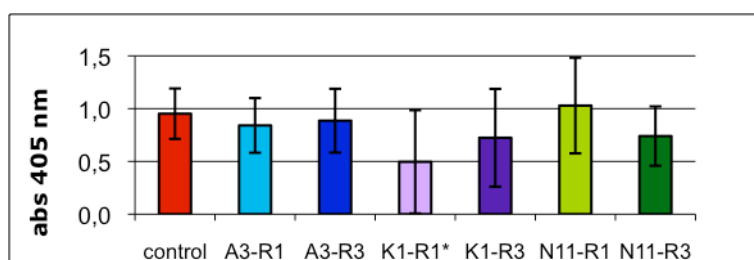


Figura 20

Representación de los valores promedio acumulación de PPV (abs 405 nm) en las líneas transgénicas A3, K1 y N11. El análisis se realizó en extractos de hojas inoculadas de plantas R₁ y R₃. Las plantas fueron inoculadas con PPV-GFP y el análisis se realizó a los 15 dpi. Las columnas y las barras muestran las medias y el error estándar para cada una de las líneas. Se marca con un asterisco los valores que resultaron significativamente diferentes ($Pr \leq 0.001$) que el del grupo de plantas control

Igual que en el experimento anterior se analizó la aparición de la infección sistémica en hojas jóvenes no inoculadas mediante ELISA-DASI a los 15 y 30 dpi y los resultados en porcentajes de infección se muestran en la Tabla 3. Como se puede observar a los 15 dpi, todas las líneas transgénicas presentaron porcentajes de infección menores que los de las líneas control, resultando estas diferencias estadísticamente significativas. En cambio a los 30 dpi los niveles de infección en todas las líneas transgénicas eran similares a los de los controles.

En cuanto a la acumulación viral en las hojas infectadas sistémicamente, se pudo observar que todas las plantas de las líneas N11 y K1, tanto de las progenies R₁ y R₃, presentaron valores de abs 405 nm menores que los de las plantas control (Figura 21), aunque no hubo diferencias significativas entre ambos grupos. A pesar de que algunos autores han constatado una mejora en el nivel de protección en plantas R₂ al aumentar en ellas los niveles de acumulación del anticuerpo recombinante, en este caso no se obtiene un mejor efecto de protección con plantas de progenie R₃ respecto de las plantas de la progenie R₁. Como ya se había apuntado en el capítulo 1, seguramente en el caso del fragmento recombinante scFv2A debe existir algún tipo de limitación para su acumulación intracelular.

Líneas transgénicas	Porcentaje de plantas infectadas		
	15 dpi	valor Pr	30 dpi
NT	79 (19/24)		100 (24/24)
DF	100 (22/22)		100 (22/22)
C	89 (41/46)		100 (46/46)
A3-R1	48 (10/21)	0,0006	95 (20/21)
A3-R3	32 (6/19)	<0,0001	95 (18/19)
K1-R1	40 (12/30)	<0,0001	97 (29/30)
K1-R3	55 (12/22)	0,0026	100 (22/22)
N11-R1	30 (6/20)	<0,0001	100 (20/20)
N11-R3	60 (12/20)	0,0098	100 (20/20)

Tabla 3

Evolución de la infección por PPV en plantas de la progenie R₁ y R₃ de las líneas transgénicas A3, K1 y N11; y en plantas control inoculadas con PPV-GFP. El porcentaje de infección se indica en negrita. Cada fracción representa el número de plantas en las que se detectó virus mediante ELISA-DASI respecto al número total de plantas inoculadas. dpi: días post-inoculación.

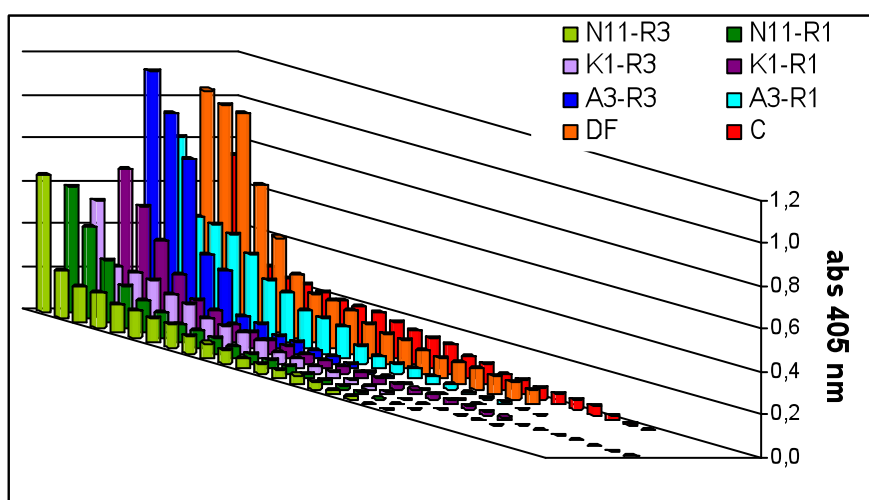


Figura 21

Análisis mediante ELISA-DASI de la acumulación de PPV (abs 405 nm) en extractos de hojas apicales (no inoculadas) de la progenie R₁ y R₃ de las líneas transgénicas A3, K1 y N11 inoculadas con PPV-GFP. El análisis se realizó a los 15 dpi. A cada valor de abs 405 nm de las plantas infectadas se le restó el valor obtenido frente a plantas no inoculadas (control negativo) y se dividió por el valor obtenido frente al extracto viral estándar de plantas infectadas con PPV (control positivo).

Si se comparan los resultados de los ensayos de desafío mediante inoculación mecánica del virus con los de los ensayos en los que se ha usado la inoculación mediada por *A. tumefaciens* del clon PPV-GFP se observan algunas diferencias. En el primer tipo de ensayo, a los 30 dpi, hubo líneas transgénicas tanto dentro de las A, como de las K y N, en las que los porcentajes de infección fueron inferiores y significativamente diferentes a los del grupo de plantas control. En estos ensayos, incluso a la mayor dosis de inóculo, al final del experimento las líneas A3, K1 y N11 presentaron cierto nivel de protección frente a la infección. En cambio, en los ensayos en los que se inoculaba con PPV-GFP, en el mismo período de tiempo post-inoculación sólo las líneas A presentaron porcentajes de infección menores que los de las control, y únicamente en la línea A5 estas diferencias fueron significativas.

Estas discrepancias podrían ser debidas a que en los dos tipos de ensayo se han usado dos tipos diferentes de aislado de PPV: el aislado 3.3 RB/Nb y el aislado Rankovich (R3). Ambos se replican bien en plantas herbáceas, además el epítipo reconocido por el fragmento scFv2A está conservado en todos los aislados de PPV (Esteban *et al.*, 2003) por lo la interferencia del anticuerpo debería ser la misma en los dos casos. De cualquier forma sería interesante realizar desafíos por inoculación mecánica con el aislado Rankovich y otros para determinar si las líneas transgénicas se comportan igual frente a todos ellos o no.

Asimismo hay que tener en cuenta que los dos procedimientos de inoculación difieren mucho en la forma de inducir la infección y también en la presión de inóculo que representa cada uno de ellos, y por tanto, muy probablemente esto también estaría influyendo en las diferencias de comportamiento de las líneas transgénicas frente a uno u otro.

La inoculación mecánica es un procedimiento más traumático para la planta, ya que provoca heridas sobre gran parte de la superficie de la hoja. Además, seguramente implica un mayor número de focos de infección, aunque no necesariamente mayor presión de inóculo. En cambio, la inoculación por pinchazo con un cultivo de *A. tumefaciens* portador del clon PPV-GFP, sería un procedimiento menos traumático y por tanto más efectivo, esto queda reflejado en un número de fallos de infección en las plantas control muy pequeño. Por otro lado este tipo de inoculación es más localizada que la inoculación mecánica, aunque seguramente proporciona

inicialmente mayor presión de inóculo al existir una gran cantidad de RNA viral transcribiéndose a partir del cDNA que contiene el vector inoculado junto con *Agrobacterium*. Este tipo de inoculación parece más fácil de contener en una etapa inicial, a los 15 dpi la mayoría de las líneas transgénicas inoculadas tiene entre 10 a 60% de infección, mientras que los controles tienen 100% de infección. La infección se mantendría localizada y se dispersaría más lentamente que cuando se produce por inoculación mecánica ya que existe un solo foco de infección y se tarda más tiempo en llegar al umbral de virus que supera la cantidad de scFv. En cualquier caso sería un tipo de inoculación muy eficiente ya que a los 30 dpi tanto el control como la mayoría de líneas transgénicas presentan porcentajes de infección del 100% o valores cercanos, sólo algunas líneas A tienen porcentajes de infección por debajo del 60%. Es posible que al generar menos daño en la hoja no desencadene repuestas de estrés en la planta que, en el caso de la inoculación mecánica, podrían entorpecer la infección ayudando en este caso a que el efecto de los scFvs fuese más efectivo a largo plazo.

Entre los dos experimentos de inoculación con PPV-GFP también existieron discrepancias ya que en el primer experimento la línea A3 presenta protección pero no es así en el segundo experimento. En este caso es posible que factores ambientales hayan influido en la diferente respuesta. Estos dos experimentos se realizaron en dos épocas del año diferentes, julio el primero y noviembre el segundo, y las plantas después de inoculadas se conservaron en invernadero. Por ello es posible que la diferencia de temperatura, mucho más alta en julio y menos favorable a la replicación de PPV (Glasa *et al.*, 2004), influyera en que la infección fuera más severa en el segundo experimento.

En líneas generales, los ensayos de desafío realizados han permitido comprobar que las diversas líneas transgénicas de *N. benthamiana* que expresan los fragmentos scFv2A, 6K2scFv2A o NLSscFv2A presentan diferentes grados de protección frente a la infección por PPV. En algunas plantas se ha observado el bloqueo total de la infección, ya que no han presentado síntomas ni acumulación viral a lo largo del tiempo que duraron los ensayos de desafío. En otras plantas se ha observado una protección parcial caracterizada por un retraso en la aparición de síntomas y/o por una menor acumulación viral al menos en las etapas iniciales de la

infección, aunque finalmente resultan infectadas. Estos resultados indicarían que los fragmentos scFv2A son capaces, de alguna forma, de interferir o inmunomodular el proceso de infección impidiendo su desarrollo normal. Sin embargo, para que el bloqueo de la infección sea eficiente, éste tiene que ocurrir en etapas muy iniciales cuando aún la cantidad de virus es limitada y no supera la cantidad efectiva de anticuerpo disponible, en caso contrario, la infección puede verse retrasada pero finalmente evoluciona con éxito.

Muy probablemente mejorando la estabilidad del fragmento scFv2A y por tanto su acumulación en la célula se mejorarían también los niveles de protección. Sin embargo, no siempre el nivel de acumulación resulta ser sinónimo de una mejor respuesta de protección. Recientemente se ha mostrado que un fragmento scFv específico de la proteína NS de movimiento de TSWV con niveles de acumulación muy elevados (8% del total de proteínas solubles) produce únicamente un retraso de 5-10 días en la aparición de síntomas (Zhang M.Y. *et al.*, 2008). En otros trabajos se observa como fragmentos scFv, específicos de la nucleoproteína del mismo virus, con similares niveles de acumulación pero con diferente especificidad dan resultado diferentes (Prins *et al.*, 2005). Por todo ello, no hay que dejar de lado la importancia que tiene la naturaleza del epítipo reconocido por el anticuerpo. Como se ha mostrado utilizando fragmentos scFv específicos de proteínas no estructurales como la proteína RdRp de TBSV (Boonrod *et al.*, 2004) o la proteína NIa proteasa de PVY (Gargouri-Bouid *et al.*, 2006), se han obtenido líneas transgénicas en las que todas sus plantas resultaron resistentes a la infección.

En el presente trabajo se escogió el fragmento scFv2A, específico de la proteína NIb de PPV implicada directamente en la replicación viral, el epítipo reconocido por el anticuerpo recombinante es una secuencia muy conservada entre los diferentes aislados de PPV, esto junto con los resultados de interferencia obtenidos indicaría su funcionalidad. Aunque es posible que dicha función no sea tan crucial en el proceso de replicación viral como para inhibirla de forma eficaz, al menos con la cantidad de anticuerpo disponible, y por tanto los resultados obtenidos hayan sido menos alentadores de lo esperado.

Aparte de las características intrínsecas del fragmento de anticuerpo recombinante utilizado, seguramente hay otros factores tanto relacionados

con el estado fisiológico de las plantas o con el medio ambiente que en una u otra forma afectarían a la capacidad de las plantas transgénicas que expresan los fragmentos scFv2A a hacer frente a la infección de PPV.

Dado que uno de los objetivos futuros sería obtener plantas resistentes a la enfermedad de la sharka en condiciones naturales de campo, será de gran importancia conocer los factores que afectan a la eficacia de la resistencia generada por los fragmentos scFv2A, u otros candidatos con diferentes especificidades, y en que forma lo hacen.

CAPÍTULO 3

“Expresión transitoria de fragmentos scFv2A en plantas de *Nicotiana benthamiana*. Evaluación de su capacidad para interferir con la infección viral”

1. INTRODUCCIÓN

A pesar del suceso único que resultó ser durante la década de 1990 el trabajo de Tavladoraki *et al.* (Tavladoraki *et al.*, 1993), no parece tarea fácil obtener plantas transgénicas que expresen scFvs de forma que los niveles de acumulación sean altos en el ambiente reductor del citoplasma celular, o al menos suficientes para interactuar con su antígeno y bloquear así su función de forma eficaz y duradera.

Cada vez se dispone de más recursos y técnicas para aislar Rabs (Hoogenboom, 2005) con parámetros de afinidad suficientes para unirse a su antígeno y bloquear su función incluso a concentraciones pequeñas, o con mayor estabilidad en ambientes reductores, como el citoplasma celular (Philibert *et al.*, 2007; Villani *et al.*, 2008; Seo *et al.*, 2009). También existe la posibilidad de mejorar la estabilidad y/o afinidad de Rabs específicos mediante técnicas de evolución *in vitro*, lo que implica producir variaciones al azar y seleccionar a posteriori las variantes con las mejores características. Al mismo tiempo el gran avance en el conocimiento de la secuencia de numerosos fragmentos scFv y la información sobre su nivel de estabilidad en ambientes reductores han permitido determinar algunos residuos de aminoácidos clave, que favorecen la estabilidad en ambientes reductores (Jung *et al.*, 2001; Ewert *et al.*, 2003; Honegger *et al.*, 2009). Esto permitiría diseñar de forma racional cambios puntuales en residuos que podrían mejorar la capacidad de acumulación intracelular de algunos scFvs.

A pesar de todo, no existe una estrategia generalizada que se pueda aplicar, ya que cada fragmento scFv tiene una secuencia de aminoácidos particular y de ella depende en gran medida la estabilidad. De manera que en cualquiera de los casos, la única forma directa de comprobar la estabilidad y capacidad de acumulación de un fragmento scFv en el citoplasma de células vegetales es mediante su expresión *in planta*. Además, es la mejor forma de medir su capacidad de interacción con el antígeno y probar el efecto que puede producir en la función del mismo.

No obstante, la transformación y regeneración de la mayoría de plantas superiores continúa siendo un proceso tedioso que requiere tiempo y es a menudo también costoso. Incluso con especies para las que este proceso está muy simplificado puede llevar meses el tener una planta transgénica apropiada para su análisis. Por todo ello, es necesario buscar

métodos alternativos más rápidos y sencillos con los que realizar pruebas previas, de forma que se seleccionen para la transformación estable formatos (o versiones) con el mayor grado de efectividad posible para que aseguren el resultado de la estrategia de inmunomodulación.

Los ensayos basados en expresión transitoria, donde la integración genómica del transgen no interviene, proporcionan un sistema alternativo para el análisis funcional de genes en plantas. Comparando con la transformación estable, la transformación transitoria tiene la ventaja de que se puede medir de forma sencilla y rápida el nivel de expresión del gen o genes de interés en un corto tiempo tras la introducción del DNA en las células. Además la expresión no está influenciada por el efecto de la posición en que se haya insertado el DNA.

Existen diferentes métodos para la introducción del DNA de interés en las células de plantas: (1) métodos de introducción directa, que se basan en la disrupción mecánica o química de la pared y/o membrana celular e incluyen el bombardeo con partículas, la transformación de protoplastos, la microinyección y otros, (2) sistemas basados en vectores virales, que consisten en clones virales en los que la secuencia codificante de la proteína de interés se incluye en el genoma viral, de manera que dicha proteína será producida tras la infección y replicación del virus en las células de la planta, y (3) sistemas basados en bacterias infecciosas, en los que el DNA de interés se clona en un plásmido de transferencia y es transportado activamente al núcleo de las células de la planta infectadas por proteínas de la bacteria junto con proteínas de la planta. Entre estos el que emplea la maquinaria molecular de *A. tumefaciens* es uno de los sistemas de expresión transitoria más utilizados.

Los experimentos iniciales en expresión transitoria mediada por *A. tumefaciens* comprendían el cocultivo de explantes de hoja con suspensiones de *Agrobacterium* del mismo modo que se procedía para la transformación nuclear estable (Fraley *et al.*, 1984; Horsch *et al.*, 1986; Janssen y Gardner, 1993). Una mejora clave que extendió el uso de esta metodología fue la agroinfiltración. La agroinfiltración consiste en la infiltración del tejido vegetal mediante vacío (Kapila *et al.*, 1997; Schob *et al.*, 1997) o con ayuda de una jeringa (Llave *et al.*, 2000) con cultivos de *A. tumefaciens* portadores de un T-DNA en el que se ha introducido el gen de interés que se desea expresar en la célula vegetal. En este caso, lo que

ocurre es que la suspensión bacteriana reemplaza el fluido apoplástico y las bacterias ocupan los espacios intersticiales entre las células del parénquima de las hojas. Una vez allí, las bacterias interactúan con la célula vegetal a través de receptores, posiblemente específicos, localizados tanto en la planta como en la bacteria (Mathysse, 1986; Sheng y Citovsky, 1996). Compuestos fenólicos de bajo peso molecular son reconocidos por el producto del gen de virulencia *vir A* que actúa activando mediante fosforilación a la proteína codificada por el gen *vir G*, responsable de la activación transcripcional del resto de los genes *vir* (Zupan *et al.*, 2000). Los productos de estos genes *vir* catalizan la transferencia del T-DNA, que contiene el gen de interés, al núcleo de la célula vegetal (Zupan *et al.*, 1996; Ward *et al.*, 2002). Durante un espacio de tiempo, el T-DNA no se integra en el genoma de la célula vegetal sino que queda presente en el núcleo, donde puede ser transcrito y posteriormente expresado en la proteína de interés (Kapila *et al.*, 1997). Aparentemente, en la mayoría de las células el T-DNA después de unos días es degradado y solamente unas pocas copias del T-DNA se integran en el genoma de la célula dando lugar a una transformación estable. La observación de que la cantidad de células transformadas de forma transitoria sobrepasa al menos en dos ordenes de magnitud el número de transformantes estables que se obtiene (Janssen y Gardner, 1990; Dafny-Yelin *et al.*, 2008) fue una de las razones que estimuló el interés por la expresión transitoria. En realidad el proceso de transferencia del T-DNA a una célula vegetal mediado por *A. tumefaciens* es un proceso muy eficiente, al menos en algunas dicotiledóneas. En *N. benthamiana* la infiltración del tejido de una hoja con una suspensión de *A. tumefaciens* tiene en algunos casos como resultado la expresión transitoria en casi el 100% de las células del mesófilo.

Es por ello que esta técnica se ha explotado fundamentalmente como sistema de producir proteínas recombinantes en plantas. Entre otras se han producido fragmentos scFv (Vaquero *et al.*, 1999), moléculas completas de anticuerpo (Eeckhout *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2005) y distintas proteínas virales (Annamali *et al.*, 2005; Goytia *et al.*, 2006; Meyers *et al.*, 2008; D'Aoust *et al.*, 2008). Pero cada vez más también se usa para estudios de interacción entre diferentes proteínas, silenciamiento, etc.

Las principales ventajas de la agroinfiltración con jeringa es que se puede aplicar tanto a tejidos como a hojas de plantas completas por lo que se puede analizar cual es la respuesta de la planta en diferentes condiciones ambientales, o realizar paralelamente diferentes tratamientos. Además tiene menos variabilidad que por ejemplo el bombardeo con partículas. Por todo ello, la expresión transitoria mediada por *Agrobacterium* o agroinfiltración podría ser un método ideal para comprobar la estabilidad de un fragmento de anticuerpo determinado, verificar que reconoce a su antígeno y que es capaz de neutralizar su función. Además, es un método sencillo, y sobre todo rápido por lo que se puede aplicar a un mayor número de fragmentos recombinantes.

En este capítulo se realiza expresión transitoria de fragmentos scFv2A mediante agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* y se evalúa su capacidad de interferir con la infección de PPV.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal y plásmidos utilizados.

Para los ensayos de expresión transitoria de fragmentos de anticuerpo recombinantes se utilizaron los *A. tumefaciens* de la cepa C58 recombinantes (pMP90) (Koncz y Schell, 1986) *AtC58/pBI-NLSscFv2A*, *AtC58/pBI-6K2scFv2A* y *AtC58/pBI-scFv2A* descritos en el capítulo 1 (apartado 2.1). También se usó como control negativo una cepa de *A. tumefaciens* recombinante portadora del vector pBI-scFvcontrol (*AtC58/pBI-scFvcontrol*) que contiene la secuencia del fragmento scFv recombinante 2A10 específico del fitoplasma del *stolburn* (Le Gall *et al.*, 1998), y que no reconoce ninguna proteína del virus de la sharka.

En todos los experimentos se emplearon plantas de *N. benthamiana* de cuatro semanas de crecimiento no transgénicas y/o transgénicas de la progenie R₁ de las líneas A3, N11 y K1.

2.2. Expresión transitoria de fragmentos scFv2A

2.2.1. Método de agroinfiltración

Las células de *A. tumefaciens* C58 portadoras de cada una de las construcciones se seleccionaron en medio LB-Rif₁₀₀Gen₁₀₀Kan₅₀. Cada clon

fue cultivado en agitación a 200 rpm y a 28 °C en medio LB suplementado con 10 mM de Ácido 2-morfolinoetanosulfónico monohidrato (MES) (pH 5,6), 20 µM de acetosiringona y los correspondientes antibióticos de selección (Rif₁₀₀Gen₁₀₀Kan₅₀), hasta alcanzar una OD₆₀₀=0.5-0.8. Posteriormente, se centrifugaron los cultivos y las bacterias se resuspendieron en medio de infiltración (10 mM MES (pH 5,6), 10 mM MgCl₂ y 200 µM de acetosiringona) de forma que la OD₆₀₀ de la suspensión final se ajustara a 1.0-1.5. La suspensión de bacterias se mantuvo al menos durante dos horas a temperatura ambiente antes de proceder a la infiltración del material vegetal. La agroinfiltración de las hojas de *N. benthamiana* se realizó aplicando 1 ml de las suspensiones bacterianas a presión, mediante una jeringa sin aguja, directamente sobre el envés, de forma que ocuparan todo el espacio intersticial de la hoja. Se procuró infiltrar de forma homogénea toda la superficie de la hoja.

Se utilizaron plantas de *N. benthamiana* no transgénicas de 4 semanas de crecimiento (estadio de 5-6 hojas). En cada planta se agroinfiltraron tres hojas, en diferentes estadios de desarrollo. La primera hoja totalmente expandida de la parte superior de la planta (hoja 1), la hoja inmediatamente inferior (hoja 2) y la siguiente inferior (hoja 3). Tras la agroinfiltración, cada 24 horas durante ocho días, se cortó y congeló una hoja agroinfiltrada con cada una de las construcciones. Las hojas se conservaron a -80°C para su posterior análisis mediante ELISA indirecto y “western blot”.

2.2.2 Análisis “western blot”

A partir de hojas agroinfiltradas se obtuvo un extracto de proteína total. Para la obtención del extracto y para realizar los análisis “western blot” se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado 2.2.3 del capítulo 1.

2.2.3.ELISA-indirecto

Se tapizaron placas Maxisorp™ (Nunc) con 200 µl de extracto de hojas agroinfiltradas mezclado a partes iguales con tampón carbonato 2x y se incubaron a 4°C durante toda la noche. La detección de los fragmentos scFv se realizó incubando con el anticuerpo monoclonal anti-6xhis

(1:1000) (Invitrogen) durante 2h a 37°C y seguidamente con GAM-AP (1:5000) (sigma) 1h 30 min a 37°C, ambos anticuerpos se diluyeron en PBS-1%BSA. El revelado se realizó incubando con el substrato BCIP-NBT (Sigma-Fast). Posteriormente se midió la abs de las muestras a 405 nm.

2.3. Ensayos de interferencia con la infección viral

2.3.1. Método de inoculación viral

Para las inoculaciones se utilizó el extracto viral estándar (descrito en la sección 2.1 del capítulo 2) de hojas de *N. benthamiana* infectadas con el aislado 3.3 RB/Nb de PPV a una concentración final de 5.018×10^6 copias de virus/ml. Se utilizaron dos métodos diferentes de inoculación del virus: (1) inoculación mecánica, para ello se aplicó el extracto viral estándar, sobre el haz de las hojas, y se usó carburundum como abrasivo, (2) infiltración, para ello se aplicó el extracto viral estándar a presión con ayuda de una jeringa sin aguja directamente sobre el envés de las hojas y procurando infiltrar de forma homogénea toda su superficie.

Se recogieron muestras, a diferentes tiempos post-inoculación, de las hojas inoculadas y de las hojas apicales totalmente expandidas. Para ello se utilizó la tapa de un tubo Eppendorf a modo de sacabocados, cada muestra correspondió a cuatro círculos de hoja (≈ 100 mg de peso fresco) recogidos en hojas del mismo estado de desarrollo de plantas distintas a las que se les había aplicado el mismo tratamiento. Las muestras se congelaron inmediatamente en N₂ líquido y posteriormente se conservaron a -80°C hasta el momento de su análisis.

2.3.2. ELISA-DASI

Se obtuvo un extracto triturando los cuatro círculos de hoja dentro del tubo Eppendorf con ayuda de un émbolo y con cinco volúmenes de tampón de extracción de frutales (Cambra *et al.*, 1994). En el extracto resultante se analizó la acumulación viral mediante ELISA-DASI como se ha descrito ya en el apartado 2.4.2 del capítulo 2.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Evaluación de la acumulación de los fragmentos scFv2A, NLSscFv2A y 6K2scFv2A en hojas de *Nicotiana benthamiana*

Con objeto de determinar el periodo post-infiltración con los máximos niveles de expresión transitoria, se evaluó el nivel de acumulación de los diferentes fragmentos scFv2A en extractos de las hojas recogidas a diferentes tiempos post-infiltración.

Los resultados del análisis ELISA-indirecto mostraron que se podía detectar la acumulación del fragmento scFv2A durante el primer y segundo día tras la agroinfiltración, siendo luego indetectable (Figura 22A). De forma similar se detectó acumulación del fragmento NLSscFv2A únicamente durante los primeros tres días tras la agroinfiltración (Figura 22B). En cambio, la acumulación del fragmento 6K2scFv2A se pudo detectar durante todo el tiempo post-agroinfiltración analizado (Figura 22C). Posiblemente estas diferencias se deben a las propiedades intrínsecas de cada uno de los fragmentos. La mayor acumulación del fragmento 6K2scFv2A podría estar relacionada con su mayor estabilidad al estar asociado a membranas, como ya se ha comentado en el capítulo anterior.

Por otra parte, se observaron diferencias en los niveles de acumulación dependiendo del estado de desarrollo de las hojas agroinfiltradas. Se detectó acumulación de los fragmentos scFv en las dos hojas más jóvenes (hojas 1 y 2), presentando mayores niveles de acumulación la hoja más madura (hoja 2). Sin embargo, en la hoja 3 más madura que la anterior no detectamos acumulación de fragmentos scFv. Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos por otros autores y que indican que para el gen reportero GFP, bajo control de promotor constitutivo 35S de CaMV y en condiciones óptimas de expresión el máximo rendimiento se obtiene en hojas jóvenes pero bien diferenciadas (Wydro *et al.*, 2006). Seguramente esto es debido, entre otras variables, a que la penetración de la suspensión bacteriana en las capas internas del parénquima de la hoja esté más favorecido en tejidos jóvenes que en los más maduros completamente diferenciados. La edad de la planta es otro factor que también influye en el rendimiento de la agroinfiltración, se ha descrito que agroinfiltrado plantas en el estadio previo a la floración se

obtienen mejores resultados que con plantas más jóvenes (Sheludko *et al.*, 2007).

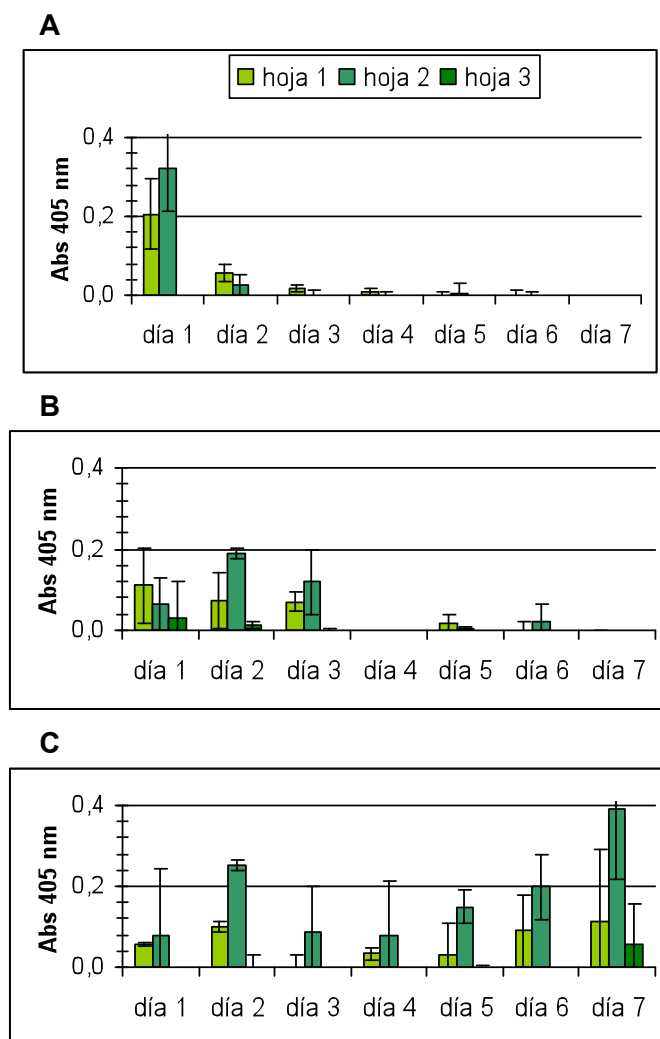


Figura 22

Análisis mediante ELISA indirecto para evaluar la acumulación de fragmentos scFv (detección con Mab anti6xhis) en extractos de hojas en diferentes estadios de desarrollo (hoja 1, hoja 2 y hoja 3, ordenadas de más a menos joven), y a diferentes días post-agroinfiltración (dpi). Las hojas fueron agroinfiltradas con los siguientes cultivos de *A. tumefaciens* recombinantes: AtC58/pBI-scFv2A (gráfico A), AtC58 pBI/NLSscFv2A (gráfico B) y AtC58/pBI-6K2scFv2A (gráfico C).

Los análisis “western blot” mostraron que la acumulación de los fragmentos scFv2A y 6K2scFv2A se pudo detectar entre el primer y segundo día tras la agroinfiltración (Figura 23). Los niveles de acumulación fueron similares, o con un ligero aumento el tercer y cuarto día post-agroinfiltración, en el caso del fragmento 6K2scFv2A. El fragmento NLSscFv2A no pudo ser detectado por “western blot” en los extractos de las hojas agroinfiltradas analizadas. Ello pudo deberse que el método de extracción no fue el más adecuado para extraer proteínas de localización nuclear.

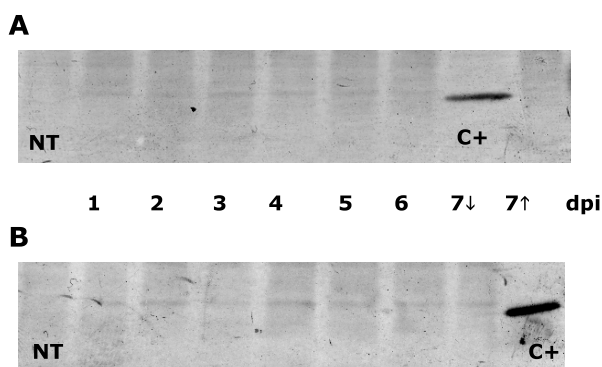


Figura 23

Análisis mediante “western blot” de la acumulación de los fragmentos scFv (detección con Mab anti6xhis) en extractos de hojas de *N. bentamiana* agroinfiltradas con los cultivos de *A. tumefaciens* recombinantes: AtC58/pBI-scFv2A (panel A), y AtC58/pBI-6K2scFv2A (panel B).

En general, después de la agroinfiltración, el nivel de expresión del transgen tiene su pico máximo a los 2-4 dpi, se mantiene hasta los 8-10 dpi y declina rápidamente después (Sheludko *et al.*, 2007). En este caso, los niveles de acumulación deben estar limitados más probablemente por la estabilidad intrínseca del fragmento scFv2A. En este sentido apunta el hecho de que no se aprecie un pico de máxima expresión que decae con el tiempo, que es lo que ocurre con la expresión transitoria de otras proteínas, sino que se observe una acumulación más o menos constante en el tiempo y que finalmente decae. Estos resultados estarían en concordancia con los del capítulo 1 de limitada estabilidad del scFv2A. No

obstante, el hecho de que sea posible la detección mediante “western blot” del fragmento scFv2A durante la expresión transitoria indicaría que hay una cantidad mayor de producto del que existe en las plantas transformadas de forma estable, aunque esta diferencia no es tan grande como la que se ha descrito para otras proteínas. En general cuando se ha utilizado la expresión transitoria de scFvs como método previo para evaluar su nivel de acumulación antes de la transformación estable los resultados obtenidos han sido similares entre la expresión transitoria y estable (Nölke *et al.*, 2009; Safarnejad *et al.*, 2009).

3.2. Efecto de la expresión transitoria de los fragmentos scFv2A, NLSscFv2A y 6K2scFv2A en hojas de *Nicotiana benthamiana* sobre la infección viral

Para comprobar que la expresión transitoria de los fragmento scFv2A interfería con la infección por PPV y en que medida lo hacía, se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* no transgénica con suspensiones de AtC58/pBI-scFv2A, AtC58/pBI-NLSscFv2A y AtC58/pBI-6K2scFv2A. Esas mismas hojas se inocularon con extracto viral estándar (concentración final de $5,018 \times 10^6$ copias de RNAviral/ ml) de dos formas diferentes.

En el primer experimento la inoculación del virus se realizó mediante la infiltración del extracto viral. Dicha infiltración se llevó a cabo bien a la vez que la agroinfiltración mezclando el extracto viral con las suspensiones de *Agrobacterium* portadoras de los fragmentos scFv, o bien 24 horas después de la agroinfiltración con las suspensiones de *Agrobacterium* portador de los fragmentos scFv, para dejar tiempo a que se transcribieran los fragmentos scFvs. Seguidamente, se analizó mediante análisis ELISA-DASI la acumulación viral en hojas jóvenes a diferentes tiempos post-inoculación.

Entre los 3-5 dpi, se pudo observar que las plantas en las que el virus se infiltró 24 h después que los fragmentos scFv (Figura 24A) acumularon menor cantidad de virus comparando con las plantas control, infiltradas únicamente con el extracto viral. Estas diferencias no fueron significativas, seguramente, debido a la gran variabilidad entre plantas con el mismo tratamiento y al reducido número de plantas. Cuando la infiltración del extracto viral se realizó a la vez que la agroinfiltración con las

suspensiones de *A. tumefaciens* (Figura 24B) no se apreciaron estas diferencias. En ambos casos todas las plantas, tanto las plantas control como las infiltradas con los fragmentos recombinantes, resultaron infectadas de forma sistémica por PPV.

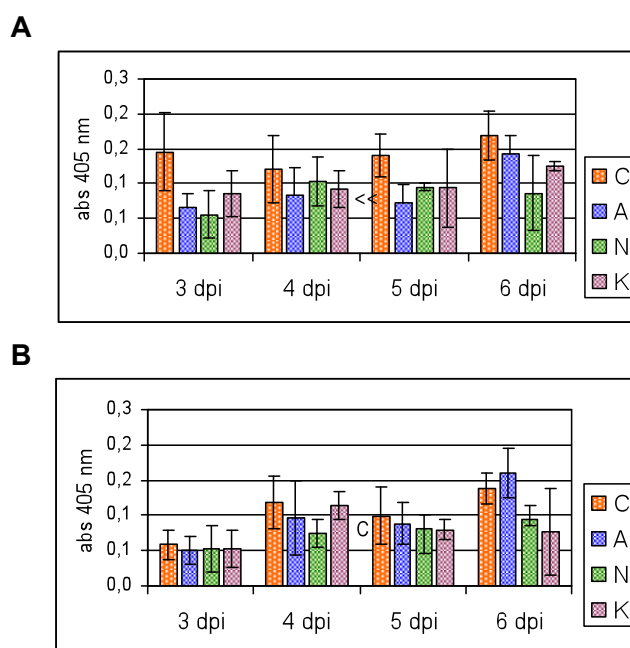


Figura 24

Análisis mediante ELISA-DASI (abs 405 nm) para evaluar la acumulación de PPV en hojas apicales de plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con suspensiones de los cultivos de *A. tumefaciens* recombinantes: AtC58/pBI-scFv2A (A), AtC58/pBI-NLSscFv2A (N) y AtC58/pBI-6K2scFv2A (K) e inoculadas mediante infiltración del extracto viral estándar de PPV 3.3Rb/Nb-NAT, con 24 horas de desfase (gráfico A) o conjuntamente a la agroinfiltración (gráfico B). Las columnas y barras representan la media y desviación estándar de los valores de abs 405 nm de cinco plantas agroinfiltradas independientemente.

Otros autores han obtenidos resultados similares (Boonrod *et al.*, 2004). Ellos han observado que la expresión transitoria en hojas de *N. Benthamiana* de fragmentos scFv específicos de la replicasa viral de TBSV produce únicamente retraso en la aparición de síntomas sistémicos pero no se ha podido evitar que las plantas finalmente se infectaran. Este efecto resulta comprensible ya que se trata de plantas no transgénicas y cuando

la expresión del fragmento scFv decae el virus puede replicarse y cuando alcanza el sistema vascular extenderse libremente al resto de la planta.

En el segundo experimento se agroinfiltraron hojas de plantas transgénicas de las líneas A, N y K con suspensiones de *AtC58/pBI-scFv2A*, *AtC58/pBI-NLSscFv2A* o *AtC58/pBI6K2-scFv2A*, respectivamente. Después de 48 horas se inocularon con un extracto viral de PPV mediante inoculación mecánica o por infiltración (en ambos casos la concentración final fue de 5.018×10^6 copias de RNA viral por ml). También se utilizó un grupo de plantas control, no transgénicas, que únicamente se inocularon con el extracto viral.

Cuando la inoculación viral se realizó mediante infiltración los resultados mostraron que no se observó infección sistémica en muchas de las plantas agroinfiltradas con los fragmentos scFv. Mientras que únicamente una de las plantas control no resultó infectada (Figura 25A). Por el contrario, cuando las plantas se inocularon mecánicamente con el extracto viral, resultaron infectadas todas, indistintamente de si se habían agroinfiltrado previamente con los fragmentos scFv o no (Figura 25A).

Este resultado indicaría que la inoculación mecánica resulta ventajosa para el virus. Posiblemente esto sea debido a que en este proceso se generan heridas en la superficie de las hojas por las cuales el virus podría acceder más fácilmente al interior de las células. En cambio la infiltración del extracto viral genera menos daño en el tejido, y aunque la cantidad de virus en contacto con las células del parénquima puede ser mayor, a este no le sería tan fácil acceder al interior celular, por ello el virus estaría en desventaja y se pudo observar la interferencia producida por los fragmentos scFv2A.

Por otra parte, en este experimento se han utilizado plantas transgénicas que expresan ya los fragmentos scFv de forma estable. Por ello tendríamos, por una parte el efecto adicional de la expresión transitoria de los fragmentos scFv en las hojas inoculadas (previamente también agroinfiltradas), y por otra la expresión constitutiva en toda la planta, así que finalmente hay plantas que vencen a la infección y se mantienen sanas. Al mismo tiempo, el análisis mediante ELISA-DASI mostró que algunas de las plantas transgénicas de la línea A infectadas sistémicamente acumularon menor cantidad de virus que las plantas

control y que las del resto de líneas transgénicas, manteniéndose estas diferencias incluso a los 15 dpi (Figura 25B).

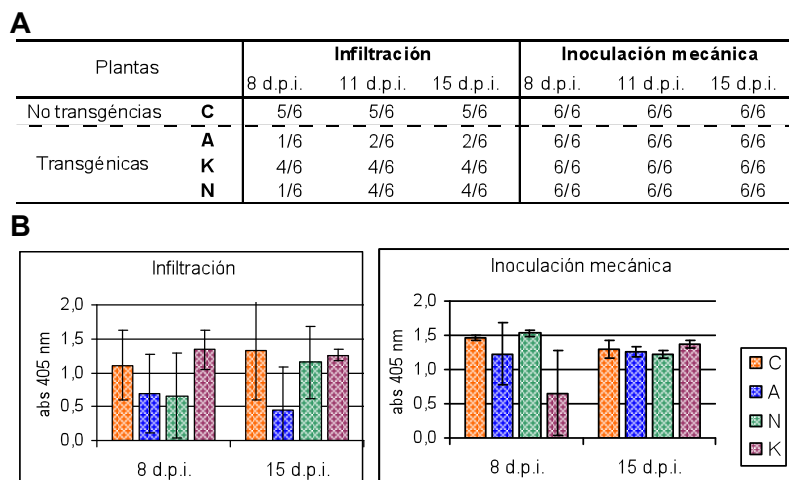


Figura 25
Evolución de la infección viral en plantas R₁ de líneas transgénicas que expresan los fragmentos recombinantes de anticuerpo scFv2A, NLSscFv2A y 6K2scFv2A agroinfiltradas respectivamente con suspensiones de los cultivos de *A. tumefaciens* recombinantes: AtC58/pBI-scFv2A (A), AtC58/pBI-NLSscFv2A (N) y AtC58/pBI-6K2scFv2A (K) y en plantas no transformadas como control (C). Las plantas se inocularon, 48 horas tras la agroinfiltración, con el extracto viral estándar de PPV 3.3Rb/Nb-NAT mediante infiltración o inoculación mecánica del mismo. Las fracciones indican el número de plantas infectadas respecto del número total de plantas inoculadas (panel A). Análisis mediante ELISA-DASI (abs 405 nm) de la acumulación de PPV en hojas apicales en las mismas plantas. Las columnas y barras representan la media y desviación estándar de los valores de abs 405 nm de seis plantas agroinfiltradas independientemente en el caso de la inoculación mecánica. En el caso de la infiltración del virus se consideraron únicamente las plantas infectadas (panel B).

En ambos experimentos se analizó mediante ELISA-DASI la acumulación de PPV en hojas inoculadas con extracto viral, pero en la mayoría de las muestras el resultado fue negativo, aunque paradójicamente en la mayoría de los casos si se observó posteriormente infección sistémica. Posiblemente la imposibilidad de detectar el virus en las hojas inoculadas sea debido a que la cantidad de material vegetal tomado como muestra (100 mg) no fue suficiente para el ensayo ELISA. Además, las muestras se tomaron cortando círculos en las hojas mediante la tapa de un tubo Eppendorf, y puesto que la distribución del virus no es homogénea en toda la hoja, es posible que no siempre se tomara tejido

infectado. Por otro lado, las muestras a los distintos tiempos post-inoculación se recogieron sobre las mismas hojas, y esto también pudo influir de forma negativa en la multiplicación del virus, si se elimina fuente de inoculo. Todo esto se debe tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados, puesto que así se podrían explicar los bajos valores ELISA obtenidos en el primer experimento para las hojas infectadas de forma sistémica. El mayor inconveniente de no poder detectar el virus en las hojas inoculadas es que no se puede descartar con certeza que la ausencia de infección sistémica en las plantas transgénicas en el segundo experimento no sea debido a un fallo de inoculación viral.

En definitiva la agroinfiltración de fragmentos scFv resultaría una buena estrategia para evaluar su capacidad de acumulación en las células vegetales previamente a la transformación estable. En algunos trabajos se ha observado, mediante expresión transitoria en hojas, como diferentes fragmentos scFv procedentes de genotecas “phage-display” presentan diferentes niveles de acumulación (Nölke *et al.*, 2009) pudiendo así seleccionar los más estables para la posterior transformación estable. Es de esperar que exista una correlación entre lo que ocurre durante la expresión transitoria y lo que sucedería en una eventual transformación estable con la misma construcción. Otra ventaja de la expresión transitoria mediante agroinfiltración sería que se pueden ensayar las mismas construcciones con las mismas secuencias promotoras y terminadoras que se utilizarán luego para la transformación estable. Y finalmente, mediante la puesta a punto del método se pueden trasladar los ensayos a múltiples especies vegetales como lechuga (Negrouk *et al.*, 2005), viña (Zottini *et al.*, 2008) y guisante (Green *et al.*, 2009) como se ha demostrado recientemente.

En cambio, para estudiar el efecto que producen los fragmentos scFv2A sobre la infección de PPV es necesario desarrollar un sistema alternativo. Dicho sistema debería permitir analizar lo que ocurre en los momentos más iniciales de la infección en las hojas inoculadas, puesto que el desarrollo o no de la infección parece depender fundamentalmente de la interacción virus-scFv en un momento muy inicial de la misma. Sobre todo se ha de buscar una forma alternativa de inducir la infección, que combine un procedimiento de inoculación seguro con un sistema no destructivo para poder evaluar la invasión inicial de la planta por el virus.

CAPÍTULO 4

“Expresión transitoria conjunta de fragmentos scFv2A y PPV-GFP en plantas de *Nicotiana benthamiana*”

1. INTRODUCCIÓN

El estudio de los virus de plantas se ha visto limitado en muchas ocasiones por las infecciones fallidas o asincrónicas cuando se utilizan partículas virales, RNA desnudo o DNA viral clonado como fuentes de inóculo para introducirlos en las plantas. Los intentos se suelen realizar por medios mecánicos o mediante insectos vectores. Estas limitaciones se hacen aún más patentes cuando el objeto de estudio es determinar el lugar de inicio o establecer cuales son los acontecimientos iniciales de la infección viral. Dos avances metodológicos han simplificado el estudio de la biología de los virus.

En primer lugar la adaptación de la proteína verde fluorescente (GFP de inglés "Green Fluorescent Protein") de *Aequorea victoria*, una medusa, como marcador *in vivo* de genomas virales (Baulcombe *et al.*, 1995). La GFP ofrece numerosas ventajas frente a otros marcadores, como el GUS o la luciferasa, ya que no necesita substratos externos para su detección, además es muy estable en las células vegetales y no resulta tóxica para la planta. Cuando es iluminada con luz UV la GFP emite una fluorescencia brillante que permite su seguimiento cuando se ilumina con lámparas de mano, o mediante lupas o microscopios. El uso de clones virales marcados con GFP ha aumentado de forma extraordinaria la posibilidad de observar y estudiar sucesos intra e intercelulares que tiene lugar durante la infección local o sistémica. Existe la posibilidad durante las primeras horas post-inoculación de identificar las células inoculadas, estudiar la cinética de acumulación viral en dichas células (Hagiwara *et al.*, 2003) y darles una localización precisa dentro del lugar de infección (German-Retana *et al.*, 2000). De igual forma se puede observar la invasión de células adyacentes y el movimiento a larga distancia de virus (Cheng *et al.*, 2000). La posibilidad de marcar los genomas de los Potyvirus insertando un gen reportero entre las proteínas P1 y HC-Pro fue demostrada inicialmente con el TEV (Dolja *et al.*, 1992) y más tarde extendida a otros miembros del género (Revers *et al.*, 1999). Los virus marcados con la proteína verde fluorescente han sido intensivamente usados para estudiar la invasión viral en diferentes sistemas virus-plantas herbáceas (Oparka *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999; German-Retana *et al.*, 2000;). Más recientemente *Lettuce mosaic virus* (LMV) marcado con GFP ha sido probado como una herramienta muy relevante para testar la resistencia al virus de diversas

variedades de lechuga en condiciones de invernadero (Candresse *et al.*, 2002; Mazier *et al.*, 2004). *Plum pox virus* fusionado a GFP ha servido para demostrar que en ocasiones se produce movimiento a larga distancia del virus en albaricoqueros, en principio, resistentes a la infección (Ion-Nagy *et al.*, 2006). Igualmente se ha utilizado para estudiar la interacción de PPV con sus huéspedes naturales (Lansac *et al.*, 2005) y diferentes respuestas fisiológicas de las plantas frente a la infección por el virus (Días-Vivancos *et al.*, 2006; 2008)

En segundo lugar la “agroinfección”, término utilizado por primera vez por Grimsley *et al.* (1986) para describir el uso de *A. tumefaciens* en la introducción de moléculas infecciosas, generalmente virus o viroides, en plantas. Mediante esta tecnología, una copia de cDNA del virus junto con secuencias promotoras y terminadoras funcionales en plantas es transferido dentro del T-DNA de *A. tumefaciens* al núcleo de las células vegetales. Una vez allí se transcribe para generar RNAs virales activos que pueden iniciar su autorreplicación y el movimiento célula a célula hasta alcanzar el floema y llegar así a toda la planta generando una infección sistémica. Este tipo de inoculación también ha sido descrita con el término de “agroinoculación” por otros autores (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1988).

El número de laboratorios que usan la agroinoculación de clones virales marcados o no con GFP para investigar diversos aspectos de su interacción con plantas ha crecido exponencialmente en pocos años. Esta técnica ha simplificado el estudio de un gran número de virus, sobre todo los que se transmiten por vectores específicos. Se ha utilizado para llevar a cabo análisis de infectividad, determinar la gama de huéspedes, validar virus como agentes causales de enfermedades, caracterizar nuevos virus y sus genomas mediante mutagénesis, análisis de recombinación entre virus relacionados, y para estudiar el silenciamiento génico producido por los virus (VIGS). También ha sido muy valiosa para identificar líneas resistentes a la infección, pero sobre todo, combinada con la agroinfiltración de diversos elementos (Bendahmane *et al.*, 2000), puede servir para ensayar su actividad antiviral.

En este sentido en este último capítulo se combina la expresión transitoria de scFvs mediante agroinfiltración con la agroinoculación de un clon viral de PPV fusionado a GFP, para evaluar el efecto de diferentes versiones de scFv2A frente a la infección por PPV.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal y plásmidos utilizados

Se utilizaron las cepas recombinantes de *A. tumefaciens*, AtC58/pBI-NLSscFv2A, AtC58/pBI-6K2scFv2A y AtC58/pBI-scFv2A (descritas en apartado 2.1 del capítulo 1) y AtC58/pBI-scFvcontrol (descrita en apartado 2.1 del capítulo 3). También se utilizó la cepa AtC58/pBI-PPV-GFP (descrita en apartado 2.3 del capítulo 2).

En todos los experimentos se emplearon plantas de *N. benthamiana* transgénicas de la progenie R₁ de las líneas A3, N11 y K1 y/o no transgénicas de cuatro semanas de crecimiento. Las plantas se mantuvieron en cámara de cultivo a 25°C, con 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

2.2. Método de agroinfiltración/agroinoculación

La agroinfiltración de los cultivos de *A. tumefaciens* se realizó tal y como se ha descrito en el apartado 2.2.1 del capítulo 3. La OD₆₀₀ en la suspensión final en medio de infiltración se ajustó a 1-1.5 en el caso de las bacterias AtC58/pBI-NLSscFv2A, AtC58/pBI-6K2scFv2A, AtC58/pBI-scFv2A y AtC58/pBI-scFvcontrol, y entre 0.1 y 0.001 para AtC58/pBI-PPV-GFP. En todos los experimentos se agroinfiltró una hoja por planta, salvo si se indica de otro modo. La hoja agroinfiltrada fue normalmente la tercera hoja joven totalmente expandida.

2.3. Evaluación de la infección viral

2.3.1. Análisis ELISA-DASI

A partir de hojas agroinfiltradas o apicales no infiltradas se obtuvieron extractos de proteína total siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 2.2.3 del capítulo 1. En los extractos resultantes se analizó la acumulación viral mediante ELISA-DASI como se ha descrito en el apartado 2.4.2 del capítulo 2.

2.3.2. Análisis “western blot”

A partir de hojas agroinfiltradas se obtuvo un extracto de proteína total. Para la obtención del extracto y para realizar los análisis “western blot” se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado 2.2.3 del capítulo 1. El revelado de las membranas se realizó incubándolas a temperatura ambiente, primero con el anticuerpo monoclonal anti-6xhis (1:1000) durante 2 horas, y seguidamente con GAM-AP (1:5000) (Sigma) durante 1 hora y 30 minutos. El revelado se realizó incubando con el substrato BCIP-NBT (Sigma-Fast, Sigma).

2.3.3. Análisis inmunopresión-ELISA

Se tomaron muestras a diferentes tiempos post-agroinoculación de hojas agroinfiltradas y no agroinfiltradas de *N. benthamiana*. Se realizaron impresiones de hojas y pecíolo sobre membranas de nitrocelulosa. Tras bloquear con PBS+1%BSA, las membranas se incubaron primero con los anticuerpos monoclonales 5B ó 2A (1:1000) específicos de la CP y Nlb de PPV, respectivamente durante 2 horas a 37°C, y seguidamente con GAM-AP (1:5000) (Sigma) durante 1 hora y 30 minutos. Los anticuerpos se diluyeron en PBS+0.5%BSA. El revelado se realizó incubando las membranas con el substrato BCIP-NBT (Sigma-Fast, Sigma).

2.3.4. Seguimiento de la fluorescencia GFP y conteo del número y tamaño de los focos de fluorescencia

La observación de la fluorescencia de la GFP se realizó como se explica en el apartado 2.4.3 del capítulo 2.

Las hojas agroinfiltradas se escindieron de la planta a los 3 dpi. Se fotografiaron entre dos y cuatro áreas, escogidas aleatoriamente, representativas de la superficie de cada una de las hojas. Las fotos se tomaron a la misma distancia focal y a los mismos aumentos. Posteriormente, se utilizó el programa ImageJ para cuantificar tanto el número como el tamaño de los focos de fluorescencia o foci en cada una de las áreas fotografiadas. Para cada hoja se obtuvo el valor medio de número y tamaño de foci (media \pm desviación estándar) a partir de los valores en cada una de sus áreas fotografiadas.

2.4. Análisis estadístico

Se aplicó un modelo lineal mixto utilizando las líneas como factor fijo y las plantas individuales como factor aleatorio jerarquizado al anterior. Las comparaciones frente al control se realizaron mediante un test de Dunnett. Para el resto de comparaciones se realizó mediante contrastes.

La variable área total fluorescente no se distribuye de forma normal, para “normalizarla” se aplicó la transformación logaritmo obteniendo resultados satisfactorios

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Evolución de la infección viral en plantas de *Nicotiana benthamiana* por agroinfiltración con pBI-PPV-GFP

Inicialmente para establecer el funcionamiento del sistema, se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con una suspensión de AtC58/pBI-PPV-GFP ($OD_{600}=0.5$) y se realizó el seguimiento, cada 24 horas, de la aparición de fluorescencia en las plantas con una lupa bajo luz UV.

Tras la agroinfiltración las células de *Agrobacterium* entran en contacto con las del parénquima de la hoja, produciéndose la transferencia del T-DNA al núcleo de estas. En una primera etapa la transcripción, expresión y replicación del RNA de PPV-GFP debe darse muy rápidamente. En experimentos de transfección de protoplastos con un clon de PPV similar al utilizado (Raghupathy *et al.*, 2006), otros autores han determinado, en primer lugar que se produce replicación viral además de la transcripción a partir del cDNA y, en segundo lugar que a las 12 horas se produce el pico máximo de acumulación viral, que luego disminuye a lo largo de las siguientes 12 horas. En este caso los primeros puntos verde fluorescente en las hojas agroinfiltradas se observaron a partir de los 2 dpi. Cada punto fluorescente constituye un incidente único de infección y corresponde a la transcripción, expresión y replicación del RNA de PPV-GFP en la célula inicialmente infectada y al grupo de células adyacentes a las que el virus ha infectado por el movimiento célula a célula. A los 3 dpi las hojas inoculadas estaban salpicadas de puntos fluorescentes independientes de forma más o menos redondeada, que correspondían a focos de infección o foci. A los 4 dpi, la superficie de la hoja agroinfiltrada

era casi completamente fluorescente sin que se pudieran distinguir focos independientes.

Una vez que el virus se replica de forma independiente y empieza a moverse célula a célula se extiende por la superficie de la hoja hasta que encuentra los haces vasculares por donde comienza su movimiento sistémico hasta alcanzar zonas más lejanas de la planta. La fluorescencia en hojas apicales, no infiltradas, debida a la infección sistémica, se determinó que aparecía entre los 5 y 9 dpi También se observó que una vez comenzada la invasión sistémica de la planta ésta se extendía muy rápidamente. A los 11 dpi la infección sistémica estaba bien establecida y había pocos tejidos de la planta que no expresasen GFP.

Las hojas apicales más jóvenes (no agroinfiltradas) es donde primero se observaron los síntomas típicos de la infección sistémica por PPV (Figura 26) como manchas cloróticas que coinciden con las manchas fluorescentes, bajo la luz UV, y que indican acumulación viral. Sin embargo, en las hojas agroinoculadas no se observaron síntomas típicos de sharka en ningún caso.



Figura 26

Síntomas típicos de infección sistémica por PPV en planta de *N. benthamiana* después de agroinfiltrar una hoja con un cultivo de AtC58/pBI-PPV-GFP ($OD_{600}=0.5$) (izquierda). Detalle de hoja con síntomas de PPV vista con luz blanca (derecha arriba) y con luz UV (derecha abajo).

Se realizaron también análisis de inmunopresión-ELISA para determinar la presencia viral en hojas agroinfiltradas y hojas apicales (no agroinfiltradas) a lo largo de 10 días tras la agroinfiltración. Se utilizaron los

anticuerpos monoclonales 5B y 2A específicos, respectivamente, de las proteínas CP y Nib de PPV, y se analizaron hojas agroinfiltradas como hojas jóvenes de la zona apical de las plantas (Figura 27).

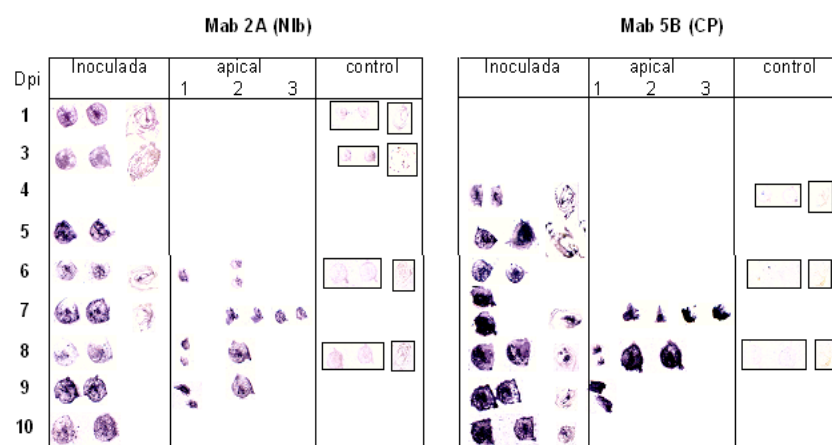


Figura 27

Análisis inmunopresión ELISA con los anticuerpos monoclonales 5B y 2A de hojas inoculadas mediante agroinfiltración con PPV-GFP ($OD_{600}=0.5$) (primera columna) y de hojas apicales (segunda columna) de la misma planta en diferentes estadios de desarrollo (1, 2 y 3 corresponden a la hoja más joven y las inmediatamente inferiores respectivamente) y hojas control (tercera columna) de plantas no agroinfiltradas. Las muestras fueron tomadas a diferentes días postagroinfiltración (dpi).

En las hojas agroinfiltradas se pudo detectar acumulación de la CP a partir de 4 dpi y hasta el final del experimento a los 12 dpi. En cambio la acumulación de la Nib se detectó desde el primer día y hasta el final del experimento, aunque parece que a partir de 5 dpi la señal es más intensa. Habría que destacar que la desaparición de señal a los 4 dpi, muy probablemente se debió a algún fallo experimental más que a la verdadera ausencia de la proteína. Este fenómeno podría explicarse por un fallo en la inmunopresión de la hoja y que no quedase suficiente material viral en la membrana para que se pudiese detectar la Nib. Un fallo en la inoculación de la hoja sería bastante improbable ya que las inmunopresiones analizadas con los dos anticuerpos fueron realizadas con la misma hoja, y en esa misma hoja sí que se detectó la presencia de la CP. Cuando se analizaron las hojas apicales (no agroinfiltradas), se observó que la

acumulación de la CP y la NIb virales se pudo detectar a partir de 6 y 7 dpi, respectivamente, y hasta el final del experimento. Estos resultados concuerdan con los de observaciones de la aparición sistémica de la fluorescencia por GFP en la planta.

En general los resultados del análisis mediante inmunopresión-ELISA son suficientemente sensibles y precisos. Sin embargo, cuando lo que se pretende es seguir el rastro del virus en la planta, al tratarse de una técnica destructiva, requiere que el análisis se realice en plantas diferentes y esto nos puede llevar a resultados incongruentes. Aunque se asume que si la inoculación se realiza de forma homogénea y todas las plantas son del mismo estadio de desarrollo ocurrirá lo mismo en todas ellas, esto no siempre ocurre así. Por todo ello es interesante disponer de un método no destructivo para seguir la invasión de las plantas por PPV. El uso de este clon de PPV marcado con GFP nos permitirá describir de forma más precisa la naturaleza de la resistencia o susceptibilidad tanto en las plantas transgénicas como en plantas de tipo silvestre en las que los fragmentos scFv se expresan de forma transitoria.

3.2. Efecto de la expresión estable de fragmentos scFv2A, NLSscFv2A o 6K2scFv2A en la evolución de la infección por PPV-GFP

En un primer experimento se agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* transgénicas R₁ de las líneas A3, N11 y K1 que expresan, respectivamente, los fragmentos recombinantes scFv2A, NLSscFv2A y 6K2scFv2A, también se utilizaron plantas no transgénicas como control. En cada una de las plantas se agroinfiltró completamente una hoja con suspensiones de AtC58/pBI-PPV-GFP (OD₆₀₀=0.5). La acumulación viral se analizó mediante ELISA-DASI a diferentes tiempos post-agroinfiltración, tanto en las hojas agroinfiltradas/agroinoculadas, como en hojas jóvenes no agroinoculadas.

El análisis de la acumulación viral en las hojas agroinfiltradas mostró que a los 2 dpi se podía detectar el virus en todas las plantas. Y que a los 3 dpi había una menor acumulación viral en las plantas transgénicas de la línea A con respecto a la de las plantas control y el resto de plantas transgénicas (Figura 28A). La acumulación viral en hojas apicales debida a la infección sistémica se detectó a los 4 dpi (Figura 28B), pero en cambio

no se observaron diferencias en los niveles de acumulación del virus entre las plantas control y ninguna de las líneas transgénicas. Probablemente la OD_{600} de la suspensión de *A tumefaciens* que se utilizó en este experimento ($OD_{600}=0.5$) resultó ser una dosis de inóculo demasiado elevada para los niveles a los que se acumula el fragmento scFv2A. Sin embargo, en las plantas de la línea transgénica A (citoplásmica) se observa que, al menos inicialmente, el nivel de anticuerpo es suficiente para frenar la acumulación del virus en las hojas agroinfiltradas. En cualquier caso este debe ser un efecto parcial y en el momento que aumenta la acumulación del virus en las hojas agroinfiltradas éste inicia también la infección sistémica que afecta por igual a todas las plantas independientemente de la expresión o no de fragmentos scFv.

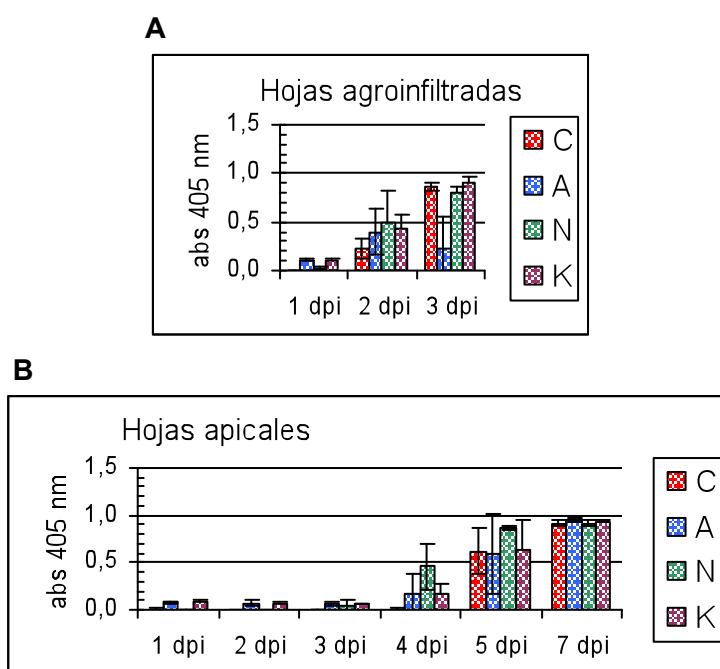


Figura 28

Panel A: Análisis ELISA-DASI para evaluar la acumulación viral en hojas de *N. benthamiana* no transgénica (C) y transgénicas que expresan los fragmentos scFv2A (A), NLSscFv2A (N) y 6KscFv2A (K) agroinfiltradas con PPV-GFP ($OD_{600}=0.5$), a diferentes tiempos postinoculación. Panel B: Análisis ELISA-DASI de la acumulación viral de hojas apicales, no inoculadas, de las mismas plantas. Las columnas y barras representan la media y desviación estándar de valores ELISA de tres plantas agroinfiltradas independientemente.

Se realizó un segundo experimento idéntico al anterior pero utilizando suspensiones de *AtC58/pBI-PPV-GFP* a una concentración menor que la anterior ($OD_{600}=0.08$) y se evaluó la acumulación viral en las hojas agroinfiltradas a los 3 dpi. Los valores de abs 405 nm obtenidos en el análisis ELISA-DASI de las hojas agroinfiltradas (Figura 29) revelaron que en las plantas de todas las líneas transgénicas existió menor acumulación viral en comparación con las plantas control (no transgénicas).

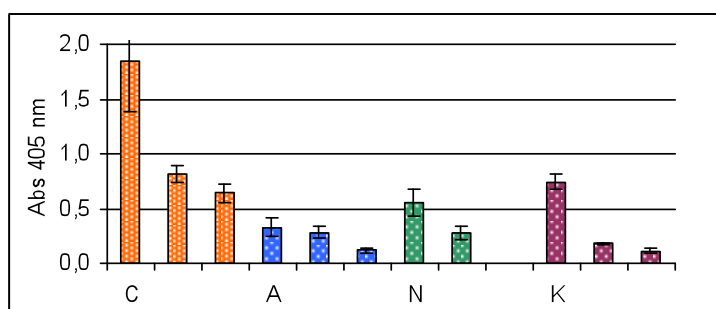


Figura 29

Análisis ELISA-DASI para evaluar la acumulación viral en hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con PPV-GFP ($OD_{600}=0.08$). Se agroinfiltraron hojas en plantas no transgénicas (C) y transgénicas R₁ de las líneas A3 (A), N11 (N) y K1 (K) que expresan, respectivamente, los fragmentos scFv2A, NLSscFv2A y 6KscFv2A. Las columnas y las barras representan el valor ELISA medio (abs 405 nm) y el error estándar para cada hoja analizada por triplicado.

A pesar de que todas las plantas desarrollaron infección sistémica, cuando se observaron con la lupa bajo luz UV, se advirtió que en las plantas transgénicas había menor número de hojas con fluorescencia y que la distribución de la misma era diferente con respecto a las plantas control. Sin embargo, estas observaciones no se vieron reflejadas en los valores de acumulación viral obtenidos en el análisis DASI-ELISA (resultados no mostrados).

La eficacia de la transformación (número de células transformadas que expresan GFP) mediada por *Agrobacterium* se ve influenciada por la concentración (OD_{600}) de células de la suspensión utilizada para agroinfiltrar las hojas y por tanto, en los niveles de expresión que se obtendrán. Se ha establecido que los valores óptimos de OD_{600} de la suspensión de *Agrobacterium* oscilan entre 0.1-1.0 (Amoah *et al.*, 2001;

Song y Sink, 2005; Wroblewski *et al.*, 2005; Wydro *et al.*, 2006). En el caso de la agroinfiltración de un clon viral, una vez que se establece un replicón activo, éste se replicará autónomamente y moverá de las células transformadas a células vecinas de forma que la infección puede progresar. Por ello, incluso con una eficacia de transformación baja sería suficiente para conseguir infectar toda la planta (Marillonnet *et al.*, 2005; Orzáez *et al.*, 2006). Cuando la agroinfiltración se emplea para evaluar el efecto de algún factor, por ejemplo un supresor del silenciamiento, sobre el nivel de expresión de un gen (Libho *et al.*, 2007), o como en este caso la influencia de la expresión de fragmentos scFv sobre la infección viral, es necesario trabajar por debajo de las condiciones óptimas.

Para determinar cómo influye la OD₆₀₀ de la suspensión de *AtC58/pBI-PPV-GFP* en la densidad de foci por superficie y determinar las condiciones en las que se podrían observar el efecto de interferencia del fragmento scFv2A, se realizó un nuevo experimento. En plantas de *N. benthamiana* no transgénicas se inocularon hojas en el mismo estadio de desarrollo. La inoculación se realizó por agroinfiltración con suspensiones de *AtC58/pBIscFvcontrol* (OD₆₀₀=1) o *AtC58/pBI-scFv2A* (OD₆₀₀=1) mezcladas con *AtC58/pBI-PPV-GFP*. Se realizaron diferentes mezclas con diluciones decimales decrecientes del clon viral PPV-GFP de forma que su OD₆₀₀ final correspondiera a 0.1, 0.01 y 0.001. Tras la agroinfiltración las hojas se observaron bajo la lupa de fluorescencia y se tomaron fotografías a diferentes tiempos post-agroinfiltración (dpi).

En las hojas agroinfiltradas con las suspensiones en las que había mayor concentración de PPV-GFP (OD₆₀₀=0.1) se observó fluorescencia a los 2 dpi. A los 3 dpi aparecía fluorescencia en la superficie de todas las hojas agroinfiltradas, aunque sólo se distinguieron foci independientes en las hojas agroinfiltradas con *AtC58/pBI-PPV-GFP* a OD₆₀₀=0.01 y 0.001. En este caso, además, se observó menor densidad de foci en las hojas agroinfiltradas con el fragmento scFv2A que en las agroinfiltradas con el scFvcontrol. Por tanto, se pudo determinar que el efecto de interferencia del fragmento scFv2A sobre la infección de PPV se observó con dilución de PPV-GFP OD₆₀₀=0.01 a partir de los 3 dpi. Sin embargo, a los 4 dpi solamente se mantuvo ese efecto en las hojas agroinfiltradas con la menor densidad de PPV-GFP (OD₆₀₀=0.001) (Figura 30).

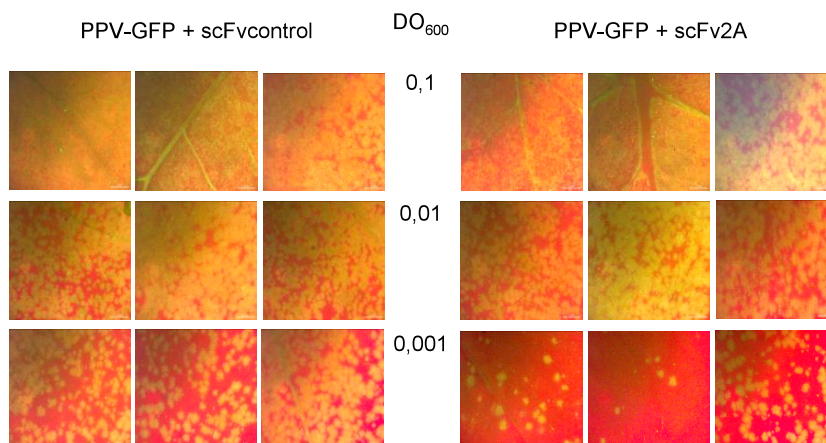


Figura 30

Acumulación de fluorescencia de la GFP en hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con una suspensión de AtC58/pBIscFvcontrol (izquierda) o AtC58/pBI-scFv2A (derecha) mezclados con AtC58/pBI-PPV-GFP. La de OD₆₀₀ final de los fragmentos scFv corresponde a 1 y la del clon PPV-GFP a 0.1 (primera fila), 0.01 (segunda fila) y 0.001 (tercera fila). La fotos fueron tomadas a los 4 dpi.

En un trabajo reciente, con el objetivo de evaluar el efecto de un fragmento scFv sobre la infección de PLRV, se coagroinfiltraron hojas de plantas de *N. tabacum* con dos cultivos de *Agrobacterium* recombinantes, uno de ellos portador de un vector binario con la secuencia de un scFv específico de la proteína P1 de PLRV y el otro de un vector con el cDNA del virus (Nickel *et al.*, 2008). En este caso fue suficiente agroinfiltrar el cultivo de *A. tumefaciens* que lleva el clon viral en una relación 10:1 respecto del que lleva el fragmento scFv, para observar una reducción de la acumulación de la CP viral del 95%. Estos resultados concordarían con los resultados presentados anteriormente, en los que la coagroinoculación del clon viral PPV-GFP en una relación de 10:1 y 100:1 con respecto del fragmentos scFv2A son las adecuadas para apreciar el efecto del anticuerpo sobre la infección de PPV, siempre y cuando las observaciones se realicen entre los 3 y 4 dpi.

3.3. Efecto de la expresión transitoria de fragmentos scFv2A, NLSscFv2A o 6K2scFv2A en la evolución de la infección por PPV-GFP

En un nuevo experimento se agroinfiltraron plantas no transgénicas de *N. benthamiana* con suspensiones de AtC58/pBI-scFvcontrol o AtC58/pBI-scFv2A, AtC58/pBI-NLSscFv2A, AtC58/pBI-6K2scFv2A. A las 24 horas se inocularon las hojas agroinfiltradas anteriormente mediante una nueva agroinfiltración con un cultivo de AtC58/pBI-PPV-GFP ($OD_{600}=0.01$). En cada planta se agroinfiltró una hoja con AtC58/pBI-PPV-GFP que se arrancó de las plantas a los 3 dpi y se tomaron fotos bajo una lupa con luz UV. Posteriormente, se analizó la acumulación de la CP viral mediante ELISA-DASI en extractos de esas mismas hojas (Figura 31).

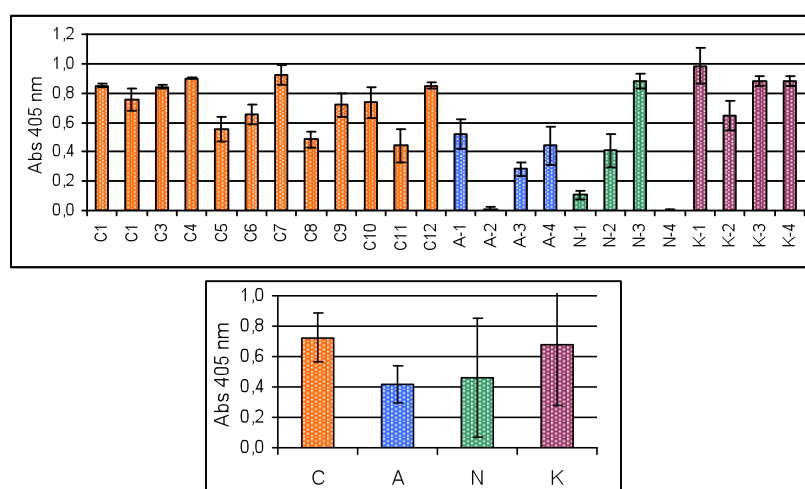


Figura 31

En el gráfico superior análisis ELISA-DASI con el mAb 5B de hojas de *N. benthamiana* no transgénicas agroinfiltradas con AtC58/pBI-PPV-GFP (OD_{600} final=0.01) mezclado con cultivos de *Agrobacterium* con diferentes fragmentos scFv (OD_{600} final=1): AtC58/pBI-scFvcontrol (naranja), o AtC58/pBI-scFv2A (azul) o AtC58/pBI-NLSscFv2A (verde) o AtC58/pBI-6KscFv2A (morado). Las columnas y barras representan la media y la desviación estándar, de tres réplicas del análisis ELISA, para cada una de las plantas analizadas (gráfico superior) y para cada uno de los tratamientos (gráfico inferior).

Los valores de acumulación viral para cada una de las hojas agroinfiltradas/agroinoculadas independientemente (Figura 31) muestran

que las que fueron agroinfiltradas con el fragmento scFv2A previamente a la agroinoculación con el virus, acumularon menor cantidad de virus que las hojas agroinfiltradas con el fragmento scFv-control. Igualmente ocurrió en algunas hojas agroinfiltradas con el fragmento NLSscFv2A, aunque en otras el virus se acumuló a niveles similares a de las hojas control agroinfiltradas con el fragmento scFvcontrol. En cambio, en las hojas agroinfiltradas con el fragmento 6K2scFv2A no se pudo apreciar el efecto del anticuerpo, ya que en todas ellas se acumuló igual cantidad de virus que las hojas control (Figura 31).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los ensayos de desafío descritos en el capítulo 2, en los que se constató que las líneas A junto con las líneas N, eran las que presentaban mayor nivel de protección en los ensayos en los que la inoculación viral se realizaba pinchado con un cultivo de *AtC58/pBI-PPV-GFP*. En estos experimentos también las líneas K no presentaron protección frente a la infección por PPV-GFP.

Con el fin de obtener más información sobre la frecuencia y la distribución de los eventos de infección que tienen lugar en las hojas agroinfiltradas con el clon PPV-GFP, se tomaron fotografías de diversos campos visuales o áreas de su superficie bajo luz UV. A partir de dichas fotografías se cuantificó el número de foci, así como su tamaño, en cada una de las áreas fotografiadas.

En las hojas agroinfiltradas con scFv2A previamente a la agroinoculación con el virus, se observó que el valor medio de número de foci (Figura 32A) y área total fluorescente por área fotografiada (Figura 32B) fueron mucho menores comparados con los de las hojas agroinfiltradas con el scFvcontrol. Estos resultados indicarían que el fragmento scFv2A produjo un efecto específico de interferencia con el inicio o el establecimiento de la infección producida por PPV-GFP, puesto que cuando este fragmento recombinante se expresó de forma transitoria el número de focos de infección y la extensión de la misma fue menor que cuando se expresaba un fragmento recombinante control no específico de PPV. Las diferencias en el tamaño promedio de los foci fueron menos acusadas (Figura 32C), lo que indicaría que llegados a un umbral de virus determinado, el nivel de acumulación del fragmento scFv2A sería insuficiente para detener la infección. Igualmente en las hojas agroinfiltradas con el fragmento NLSscFv2A hubo una ligera disminución

del número de foci (Figura 32A) y el área total fluorescente (Figura 32B) con respecto a las hojas agroinfiltradas con el scFvcontrol, si bien el tamaño promedio de los foci fue igual al de las hojas agroinfiltradas con el scFvcontrol. Por tanto, este fragmento estaría interfiriendo también con el establecimiento de la infección, aunque sería menos eficiente en controlar su extensión una vez iniciada.

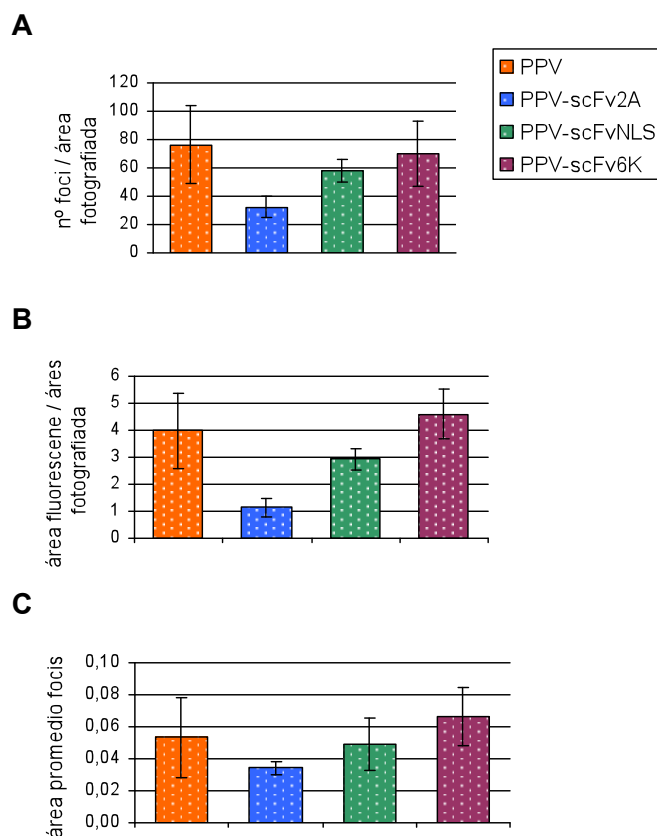


Figura 32

Resultados de la cuantificación del número de foci fluorescentes (panel A) y el área fluorescente total (panel B) y el tamaño promedio de los foci (panel C), en hojas de *N. benthamiana* no transgénicas tras ser agroinfiltradas con AtC58/pBI-PPV-GFP (OD_{600} final=0.01) mezclado con cultivos de *Agrobacterium* con diferentes fragmentos scFv (OD_{600} final=1): AtC58/pBI-scFvcontrol (naranja), o AtC58/pBI-scFv2A (azul) o AtC58/pBI-NLSscFv2A (verde) o AtC58/pBI-6KscFv2A (morado). El conteo se realizó a los 3 dpi. Las columnas y barras representan la media y desviación estándar de 12 plantas agroinfiltradas con PPV-GFP, 4 plantas con PPV-GFP-scFv2A, 4 con PPV-GFP-NLSscFv2A y 4 con PPV-GFP-6KscFv2A). En cada planta se agroinfiltró/inoculó una hoja y de cada una de las hojas se fotografiaron tres áreas del mismo tamaño tomadas al azar.

De nuevo, la expresión del fragmento 6K2scFv2A no tuvo efecto sobre la infección viral o al menos no se evidenció con este tipo de ensayo. De hecho los valores del área total fluorescente en las hojas agroinfiltradas con el fragmento scFv2A resultaron ser menores y significativamente diferentes que los de las hojas agroinfiltradas con el fragmento 6K2scFv2A.

El efecto de la expresión transitoria del fragmento scFv2A sobre la infección producida por el clon PPV-GFP fue confirmada en un nuevo experimento. En dicho experimento se agroinfiltraron/agroinocularon 10 plantas de *Nicotiana benthamiana*, la mitad con una suspensión de *AtC58/pBI-PPV-GFP* (OD_{600} final=0.01) mezclado con *AtC58/pBI-scFvcontrol* (OD_{600} final=1) y la otra mitad con la mezcla de *AtC58/pBI-PPV-GFP* (OD_{600} final=0.01) y *AtC58/pBI-scFv2A* (OD_{600} final=1). Los resultados ELISA-DASI mostraron que a los 3 dpi todas las hojas agroinfiltradas con PPV+scFv2A acumularon menor cantidad de virus que las hojas agroinfiltradas con PPV-GFP (Figura 33). En efecto, incluso cuando la agroinfiltración se realizó al mismo tiempo, la expresión transitoria del fragmento scFv2A específico de la NIb de PPV fue capaz de interferir con la infección viral, haciendo que se acumulase menor cantidad de virus en las hojas agroinoculadas, al menos los primeros días post-inoculación.

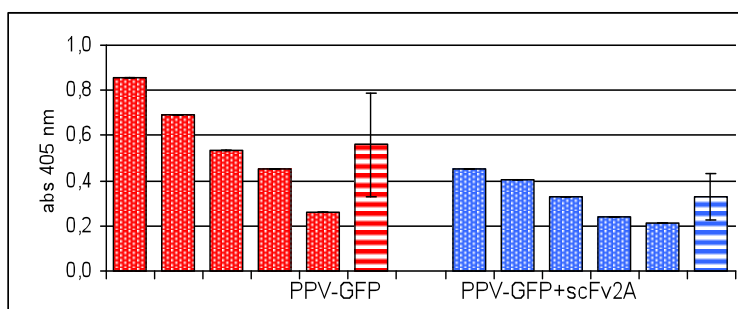


Figura 33

Análisis ELISA-DASI con el Mab 5B de hojas de *N. benthamiana* no transgénica agroinfiltradas con PPV-GFP o PPV-GFP mezclado con scFv2A (PPV-GFP + scFv2A) tras 3 dpi. Las columnas punteadas representan valores individuales de cada una de las plantas, y las columnas con rayas horizontales representan la media y error estándar de los valores de 5 plantas agroinfiltradas.

3.4. Efecto de la expresión conjunta de diferentes fragmentos scFv en la evolución de la infección por PPV-GFP

Se ha demostrado que genes que codifican diferentes proteínas pueden ser expresados de forma transitoria mediante agroinfiltración con mezclas de cultivos de *Agrobacterium* en la misma célula. Por ejemplo, la producción de un anticuerpo completo en hojas de *Nicotiana tabacum* (Vaquero *et al.*, 1999). Los genes de la cadena pesada y ligera de una Ig son transferidos a las células de tabaco mediante agroinfiltración por vacío con dos cultivos independientes de *A. tumefaciens*, debido a la gran multitud de eventos de transformación que tienen lugar es posible que haya gran número de células que incorporen los dos genes y de esta forma se plieguen y ensamblen moléculas de Ab funcionales en el RE de éstas células.

Para estudiar si la expresión simultánea de las diferentes construcciones del fragmento scFv2A interfería de forma más eficiente con la infección de PPV se realizaron nuevos experimentos en los que se agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* con diferentes mezclas de cultivos de *Agrobacterium*. En primer lugar el cultivo AtC58/pBI-PPV-GFP (OD₆₀₀ final=0.01) mezclado con el cultivo AtC58/pBI-scFvcontrol (OD₆₀₀ final=1) a dicha mezcla se la denominará PPV-GFP. En segundo lugar el cultivo AtC58/pBI-PPV-GFP (OD₆₀₀ final=0.01) mezclado los cultivos AtC58/pBI-scFv2A (OD₆₀₀ final=0.33), AtC58/pBI-NLSscFv2A (OD₆₀₀ final=0.33) y AtC58/pBI-6K2scFv2A (OD₆₀₀ final=0.33), a esta mezcla se la denominará PPV-GFP+3scFvs.

En un primer experimento se utilizaron plantas de *N. benthamiana* control (no transgénicas) o transgénicas de la progenie R₂ de la línea A3, que expresan el fragmento scFv2A de forma constitutiva y se agroinfiltró una hoja por planta. Las plantas no transgénicas se agroinfiltraron la mitad con PPV-GFP y en la otra mitad con PPV-GFP+3scFvs. Las plantas transgénicas se agroinfiltraron con PPV-GFP+3scFvs. A los tres días se arrancaron las hojas agroinfiltradas y se evaluó la acumulación viral. En las hojas de la mayoría de las plantas transgénicas A agroinfiltradas con PPV-GFP+3scFvs se acumuló menor cantidad de virus que en las hojas de plantas no transgénicas tanto las agroinfiltradas con PPV-GFP como con PPV-GFP+3scFvs (Figura 34). Por el contrario, en las plantas no transgénicas se observaron diferencias en la acumulación viral entre hojas

agroinfiltradas con PPV-GFP+3scFvs con respecto a las agroinfiltradas solamente con PPV-GFP.

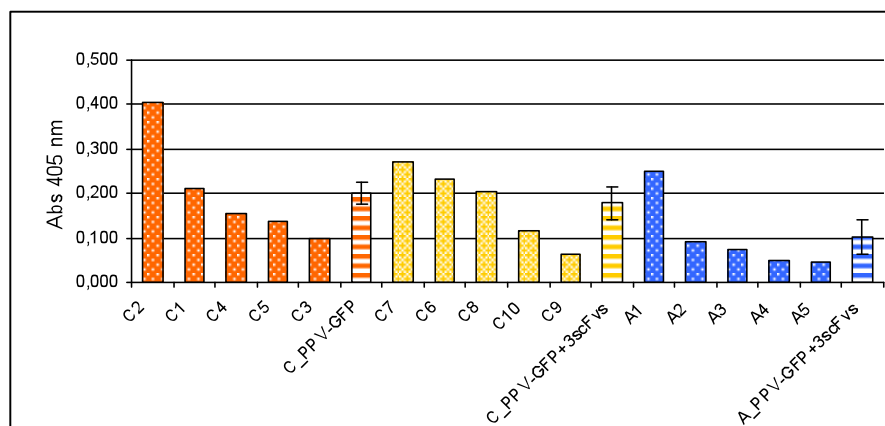


Figura 34

Análisis ELISA-DASI de la acumulación viral a los 3 dpi en hojas de *N. benthamiana* no transgénica (C) y transgénicas de la línea A (A), agroinfiltradas con suspensiones de AtC58/pBI-PPV-GFP (OD₆₀₀ final=0.01) mezclado con AtC58/pBI-scFvcontrol (OD₆₀₀ final=1) (PPV-GFP) o con AtC58/pBI-scFv2A, AtC58/pBI-NLSScFv2A y AtC58/pBI-6K2scFv2A (OD₆₀₀ final=0.33 cada uno) (PPV-GFP + 3scFv). Las columnas punteadas representan valores individuales de cada una de las plantas, las columnas con rayas horizontales y las barras representan, respectivamente, la media y el error estándar de 5 hojas agroinfiltradas en plantas diferentes para cada tratamiento.

Quando se agroinfiltraron con la mezcla de los tres fragmentos scFv plantas que ya expresaban constitutivamente el fragmento scFv2A, existiría una doble ventaja, ya que el anticuerpo está ya presente antes de que el virus inicie su replicación, y la co-agroinfiltración del virus con nuevas copias de fragmentos scFv aumentaría el nivel de anticuerpo disponible para interferir con la infección. De esta manera se retrasa la replicación viral y/o se mantendría un título viral bajo. Este efecto, junto con la expresión del fragmento scFv2A en toda la planta, ayuda a que la infección sistémica también se vea retrasada (Figura 35).

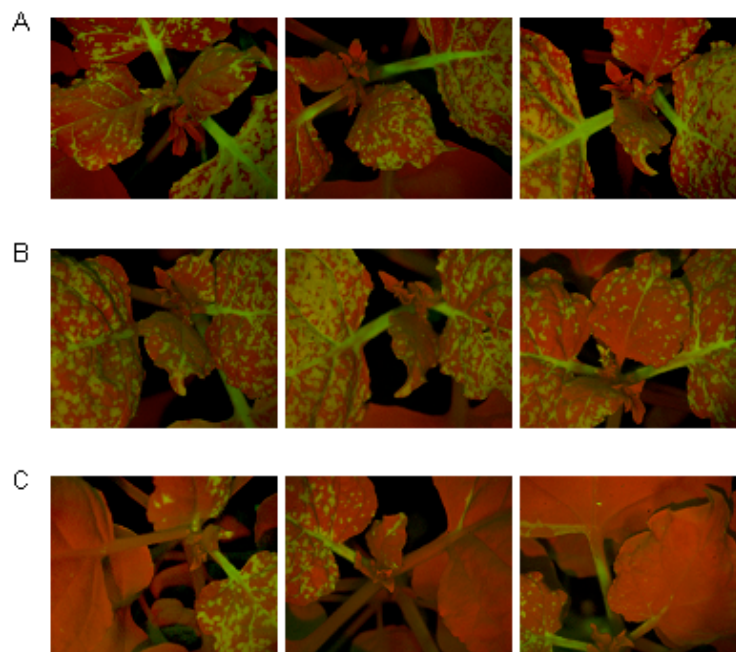


Figura 35

Acumulación sistémica de GFP (15 dpi) en plantas de *N. benthamiana*. Paneles A: plantas no transgénicas agroinfiltradas con suspensiones de AtC58/pBI-PPV-GFP mezclado con AtC58/pBI-scFvcontrol. Paneles B: plantas no transgénicas agroinfiltradas con suspensiones de AtC58/pBI-PPV-GFP mezclado AtC58/pBI-scFv2A, AtC58/pBI-NLSscFv2A y AtC58/pBI-6K2scFv2A. Paneles C: planta transgénica R₁ línea A3 agroinfiltrada con suspensiones de AtC58/pBI-PPV-GFP mezclado AtC58/pBI-scFv2A, AtC58/pBI-NLSscFv2A y AtC58/pBI-6K2scFv2A

Las hojas apicales y las inmediatamente inferiores de las plantas no transgénicas (Figura 35A y B) presentan zonas fluorescentes en toda su superficie, además los pecíolos y el nervio central de la 3^a y 4^a hoja mostraron una intensa fluorescencia. Sin embargo, en las plantas transgénicas A (Figura 35C) la fluorescencia apareció en las hojas más jóvenes mientras que en las hojas 3^a y 4^a casi no se observó fluorescencia en el haz ni en el nervio central o en el pecíolo.

Además de observar la aparición de la fluorescencia, se valoró la acumulación viral mediante un análisis ELISA-DASI en las hojas jóvenes no agroinfiltradas a los 15 dpi. De nuevo, los valores ELISA obtenidos no mostraron que hubiera diferencias de acumulación de virus entre plantas

transgénicas y no transgénicas, a pesar de las diferencias observadas en la distribución de la fluorescencia. Para el análisis ELISA-DASI se tomaron las dos apicales más jóvenes, tal y como se ha efectuado en la mayoría de ensayos, incluidos los ensayos de desafío del capítulo 2, y que son las que normalmente presentan síntomas más evidentes de infección. También se observa en la Figura 35 como además fueron las hojas donde más fluorescencia hubo, y por ello seguramente no se vieron diferencias de acumulación viral. Ello pone de manifiesto cómo el poder visualizar mediante la fluorescencia de la GFP la incidencia de la infección, permite diferenciar comportamientos que pasarían desapercibidos con los ensayos ELISA-DASI.

En el caso de las plantas no transgénicas la situación es diferente, la expresión de los scFvs y la del virus se debe producir a la vez, y es posible que la replicación viral sea más rápida que el incremento del nivel de scFvs y por tanto, no se alcance un nivel suficiente de anticuerpos a tiempo de que sean capaces de frenar la dispersión del virus de forma apreciable, ni en las hojas agroinfiltradas, ni por supuesto una vez que se establece la infección sistémica. Por otro lado, en la agroinfiltración conjunta cada uno de los cultivos de *A. tumefaciens* representa la tercera parte del total de *Agrobacterium* infiltrado, ya que la OD_{600} de la suspensión de agroinfiltración en ningún caso puede ser superior a 1.5. Posiblemente esto hace que el nivel de acumulación de cada uno de los fragmentos sea menor que cuando se agroinfiltran por separado y posiblemente sea la causa de que no observemos un efecto sobre la infección ni siquiera a nivel de hojas agroinfiltradas, que sí se observó con los fragmentos scFv2A y NLSscFv2A, cuando la agroinfiltración se realizó individualmente.

Se realizó un nuevo experimento utilizando plantas transgénicas de la progenie R3 de las líneas A3 y N11. De nuevo se agroinfiltraron hojas con las mezclas PPV-GFP o PPV-GFP+3scFvs a las mismas condiciones descritas en el experimento anterior. A los 3 dpi se arrancaron las hojas, se fotografiaron y, seguidamente, se evaluó en ellas la acumulación viral. En las plantas transgénicas de la línea A3 hubo menor acumulación viral comparada con de las plantas control y transgénicas de la línea N11 (Figura 36). Estas últimas no se diferenciaron entre ellas, tampoco se observaron diferencias entre las plantas agroinfiltradas con las mezclas PPV-GFP o PPV-GFP+3scFvs.

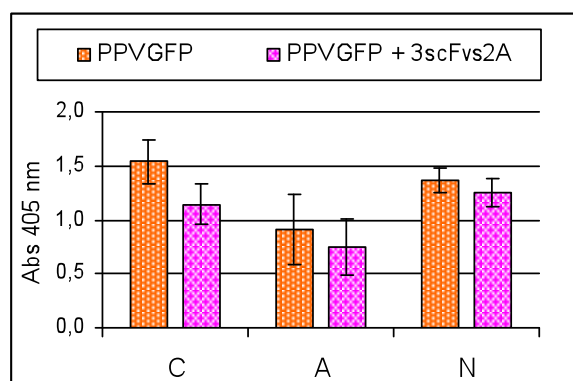


Figura 36

Análisis ELISA-DASI de la acumulación viral en hojas de *N. benthamiana* no transgénica (C) y transgénicas R3 de las líneas A3.2 (A) y N11.5 (N) agroinfiltradas con suspensiones de AtC58/pBI-PPV-GFP mezclado con AtC58/pBI-scFvcontrol (PPV-GFP) o con la mezcla de AtC58/pBI-scFv2A, AtC58/pBI-NLSscFv2A y AtC58/pBI-6K2scFv2A (PPV-GFP+3scFvs). Las barras representan la desviación y el error estándar de los valores de 3 hojas de plantas diferentes y agroinfiltradas independientemente.

De nuevo, en las plantas transgénicas de la línea A3 se observó una disminución a la mitad del área promedio de los foci y del área total fluorescente, y al igual que ocurrió con la acumulación viral esta disminución se produjo independientemente de los cultivos con los que se habían agroinfiltrado las hojas (Figura 37B y C). Los valores de área total fluorescente de las hojas de las plantas transgénicas A3.2 agroinfiltradas con PPV-GFP+3scFvs resultaron ser significativamente diferentes de los de las plantas control con el mismo tratamiento. No fue así para el resto de tratamientos. Con respecto a número de foci el comportamiento fue diferente, este fue menor en todas las hojas siempre que se agroinfiltradas con la mezcla PPV-GFP+3scFvs comparado con las hojas agroinfiltradas con PPV-GFP y esto ocurrió tanto en plantas transgénicas como en las no transgénicas (Figura 37A).

En cambio, no pareció que existiera un efecto de cooperación entre las diferentes versiones del fragmento scFv2A, ya que a coexpresión de los fragmentos scFv2A, NLSscFv2A y 6K2scFv2A no ha representado un

incremento de la eficacia en la interferencia con la infección de PPV, ni en plantas control ni en plantas transgénicas.

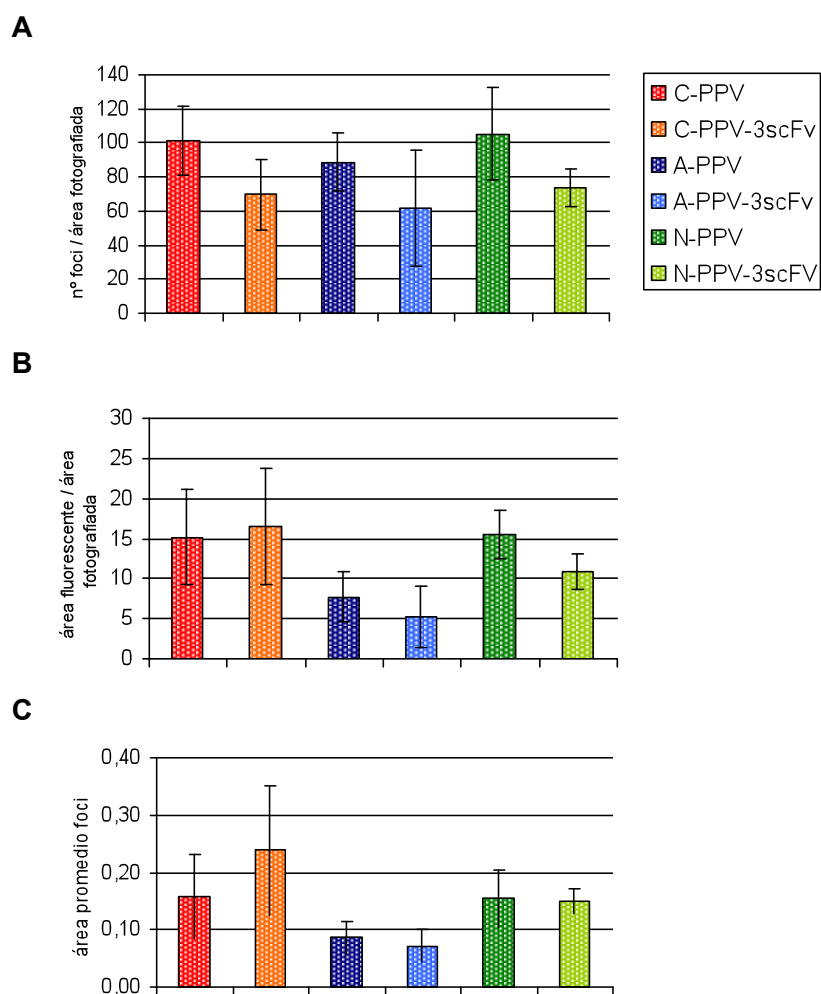


Figura 37

Número de foci fluorescentes (panel A) y del área fluorescente total (panel B) por área fotografiada, y por el tamaño promedio de los foci (panel C), en hojas de *N. benthamiana*. El conteo se realizó a los 3 dpi. C-PPV, A-PPV y N-PPV: plantas no transgénicas, transgénica de la línea A3.2 y transgénica de la línea N11.5, respectivamente agroinfiltradas con AtC58/pBI-PPV-GFP + AtC58/pBI-scFvcontrol. C-PPV+3scFv, A-PPV PPV+3scFv y N-PPV PPV+3scFv: plantas no transgénicas, transgénica de la línea A3.2 y transgénica de la línea N11.5, respectivamente agroinfiltradas con AtC58/pBI-PPV-GFP + AtC58/pBI-scFv2A, AtC58/pBI-NLSscFv2A y AtC58/pBI-6K2scFv2A

En cualquier caso, sería interesante comprobar si la coexpresión de fragmentos scFv con diferente especificidad ofrece mejores resultados. Mediante este sistema se podría evaluar la eficacia de fragmentos scFv con diferente especificidad, de forma rápida y sencilla, comparándola con la del fragmento scFv2A y valorar su futuro uso para transformación estable.

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

Durante los últimos 15 años se han hecho grandes progresos en la investigación sobre la biología de PPV (García y Cambra., 2007). Los conocimientos y herramientas generadas por dicha investigación han sido muy útiles para mejorar el manejo de la enfermedad de la sharka. No obstante, y a pesar de los esfuerzos y recursos que se destinan a su control, la sharka todavía se extiende a nuevas áreas. Este hecho pone de manifiesto que la utilización exclusivamente de medidas de contención y prevención no es una vía segura para luchar contra la enfermedad. En realidad, junto con las medidas de control, la vía más efectiva y duradera para luchar contra ella sería la utilización de variedades resistentes (Ravelonandro *et al.*, 2000).

En el caso de la enfermedad de la sharka, existen diversos programas de mejora genética en marcha con el objetivo, entre otros, de obtener nuevas variedades resistentes. Sin embargo, las técnicas convencionales de cruzamientos genéticos se han visto obstaculizadas por la escasez de fuentes naturales de resistencia, a la naturaleza poligénica de los caracteres de la resistencia en los casos en los que se ha estudiado o la incompatibilidad entre parentales (Marandel *et al.*, 2009; Kleger *et al.*, 1998), además estas técnicas resultan muy lentas. El avance en el desarrollo de marcadores moleculares seguramente acelerarán estos procesos, aunque no sea una tarea trivial tratándose de árboles frutales (Hurtado *et al.*, 2002; Vilanova *et al.*, 2003; Soriano *et al.*, 2008). Por todo ello, es de gran interés la exploración de nuevas aproximaciones biotecnológicas basadas en la transformación genética para generar plantas resistentes. Estos métodos tienen la ventaja de que si el transgen introducido tiene éxito, se pueden ser transferido a variedades de interés agronómico, sorteando así los problemas de incompatibilidad.

Una de las finalidades de los experimentos descritos en esta memoria ha sido evaluar la capacidad del fragmento recombinante scFv2A para inmunomodular o interferir con la infección de PPV y valorar su posible utilización para producir resistencia a la enfermedad de la sharka. Es importante tener en cuenta que el éxito de la inmunomodulación está estrechamente relacionado con el epítipo que se elige como diana, con la estabilidad y afinidad intrínsecas del anticuerpo recombinante que se utilice

y con el compartimento celular al que vaya dirigida su expresión, y que normalmente será aquel en el que su antígeno ejerce su función.

Atendiendo a los niveles de acumulación de los anticuerpos recombinantes se han obtenido diversos grados de efectividad contra infecciones virales en plantas. Por un lado, se ha demostrado con fragmentos scFv específicos de la CP de *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) que existe una correlación perfecta entre el nivel de acumulación de los fragmentos recombinantes y el grado de protección que producen (Nölke *et al.*, 2009). No obstante, no siempre mayor acumulación del anticuerpo se traduce en un mejor resultado como ya se ha discutido anteriormente (Zhang M.Y. *et al.*, 2008), puesto que la especificidad (Prins *et al.*, 2005) del anticuerpo juega también un papel importante.

Dependiendo de la proteína usada como diana del anticuerpo recombinante las estrategias de inmunomodulación también han tenido diferentes grados de efectividad. Cuando se han utilizado anticuerpos recombinantes específicos de la CP los resultados han variado obteniéndose desde resistencia muy limitada (Fecker *et al.*, 1997) a total inmunidad (Bajrovic *et al.*, 2001). Otras aproximaciones se han centrado en utilizar anticuerpos recombinantes específicos de proteínas no estructurales, como la implicadas en la replicación viral (Boonrod *et al.*, 2004; Nickel *et al.*, 2008) y proteasas responsables de la fragmentación de la poliproteína (Gargouri-Bouzid *et al.*, 2006). Estas estrategias generalmente han proporcionado mayor resistencia y de más amplio espectro (Boonrod *et al.*, 2004; Gargouri-Bouzid *et al.*, 2006), aunque no siempre ha sido así y en algunas únicamente han producido menor acumulación viral (Nickel *et al.*, 2008). Otras alternativas que han tenido éxito ha sido la utilización de scFvs contra proteínas virales multifuncionales como la nucleocápsida de TSWV, que está involucrada no sólo en la transcripción/replicación si no también en el movimiento célula a célula (Prins *et al.*, 2005).

En principio, la combinación de estos dos factores sería lo que determinaría en cada caso particular el mayor o menor éxito de la estrategia de inmunomodulación. Sin embargo el resultado final únicamente lo podemos conocer mediante la expresión en plantas del anticuerpo y su posterior evaluación frente al virus.

En este trabajo se ha utilizado el fragmento scFv2A específico de la N1b de PPV, que presumiblemente es la proteína que lleva a cabo la replicación viral, aunque en este proceso intervienen muchos otros factores tanto del virus como de la planta. La expresión del anticuerpo fue dirigida al núcleo, citoplasma y membrana del RE que son los compartimentos celulares en los que se acumula dicha proteína durante el proceso de infección.

Los niveles de acumulación del fragmento scFv2A en las plantas transgénicas fueron bajos. Sin embargo, mediante diversos ensayos de protección, se ha mostrado que dicho fragmento es capaz de bloquear la infección de PPV. Tras la inoculación con el virus, muchas de las plantas transgénicas que expresaban las diferentes versiones del anticuerpo recombinante no presentaron síntomas, ni acumulación viral, mientras que las plantas no transgénicas o las que expresaban un fragmento scFv específico de otro virus se infectaban en su mayoría.

Desafortunadamente, no encontramos ninguna línea transgénica en la que todas las plantas inoculadas resultaran resistentes, ya que incluso en las líneas en las que la mayoría de plantas se muestran resistentes, hay algunas plantas que se infectan y acumulan virus a niveles similares a las plantas control. Estas diferencias individuales entre plantas de la misma línea transgénica se deben probablemente a que el combate entre el anticuerpo y el virus está muy igualado y muy ligeras variaciones en el nivel de anticuerpo y/o de virus son suficientes para decantar la balanza en uno u otro sentido. Seguramente hay múltiples factores del estado fisiológico de cada planta individual que deben estar influyendo en el nivel final de expresión y acumulación del anticuerpo. Pero también hay que tener en cuenta que los métodos experimentales de inoculación utilizados, especialmente la inoculación mecánica, producen una gran variabilidad por lo que es probable que cada planta esté recibiendo una dosis efectiva de inóculo diferente. Además estos métodos experimentales de inoculación resultan muy agresivos y favorables al virus, ya que han de ser suficientemente seguros para que se produzca infección en una mayoría importante de las plantas control.

Sería posible pensar que en condiciones naturales de campo, donde la infección de PPV se inicia con la picadura de pulgones virulíferos, que representa una presión de inóculo viral menor estimada entre 10-2,000

copias de RNA viral (Olmos *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2009), los resultados de resistencia mejorasen. Estudios futuros deberían considerar la posibilidad de realizar experimentos de protección frente a inoculación de PPV por pulgones con las líneas transgénicas que expresan los diferentes fragmentos scFv2A. Los resultados de este tipo de experimentos serían de gran utilidad para valorar el potencial real de una futura aplicación de esta tecnología en huéspedes naturales del virus y finalmente en condiciones naturales de campo. Actualmente la información sobre este tipo de experimentos con plantas que expresan anticuerpos es muy escasa. Únicamente se ha publicado un trabajo en el que se realizan ensayos de desafío con pulgones en plantas de patata que expresan un scFv específico de la P1 de PLRV (Nickel *et al.*, 2008).

Los resultados en conjunto indicarían que el fragmento scFv2A expresado en el citoplasma sería la forma más eficaz de interferir con la infección por PPV. Un mayor número de líneas A citoplásmicas presentaron porcentajes de infección significativamente menores que las líneas control, además este fenómeno se observó independientemente del método de inoculación utilizado. No obstante, dichos resultados también indicaron que los bajos niveles de acumulación del fragmento scFv2A sería uno de los factores limitantes de la protección inducida por su expresión en planta. Por tanto mejorar la estabilidad, y con ello la capacidad de acumulación en el citoplasma de las células vegetales, seguramente redundaría en una más eficaz protección frente a la infección viral.

Los resultados de este trabajo han demostrado la validez del fragmento scFv2A para interferir con la infección del virus de la sharka. Sin embargo, estudios futuros para mejorar la eficacia de esta estrategia deberían profundizar en dos aspectos fundamentales.

En primer lugar, estudiar la posibilidad de mejorar la estabilidad del anticuerpo recombinante scFv2A. Dada la gran información sobre secuencias y comportamiento estructural de otros fragmentos scFv de que se dispone en la actualidad, se podrían comparar la del scFv2A con la de fragmentos con mayor estabilidad (Bond *et al.*, 2005) para establecer residuos candidatos a ser modificados, o también mediante la utilización de modelos computacionales (Arcangeli *et al.*, 2008). Posteriormente, mediante mutaciones en dichos residuos y posterior selección se podría obtener versiones mejoradas del fragmento scFv2A. En segundo lugar,

otra característica que se ha señalado que tiene correlación con la capacidad de protección de los fragmentos scFv, y que podría ser objeto de mejora, es la afinidad por el antígeno (Maynard *et al.*, 2002).

Por otro lado, existe también la posibilidad de obtener fragmentos scFv específicos de diferentes epítomos de las replicasas, por ejemplo de secuencias muy conservadas en la mayoría de replicasas virales como la secuencia GDD (Kamer y Argos, 1984; Koonin, 1991) que además resulta imprescindible para la replicación viral (Longstaff *et al.*, 1993; Lohmann *et al.*, 1997). En este sentido Formitcheva *et al.* (2005) obtuvieron un fragmento scFv que reacciona con al menos cuatro virus diferentes, entre ellos PPV y que podría estar reconociendo dicha secuencia. Estos fragmentos resultan una prometedora herramienta que podría generar resistencia de amplio espectro a virus en plantas, aunque por el momento no han sido expresados en plantas por lo que no se conoce su capacidad de acumulación en células vegetales, ni tampoco se ha probado su eficacia frente a la infección viral.

Hasta la fecha las estrategias basadas en transformación genética que más se han explotado para la obtención de plantas resistentes frente a virus son las derivadas del concepto de PDR (Sanford y Johnston, 1985), en las que se utilizan secuencias del patógeno para generar la resistencia; de hecho, han sido muy eficaces en la lucha contra múltiples infecciones virales en experimentos de invernadero pero también en condiciones naturales de campo (Prins *et al.*, 2009), incluida la causada por el virus de la sharka (Hily *et al.*, 2004; Malinowski *et al.*, 2006). Generalmente esta resistencia está mediada por RNA y se produce por la activación del mecanismo de PTGS, que se considera un sistema de defensa de la planta frente a virus (Fusaro *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2007).

Distintos datos experimentales demuestran que este tipo de resistencia mediada por RNA requiere una alta similitud de secuencia con el transgen para que sea operativa. Éste es uno de sus principales inconvenientes puesto que limita su aplicación a una estrecha gama de aislados. En este sentido las estrategias basadas en la inmunomodulación dirigidas contra dominios funcionales de proteínas altamente conservados entre diferentes grupos virales podrían ofrecer una protección más generalizada (Boonrod *et al.*, 2004; Formitcheva *et al.*, 2005; Gargouri-Bouziz *et al.*, 2006).

Por otra parte, el genoma de numerosos virus codifica proteínas que tienen un papel fundamental en la supresión de la actividad antiviral producida por el silenciamiento y que se denominan supresores de silenciamiento. Se ha demostrado en algunas ocasiones que la infección de plantas transgénicas que presentan resistencia inducida por mecanismos de silenciamiento a un virus, con un nuevo virus puede llevar a la acumulación de RNA viral y a la pérdida de la resistencia (Mitter *et al.*, 2001, 2003; Savenkov y Valkonen, 2001; Hassani-Mehraban *et al.*, 2009). La posibilidad de la interrupción del mecanismo de PTGS y por tanto de la resistencia, aunque sea de forma local o transitoria, es otra de las limitaciones que ponen en duda la utilización de este tipo de estrategias.

Finalmente hay que tener en cuenta que al contrario de los cultivos herbáceos, los árboles frutales se propagan vegetativamente y permanecen muchos años en el campo. Por lo tanto, la durabilidad de cualquier tipo de resistencia basada en una única estrategia es cuando menos cuestionable. Por todo ello, la posibilidad de combinar los diferentes modos de generar resistencia en un mismo individuo, como la inmunomodulación junto con estrategias basadas en silenciamiento, sería una forma más segura de conferir una resistencia que resultara eficaz a largo plazo.

En estos últimos años grandes avances en la tecnología de los anticuerpos recombinantes han facilitado información y numerosas herramientas para la obtención de fragmentos scFv con mayor estabilidad en ambientes no naturales para ellos como el citoplasma (Villani *et al.*, 2008; Philibert *et al.*, 2007), que es el compartimento celular que se ha demostrado más útil para interferir con las infecciones virales. Además, la cada vez más abundante información sobre secuencias, estructura y función de diversas secuencia de proteínas virales, por ejemplo la aportada por estudios sobre los requerimientos estructurales y funcionales del inicio de la replicación en diferentes virus de RNA (van Dijk *et al.*, 2004), aportan nuevas dianas susceptibles de ser utilizadas en estrategias de inmunomodulación. La explotación de toda esta información requiere un sistema *in vivo* rápido y sencillo para evaluar la eficiencia fragmentos scFv con diferentes especificidades o de variantes estabilizadas para interferir con las infecciones virales. En este sentido, el sistema de agroinfiltración de fragmentos scFv junto con la agroinoculación del clon viral PPV-GFP

representa un avance importante, ya que permitirá ensayar de forma mucho más rápida diferentes estrategias de inmunomodulación y seleccionar los candidatos más eficientes para su posterior aplicación en transformación estable. Además, mediante este tipo de ensayos, puesto que se realizan en planta completa, se podría determinar cuales son los factores de la fisiología de la planta o del ambiente que ayudan o limitan la eficacia de la inmunomodulación.

Por otro lado, la inmunomodulación está emergiendo no sólo como una forma de proporcionar resistencia a patógenos sino como una prometedora metodología de estudio de la función de proteínas en general (Nölke *et al.*, 2006; Gahrtz y Conrad, 2009) y de la biología de los virus en particular (Owens *et al.*, 2004; Nickel *et al.*, 2009). Puede ser una alternativa a la utilización de mutantes, incluso en algunas ocasiones la inmunomodulación es la única opción cuando se quiere estudiar la función de epítomos fundamentales para viabilidad viral (Vihinen-Ranta *et al.*, 2000; Owens *et al.*, 2004), y resulta imprescindible para estudiar la función que ejerce una proteína en diferentes compartimentos celulares. La función del epítomo de la proteína NIb de PPV reconocido por el fragmento recombinante scFv2A (Esteban, 2001) es hasta ahora desconocida, especialmente en el núcleo. Los resultados presentados muestran cómo la expresión de este fragmento en diferentes compartimentos celulares afecta de diferente forma a la infección de PPV, aunque no se ha podido determinar cómo ejerce esa interferencia. Estudios más detallados a nivel celular mediante microscopía confocal aportarían datos fundamentales para determinar qué tipo de interferencia produce el fragmento scFv2A en cada uno de los compartimentos celulares.

Todo ello repercutiría en una futura mejora en el diseño de estrategias para la obtención de plantas resistentes a virus. Entender la biología molecular de los virus y las funciones de las diversas proteínas expresadas partir de sus genomas es un requisito básico para el control de la propagación de los virus y la elaboración de estrategias antivirales.

Las grandes perspectivas que ofrecen las moléculas de anticuerpo recombinantes, ampliamente exploradas en patología animal y humana, tanto para el análisis de la función de determinados epítomos de una proteína, como para inhibir dicha función, animan a profundizar en este campo y a buscar nuevos fragmentos scFv que junto con el fragmento

scFv2A proporcionen estrategias de inmunomodulación capaces de frenar o interferir con la infección del virus de la sharka.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis doctoral permiten establecer las siguientes conclusiones:

- I. Se han obtenido diferentes líneas transgénicas estables de plantas de *N. benthamiana* que expresan los fragmentos de anticuerpo recombinantes scFv2A, NLSscFv2A o 6K2scFv2A. Si bien los niveles de acumulación de dichos fragmentos de anticuerpo recombinantes son bajos especialmente en el citoplasma (scFv2A) y núcleo (NLAscFv2A). Sin embargo, mediante “western blot” indirecto se pudo detectar su presencia en extractos de proteínas totales de plantas de todas las líneas transgénicas.
- II. Los fragmentos de anticuerpo recombinantes scFv2A, NLSscFv2A o 6K2scFv2A producidos en plantas transgénicas de *N. benthamiana* son capaces de reconocer específicamente a la RNA replicasa N1b de PPV.
- III. La expresión en plantas de dichos fragmentos de anticuerpo recombinantes interfiere con la infección viral disminuyendo el porcentaje de plantas infectadas y/o retrasando la aparición de síntomas. Las diferentes líneas de plantas transgénicas que expresan los fragmentos scFv2A, NLSscFv2A o 6K2scFv2A presentan diferentes grados de protección frente a la infección por PPV. El grado de protección depende de la dosis de inóculo y el método de inoculación y/o inóculo utilizado.
- IV. En los ensayos de desafío mediante inoculación mecánica del virus, las plantas transgénicas presentan mayores niveles de protección a dosis de inóculo menores. Cuando se disminuyó a la mitad la dosis de inóculo utilizada en los ensayos, el número de líneas transgénicas que presentaron protección aumentó de 3 a 6, y el porcentaje de protección promedio aumentó del 15% al 56%.
- V. Las líneas de plantas transgénicas que expresan los fragmentos scFv2A y NLSscFv2A presentan protección independientemente del método de inoculación utilizado, en cambio las líneas de plantas

transgénicas que expresan el fragmento 6K2scFv2A presentan protección únicamente cuando se desafían mediante inoculación mecánica.

- VI. El sistema de expresión transitoria por agroinfiltración mediante jeringa resulta apropiado para valorar la estabilidad y la capacidad de acumulación de fragmentos de anticuerpo recombinante en células de plantas. Es un sistema rápido y sencillo, se puede aplicar a nuevas construcciones candidatas para la transformación estable de plantas. Además, al realizarse en plantas completas permite evaluar los factores, tanto ambientales como de la propia planta, que afectan a dicha capacidad.
- VII. La expresión transitoria de los fragmentos scFv2A, NLSscFv2A o 6K2scFv2A produce niveles de acumulación detectables de todos ellos mediante "western blot" y ELISA. Estos niveles son mayores que los obtenidos mediante expresión estable aunque inferiores a los esperados. Ello indicaría que la acumulación de estos fragmentos recombinantes está limitado por las características intrínsecas de su secuencia de aminoácidos que determina su estabilidad en ambientes reductores como citoplasma y núcleo.
- VIII. La agroinoculación del clon viral PPV-GFP junto con la agroinfiltración de fragmentos de anticuerpo recombinantes resulta un sistema apropiado para la evaluación cuantitativa de la eficacia de dichos anticuerpos para interferir con la infección viral. La cuantificación del área total fluorescente sería el parámetro más adecuado para determinar la eficacia de interferencia con la infección viral.
- IX. La expresión del fragmento scFv2A en diferentes compartimentos celulares ha permitido establecer que el citoplasma y el núcleo son los compartimentos más adecuados para lograr interferir con la infección viral. Además, para que esta interferencia logre bloquear la infección tiene que producirse en estadios muy tempranos de la misma.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. y Pober, J.S.** (1995). "Anticuerpos y antígenos": pgs:38-39. In: Inmunología celular y molecular. Interamericana McGraw-Hill.
- Allen, D., Cumano, A., Simon, T., Sablitzky, F. y Rajewsky, K.** (1988). "Modulation of antibody binding affinity by somatic mutation". *Int J Cancer*. 3 (Suppl): 1-8.
- Amoah, B.K., Wu, H., Sparks, C. y Jones, H.D.** (2001). "Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *uidA* in wheat inflorescence tissue". *J Exp Botany* 52(358): 1135-1142.
- Anandalakshmi, R., Marathe, R., Ge, X., Herr, J.M., Jr., Mau, C., Mallory, A., Pruss, G., Bowman, L. y Vance, V.B.** (2000). "A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants". *Science* 290(5489): 142-144.
- Annamalai, P., y Rao, A. L.** (2005). "Replication-independent expression of genome components and capsid protein of brome mosaic virus in planta: a functional role for viral replicase in RNA packaging". *Virology* 338(1), 96-111.
- Arcangeli, C., Cantale, C., Galeffi, P., Gianese, G., Paparcone, R. y Rosato, V.** (2008). "Understanding structural/functional properties of immunoconjugates for cancer therapy by computational approaches". *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* 26(1): 35-47.
- Argos, P.** (1990). "An investigation of oligopeptides linking domains in protein tertiary structures and possible candidates for general gene fusion". *J Mol Biol.* 211(4): 943-958.
- Artsaenko, O., Peisker, M., zur Nieden, U., Fiedler, U., Weiler, E.W., Muntz, K. y Conrad, U.** (1995). "Expression of a single-chain Fv antibody against abscisic acid creates a wilty phenotype in transgenic tobacco". *Plant J* 8(5): 745-750.
- Atanassof** (1932). "*Plum pox*. A new virus disease". *Annals of the University of Sofia, Faculty of Agriculture and Silviculture* 11: 49-69.
- Avogadro, A.,** (1811). "Essai d'une manie`re de determiner les masses relatives des molecules elementaires des corps, et les proportions se`lon lesquelles elles entrent dans ces combinaisons". *J. Phys.* 73, 58.
- Badenes, M.L. y Llácer, G.** (2006). "Apricot species: phylogeny and diversity". *Plant Genome: Biodiversity and Evolution*, Pt C 1(1): 475-488.
- Bajrovic, K., Erdag, B., Atalay, E.O. y Cirakoclu, B.** (2001). "Full resistance to *Tobacco mosaic virus* infection conferred by the transgenic expression of a recombinant antibody in tobacco". *Biotechnol & Biotechnological Equip.* 15(1): 21-27.
- Barajas, D., Tenllado, F., González-Jara, P., Martínez-García, B., Atencio, F.A. y Díaz-Ruiz, J.R.** (2004). "Resistance to *Plum pox virus* (PPV) in *Nicotiana benthamiana* plants transformed with the PPV HC-PRO silencing suppressor gene". *J of Plant Pathol.* 86(3): 239-248.
- Barbas, C.F., Bain, J.D., Hoekstra, D.M. y Lerner, R.A.** (1992). "Semisynthetic combinatorial antibody libraries - A chemical solution to the diversity problem ". *Proc Natl Acad Sci USA* 89(10): 4457-4461.
- Bajrovic, K., Erdag, B., Atalay, E. O., y Cirakoclu, B.** (2001). "Full resistance to tobacco mosaic virus infection conferred by the transgenic expression of a recombinant antibody in tobacco". *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 15(1), 21-27.

- Baulcombe, D.C., Chapman, S. y Cruz, S.S.** (1995). "Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus-infections". *Plant J.* 7(6): 1045-1053.
- Baum, T.J., Hiatt, A., Parrott, W.A., Pratt, L.H. y Hussey, R.S.** (1996). "Expression in tobacco of a functional monoclonal antibody specific to stylet of the root-knot nematode". *Mol Plant-Microbe Interact.* 9(6): 382-387.
- Becker, R.S. y Knight, K.L.** (1990). "Somatic diversification of immunoglobulin heavy chain VDJ genes: evidence for somatic gene conversion in rabbits". *Cell* 63(5): 987-997.
- Bendahmane, A., Querci, M., Kanyuka, K. y Baulcombe, D.C.** (2000). "Agrobacterium transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the *Rx2* locus in potato". *Plant J.* 21(1): 73-81.
- Berek, C. y Milstein, C.** (1987). "Mutation drift and repertoire shift in the maturation of the immune response". *Immunol Rev.* 96: 23-41.
- Berger, P.H., Hunt, A.G., Domier, L.L., Hellmann, G.M., Stram, Y., Thornbury, D.W. y Pirone, T.P.** (1989). "Expression in transgenic plants of a viral gene product that mediates insect transmission of potyviruses". *Proc Natl Acad Sci USA* 86(21): 8402-8406.
- Biocca, S., Ruberti, F., Tafani, M., Pierandrei-Amaldi, P. y Cattaneo, A.** (1995). "Redox state of single chain Fv fragments targeted to the endoplasmic reticulum, cytosol and mitochondria". *Biotechnology (N Y)* 13(10): 1110-1115.
- Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S. y Whitlow, M.** (1988). "Single-chain antigen-binding proteins". *Science* 242(4877): 423-426.
- Bond, C.J., Wiesmann, C., Marsters, J.C., Jr. y Sidhu, S.S.** (2005). "A structure-based database of antibody variable domain diversity". *J Mol Biol.* 348(3): 699-709.
- Boonrod, K., Galetzka, D., Nagy, P.D., Conrad, U. y Krczal, G.** (2004). "Single-chain antibodies against a plant viral RNA-dependent RNA polymerase confer virus resistance". *Nat Biotechnol* 22(7): 856-862.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L.H., Ding, S.W. y Baulcombe, D.C.** (1998). "Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*". *EMBO J.* 17(22): 6739-6746.
- Bruyns, A.M., De Jaeger, G., De Neve, M., De Wilde, C., Van Montagu, M. y Depicker, A.** (1996). "Bacterial and plant-produced scFv proteins have similar antigen-binding properties". *FEBS Lett.* 386(1): 5-10.
- Burton, D.R., Barbas, C.F., 3rd, Persson, M.A., Koenig, S., Chanock, R.M. y Lerner, R.A.** (1991). "A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals". *Proc Natl Acad Sci USA* 88(22): 10134-10137.
- Cambra, M., Asensio, M., Gorris, M.T., Pérez, E., Camarasa, E., García, J.A., Moya, J.J., López-Abella, D., Vela, C. y Sanz, A.** (1994). "Detection of plum pox potyvirus using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins". *EPPO Bull.* 24: 569-577.
- Cambra, M., Capote, N., Myrta, A. y Llácer, G.** (2006a). "Plum pox virus and the estimated costs associated with dharka disease". *EPPO Bull.* 36: 202-204.

- Cambra, M., Boscia, D., Myrta, A., Palkovics, L., Navratil, M., Barba, M., Gorris, M.T. y Capote, N.** (2006b). "Serological detection and characterisation of *Plum pox virus*". *EPPO Bull.* 36: 254-261.
- Cambra, M.A., Crespo, J., Gorris, M.T., Martínez, M.C., Olmos, A., Capote, N. y Cambra, M.** (2003). "Detection and Eradication of *Plum pox virus* Marcus Type in Aragón (Spain)". *Acta horticulturae* 657: 231-233.
- Candresse, T. y Cambra, M.** (2006). "Causal agent of sharka disease: historical perspective and current status of *Plum pox virus* strains". *EPPO Bull.* 36: 239-246.
- Candresse, T., Le Gall, O., Maisonneuve, B., German-Retana, S. y Redondo, E.** (2002). "The use of green fluorescent protein-tagged recombinant viruses to test *Lettuce mosaic virus* resistance in lettuce". *Phytopathology* 92(2): 169-176.
- Capote, N., Pérez-Panades, J., Monzo, C., Carbonell, E., Urbaneja, A., Scorza, R., Ravelonandro, M. y Cambra, M.** (2008). "Assessment of the diversity and dynamics of *Plum pox virus* and aphid populations in transgenic European plums under Mediterranean conditions". *Transgenic Res.* 17(3): 367-377.
- Carrington, J.C., Freed, D.D. y Leinicke, A.J.** (1991). "Bipartite signal sequence mediates nuclear translocation of the plant potyviral NIa protein". *Plant Cell* 3(9): 953-962.
- Carrington, J.C., Jensen, P.E. y Schaad, M.C.** (1998). "Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement". *Plant J.* 14(4): 393-400.
- Cheng, N. H., Su, C. L., Carter, S. A., y Nelson, R. S.** (2000). "Vascular invasion routes and systemic accumulation patterns of *tobacco mosaic virus* in *Nicotiana benthamiana*". *Plant J* 23(3), 349-62.
- Chung, B., Miller, W.A., Atkins, J.F. y Firth, A.F.** (2008). "An overlapping essential gene in the Potyviridae". *Proc Natl Acad Sci USA* 105 (15): 5897-5902.
- Clackson, T., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D. y Winter, G.** (1991). "Making antibody fragments using phage display libraries". *Nature* 352(6336): 624-628.
- Conrad, U. y Manteuffel, R.** (2001). "Immunomodulation of phytohormones and functional proteins in plant cells". *Trends Plant Sci.* 6(9): 399-402.
- Dafny-Yelin, M., Levy, A. y Tzfira, T.** (2008). "The ongoing saga of *Agrobacterium*-host interactions". *Trends Plant Sci* 13(3): 102-105.
- Dal Zotto, A., Ortego, J.M., Raigon, J.M., Caloggero, S., Rossini, M. y Ducasse, D.A.** (2006). "First report in Argentina of *Plum pox virus* causing Sharka disease in Prunus". *Plant Dis.* 90(4): 523-523.
- D'Aoust, M. A., Lavoie, P. O., Couture, M. M., Trepanier, S., Guay, J. M., Dargis, M., Mongrand, S., Landry, N., Ward, B. J., y Vezina, L. P.** (2008). "Influenza virus-like particles produced by transient expression in *Nicotiana benthamiana* induce a protective immune response against a lethal viral challenge in mice". *Plant Biotechnol J* 6(9), 930-40.
- Das, D., Allen, T.M. y Suresh, M.R.** (2005). "Comparative evaluation of two purification methods of anti-CD19-c-myc-His6-Cys scFv". *Protein Expr Purif* 39(2): 199-208.
- Davies, J. y Riechmann, L.** (1995). "Antibody VH domains as small recognition units". *Bio-Technology* 13(5): 475-479.
- De Jaeger, G., Buys, E., Eeckhout, D., De Wilde, C., Jacobs, A., Kapila, J., Angenon, G., Van Montagu, M., Gerats, T. y Depicker, A.** (1999). "High level accumulation

- of single-chain variable fragments in the cytosol of transgenic *Petunia hybrida*". *Eur J Biochem.* 259(1-2): 426-434.
- De Neve, M., De Loose, M., Jacobs, A., Van Houdt, H., Kaluza, B., Weidle, U., Van Montagu, M. y Depicker, A.** (1993). "Assembly of an antibody and its derived antibody fragment in *Nicotiana* and *Arabidopsis*". *Transgenic Res.* 2(4): 227-237.
- De Wilde, C., De Rycke, R., Beeckman, T., De Neve, M., Van Montagu, M., Engler, G. y Depicker, A.** (1998). "Accumulation pattern of IgG antibodies and Fab fragments in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants". *Plant Cell Physiol.* 39(6): 639-646.
- Decroocq, V., Foulongne, M., Lambert, P., Le Gall, O., Mantin, C., Pascal, T., Schurdi-Levraud, V. y Kervella, J.** (2005). "Analogues of virus resistance genes map to QTLs for resistance to sharka disease in *Prunus davidiana*". *Mol Gen Genomics* 272: 680-689.
- Decroocq, V., Sicard, O., Alamillo, J.M., Lansac, M., Eyquard, J.P., García, J.A., Candresse, T., Le Gall, O. y Revers, F.** (2006). "Multiple resistance traits control *Plum pox virus* infection in *Arabidopsis thaliana*". *Mol Plant-Microbe Interact.* 19(5): 541-549.
- DeJonge, J., Brissinck, J., Heirman, C., Demanet, C., Leo, O., Moser, M. y Thielemans, K.** (1995). "Production and characterization of bispecific single-chain antibody fragments". *Mol Immunol.* 32(17-18): 1405-1412.
- Denecke, J., De Rycke, R. y Botterman, J.** (1992). "Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope". *EMBO J.* 11(6): 2345-2355.
- Desiderio, A., Franconi, R., López, M., Villani, M.E., Viti, F., Chiaraluce, R., Consalvi, V., Neri, D. y Benvenuto, E.** (2001). "A semi-synthetic repertoire of intrinsically stable antibody fragments derived from a single-framework scaffold". *J Mol Biol.* 310(3): 603-615.
- Desplancq, D., King, D.J., Lawson, A.D. y Mountain, A.** (1994). "Multimerization behaviour of single chain Fv variants for the tumour-binding antibody B72.3". *Protein Eng.* 7(8): 1027-1033.
- Di Nicola-Negri, E., Brunetti, A., Tavazza, M. y Ilardi, V.** (2005). "Hairpin RNA-mediated silencing of *Plum pox virus* P1 and HC-Pro genes for efficient and predictable resistance to the virus". *Transgenic Res.* 14(6): 989-994.
- Díaz-Vivancos, P., Rubio, M., Mesonero, V., Periago, P. M., Barceló, A. R., Martínez-Gómez, P., y Hernández, J. A.** (2006). "The apoplastic antioxidant system in *Prunus*: response to long-term *plum pox virus* infection". *J Exp Bot* 57(14), 3813-24.
- Díaz-Vivancos, P., Clemente-Moreno, M. J., Rubio, M., Olmos, E., García, J. A., Martínez-Gómez, P., y Hernández, J. A.** (2008). "Alteration in the chloroplastic metabolism leads to ROS accumulation in pea plants in response to *plum pox virus*". *Journal of Experimental Botany* 59(8), 2147-2160.
- Ding, S. W., y Voinnet, O.** (2007). "Antiviral immunity directed by small RNAs". *Cell* 130(3), 413-26.
- Dolja, V.V., McBride, H.J. y Carrington, J.C.** (1992). "Tagging of plant potyvirus replication and movement by insertion of beta-glucuronidase into the viral polyprotein". *Proc Natl Acad Sci USA* 89(21): 10208-10212.

- Domingo, E., Martín, V., Perales, C., Grande-Perez, A., García-Arriaza, J., y Arias, A.** (2006). "Viruses as quasispecies: biological implications". *Curr Top Microbiol Immunol* 299, 51-82.
- Domingo, E., Martínez-Salas, E., Sobrino, F., de la Torre, J.C., Portela, A., Ortín, J., López-Galíndez, C., Pérez-Brena, P., Villanueva, N., Najera, R. y et al.** (1985). "The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance--a review". *Gene* 40(1): 1-8.
- Dübel, S., Breitling, F., Kontermann, R., Schmidt, T., Skerra, A. y Little, M.** (1995). "Bifunctional and multimeric complexes of streptavidin fused to single-chain antibodies (scFv)". *J Immunol Methods* 178(2): 201-209.
- Düring, K., Hippe, S., Kreuzaler, F. y Schell, J.** (1990). "Synthesis and self-assembly of a functional monoclonal antibody in transgenic *Nicotiana tabacum*". *Plant Mol Biol.* 15(2): 281-293.
- Eeckhout, D., De Clercq, A., Van De Slijke, E., Van Leene, J., Stals, H., Casteels, P., Persiau, G., Vercammen, D., Van Breusegem, F., Zabeau, M., Inze, D., Jespers, L., Depicker, A. y De Jaeger, G.** (2004). "A technology platform for the fast production of monoclonal recombinant antibodies against plant proteins and peptides". *J Immunol Methods* 294(1-2): 181-187.
- Elmer, J.S., Brand, L., Sunter, G., Gardiner, W.E., Bisaro, D.M. y Rogers, S.G.** (1988). "Genetic analysis of the tomato golden mosaic virus. II. The product of the AL1 coding sequence is required for replication". *Nucleic Acids Res.* 16(14B): 7043-7060.
- EPPO** (2004). "Diagnostic protocol for regulated pests. *Plum pox potyvirus*". *EPPO Bull.* 34: 247-256.
- Esteban, O.** (2001). "Generación y expresión en *Nicotiana benthamiana* de anticuerpos recombinantes frente a las proteínas de la cápsida y RNA replicasa N1b del virus de la sharka: una estrategia alternativa para interferir con la infección viral". Tesis Doctoral. Universidad de Valencia
- Esteban, O., García, J.A., Gorrís, M.T., Domínguez, E. y Cambra, M.** (2003). "Generation and characterisation of functional recombinant antibody fragments against RNA replicase N1b from *Plum pox virus*". *Biochem Biophys Res Commun.* 301(1): 167-175.
- Ewert, S., Honegger, A. y Plückthun, A.** (2003). "Structure-based improvement of the biophysical properties of immunoglobulin VH domains with a generalizable approach". *Biochemistry* 42(6): 1517-1528.
- Fanigliulo, A., Comes, S., Maiss, E., Piazzolla, P., y Crescenzi, A.** (2003). "The complete nucleotide sequence of *Plum pox virus* isolates from sweet (PPV-SwC) and sour (PPV-SoC) cherry and their taxonomic relationships within the species". *Arch Virol* 148(11), 2137-53.
- Farnham, G. y Baulcombe, D.C.** (2006). "Artificial evolution extends the spectrum of viruses that are targeted by a disease-resistance gene from potato". *Proc Natl Acad Sci. USA* 103(49): 18828-18833.
- Fecker, L.F., Koenig, R. y Obermeier, C.** (1997). "*Nicotiana benthamiana* plants expressing *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) coat protein-specific scFv are partially protected against the establishment of the virus in the early stages of

- infection and its pathogenic effects in the late stages of infection". *Arch Virol.* 142(9): 1857-1863.
- Fernández, A. y García, J.A.** (1996). "The RNA helicase CI from plum pox potyvirus has two regions involved in binding to RNA". *FEBS Lett.* 388: 206-210.
- Fernández, A., Laín, S. y García, J.A.** (1995). "RNA helicase activity of the *plum pox potyvirus* CI protein expressed in *Escherichia coli*. Mapping of an RNA binding domain". *Nucleic Acids Res.* 23(8): 1327-1332.
- Fernández-Fernández, M.R., Lucini, C., López-Moya, J.J., Guo, H., Martínez-Torrecuadrada, J., Casal, J.I., Mourino, M., Plana-Durán, J., Rivera, J., Rodríguez, J.F., Montoya, M., Del Val, M. y García, J.A.** (2001). "Use of *Plum pox potyvirus* as an expression vector in plants". *Molecular Farming*: 161-172.
- Fischer, R., Twyman, R.M. y Schillberg, S.** (2003). "Production of antibodies in plants and their use for global health". *Vaccine* 21(7-8): 820-825.
- Fomitcheva, V.W., Schubert, J., Saalbach, I., Habekuss, A., Kumlehn, J., y Conrad, U.** (2005). "Bacterial expression and characterization of a single-chain variable fragment antibody specific to several replicases of plant (+)RNA viruses". *Journal of Phytopathology* 153(11-12), 633-639.
- Fraley, R.T., Horsch, R.B., Matzke, A., Chilton, M.D., Chilton, W.S. y Sanders, P.R.** (1984). "In vitro transformation of petunia cells by an improved method of co-cultivation with *A. tumefaciens* strains". *Plant Mol Biol.* 3: 371-378.
- Fusaro, A.F., Matthew, L., Smith, N.A., Curtin, S.J., Dedic-Hagan, J., Ellacott, G.A., Watson, J.M., Wang, M.B., Brosnan, C., Carroll, B.J. y Waterhouse, P.M.** (2006). "RNA interference-inducing hairpin RNAs in plants act through the viral defence pathway". *EMBO Rep.* 7(11): 1168-1175.
- Gahrtz, M. y Conrad, U.** (2009). "Immunomodulation of plant function by in vitro selected single-chain fv intrabodies". *Methods Mol Biol.:* 289-312.
- García, J.A. y Cambra, M.** (2007). "Plum pox virus and sharka disease". *Plant Viruses* 1(1):1-11
- García, J.A., Cervera, M.T., Riechmann, J.L. y López-Otín, C.** (1993). "Inhibitory effects of human cystatin C on *plum pox potyvirus* proteases". *Plant Mol Biol.* 22(4): 697-701.
- García, J.A. y Laín, S.** (1991). "Proteolytic activity of *Plum pox virus-Tobacco etch virus* chimeric NIa proteases". *FEBS Lett.* 281(1-2): 67-72.
- García, J.A., Lucini, C., García, B., Alamillo, J.M. y López-Moya, J.J.** (2006). "Use of *Plum pox virus* as a plant expression vector". *EPPO Bull.* 36: 341-345.
- García, J.A., Riechmann, J.L. y Laín, S.** (1989). "Proteolytic activity of the *Plum pox potyvirus* NIa-like protein in *Escherichia coli*". *Virology* 170(2): 362-369.
- Gargouri-Bouazid, R., Jaoua, L., Rouis, S., Saidi, M.N., Bouaziz, D. y Ellouz, R.** (2006). "PVY-Resistant transgenic potato plants expressing an anti-NIa Protein scFv Antibody". *Mol Biotechnol.* 33(2): 133-140.
- German-Retana, S., Candresse, T., Alias, E., Delbos, R.P. y Le Gall, O.** (2000). "Effects of green fluorescent protein or beta-glucuronidase tagging on the accumulation and pathogenicity of a resistance-breaking *Lettuce mosaic virus* isolate in susceptible and resistant lettuce cultivars". *Mol. Plant-Microbe Interac.* 13(3): 316-324.
- Giddings, G., Allison, G., Brooks, D. y Carter, A.** (2000). "Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals". *Nature Biotech.* 18(11): 1151-1155.

- Givol, D. (1991). "The minimal antigen-binding fragment of antibodies--Fv fragment". *Mol Immunol* 28(12): 1379-1386.
- Glasa, M., Labonne, G. y Quiot, J.B. (2003). "Effect of temperature on *Plum pox virus* infection". *Acta Virol.* 47(1): 49-52.
- Glasa, M., Palkovics, L., Kominek, P., Labonne, G., Pittnerova, S., Kudela, O., Candresse, T., y Subr, Z. (2004). "Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of *Plum pox virus* (PPV) are genetically very similar and form a unique PPV subgroup". *J Gen Virol* 85(Pt 9), 2671-81.
- Glockshuber, R., Malia, M., Pfitzinger, I. y Plückthun, A. (1990). "A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments". *Biochemistry* 29(6): 1362-1367.
- Goldbach, R., Bucher, E. y Prins, M. (2003). "Resistance mechanisms to plant viruses: an overview". *Virus Res.* 92(2): 207-212.
- Gómez de Cedron, M., Osaba, L., López, L. y García, J.A. (2006). "Genetic analysis of the function of the *Plum pox virus* CI RNA helicase in virus movement". *Virus Res.* 116(1-2): 136-145.
- Goossens, T., Klein, U. y Koppers, R. (1998). "Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease". *Proc Natl Acad Sci. USA* 95(5): 2463-2468.
- Gottwald, T.R. (2006). "Epidemiology of sharka disease in North America". *EPPO Bull.* 36: 279-286.
- Goytia, E., Fernández-Calvino, L., Martínez-García, B., López-Abella, D., y López-Moya, J. J. (2006). "Production of *Plum pox virus* HC-Pro functionally active for aphid transmission in a transient-expression system". *J Gen Virol.* 87(Pt 11), 3413-23.
- Green, B. J., Fujiki, M., Mett, V., Kaczmarczyk, J., Shamloul, M., Musiychuk, K., Underkoffler, S., y Yusibov, V. (2009). "Transient protein expression in three *Pisum sativum* (green pea) varieties". *Biotechnol J.* 4(2), 230-7.
- Grimsley, N., Hohn, B., Hohn, T. y Walden, R. (1986). "Agroinfection," an alternative route for viral infection of plants by using the Ti plasmid". *Proc Natl Acad Sci. USA* 83(10): 3282-3286.
- Guo, H.S., Cervera, M.T. y García, J.A. (1998). "*Plum pox potyvirus* resistance associated to transgene silencing that can be stabilized after different number of plant generations". *Gene* 206(2): 263-272.
- Gutiérrez-Campos, R., Torres-Acosta, J.A., Saucedo-Arias, L.J. y Gómez-Lim, M.A. (1999). "The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants". *Nature Biotech.* 17(12): 1223-1226.
- Hagiwara, Y., Komoda, K., Yamanaka, T., Tamai, A., Meshi, T., Funada, R., Tsuchiya, T., Naito, S., y Ishikawa, M. (2003). "Subcellular localization of host and viral proteins associated with tobamovirus RNA replication". *EMBO J* 22(2), 344-53.
- Hanes, J. y Plückthun, A. (1997). "In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display". *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4937-4942.
- Hanley-Bowdoin, L., Elmer, J. S., y Rogers, S.G. (1988). "Transient expression of heterologous RNAs using tomato golden mosaic virus". *Nucleic Acids Res* 16(22),

10511-28.

- Harlow, E. y Lane, D.** (1988). "Antibodies: a laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
- Hartmann, E. y Neumüller, M.** (2006). "Breeding for resistance: breeding for *Plum pox virus* resistant plums (*Prunus domestica* L.) in Germany". *EPPO Bull* 36(332-336).
- Hassani-Mehraban, A., Brenkman, A. B., van den Broek, N. J., Goldbach, R., y Kormelink, R.** (2009). "RNAi-mediated transgenic Tospovirus resistance broken by intraspecies silencing suppressor protein complementation". *Mol Plant Microbe Interact* 22(10), 1250-7.
- Hiatt, A.** (1990). "Antibodies produced in plants". *Nature* 344(6265): 469-470.
- Hiatt, A., Cafferkey, R. y Bowdish, K.** (1989). "Production of antibodies in transgenic plants". *Nature* 342(6245): 76-78.
- Hiebert, E., Thornbury, D.W. y Pironet, T.P.** (1984). "Immunoprecipitation analysis of potyviral in vitro translation products using antisera to helper component of *Tobacco vein mottling virus* and *potato virus Y*". *Virology* 135(1): 1-9.
- Hily, J.M., Scorza, R., Malinowski, T., Zawadzka, B. y Ravelonandro, M.** (2004). "Stability of gene silencing-based resistance to *Plum pox virus* in transgenic plum (*Prunus domestica* L.) under field conditions". *Transgenic Res* 13(5): 427-436.
- Ho, M., Nagata, S. y Pastan, I.** (2006). "Isolation of anti-CD22 Fv with high affinity by Fv display on human cells". *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (25): 9637-42.
- Honegger, A., Malebranche, A.D., Rothlisberger, D. y Plückthun, A.** (2009). "The influence of the framework core residues on the biophysical properties of immunoglobulin heavy chain variable domains". *Protein Eng Des Sel* 22(3): 121-134.
- Hong, Y. y Hunt, A.G.** (1996). "RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase". *Virology* 226(1): 146-151.
- Hoogenboom, H.R.** (2005). "Selecting and screening recombinant antibody libraries". *Nature Biotechnology* 23(9): 1105-1116.
- Hoogenboom, H.R., Marks, J.D., Griffiths, A.D. y Winter, G.** (1992). "Building antibodies from their genes". *Immunological Reviews* 130: 41-68.
- Hoogenboom, H.R. y Winter, G.** (1992). "By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro". *J Mol Biol* 227(2): 381-388.
- Horsch, R.B., Klee, H.J., Stachel, S., Winans, S.C., Nester, E.W., Rogers, S.G. y Fraley, R.T.** (1986). "Analysis of *Agrobacterium tumefaciens* virulence mutants in leaf discs". *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(8): 2571-2575.
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, D., Eichholtz, D., Rogers, S.G. y Fraley, R.T.** (1985). "A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants". *Science* 227 (4691):1229-1231
- Horsfall, J.G. y Cowling, E.B.** (1977). "Prologue: How disease is managed": pgs:1-10. In: Plant disease and advanced treatise. Eds. Horsfall J. G. y Cowling E. B. Academic Press, New York.
- Hurtado, A., Romero, C., Vilanova, S., Abbott, G., Llácer, G., y Badenes, L.** (2002). "Genetic linkage maps of two apricot cultivars (*Prunus armeniaca* L.), and mapping of PPV (sharka) resistance". *Theor Appl Genet* 105(2-3), 182-191.

- Ion-Nagy, L., Lansac, M., Eyquard, J. P., Salvador, B., Garcia, J. A., Le Gall, O., Hernould, M., Schurdi-Levraud, V., y Decroocq, V.** (2006). "PPV long-distance movement is occasionally permitted in resistant apricot hosts". *Virus Res* **120**(1-2), 70-8.
- Jacquet, C., Ravelonandro, M., Bachelier, J. C., y Dúnez, J.** (1998). "High resistance to *plum pox virus* (PPV) in transgenic plants containing modified and truncated forms of PPV coat protein gene". *Transgenic Research* **7**(1), 29-39.
- James, D. y Glasa, M.** (2006). "Causal agent of sharka disease: new and emerging events associated with *Plum pox virus* characterization". *EPPO Bull.* **36**: 247-250.
- James, D., y Varga, A.** (2005). "Nucleotide sequence analysis of *Plum pox virus* isolate W3174: evidence of a new strain". *Virus Res* **110**(1-2), 143-50.
- Janssen, B.J. y Gardner, R.C.** (1990). "Localized transient expression of GUS in leaf-disks following cocultivation with *Agrobacterium*". *Plant Mol Biol.* **14**(1): 61-72.
- Janssen, B.J. y Gardner, R.C.** (1993). "The use of transient gus expression to develop an *Agrobacterium*-mediated gene-transfer system for kiwifruit". *Plant Cell Reports* **13**(1): 28-31.
- Jirholt, P., Ohlin, M., Borrebaeck, C.A. y Söderlind, E.** (1998). "Exploiting sequence space: shuffling in vivo formed complementarity determining regions into a master framework". *Gene* **215**(2): 471-476.
- Jobling, S.A., Jarman, C., Teh, M.M., Holmberg, N., Blake, C. y Verhoeyen, M.E.** (2003). "Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments". *Nature Biotech.* **21**(1): 77-80.
- Jung, S., Spinelli, S., Schimmele, B., Honegger, A., Pugliese, L., Cambillau, C. y Plückthun, A.** (2001). "The importance of framework residues H6, H7 and H10 in antibody heavy chains: Experimental evidence for a new structural subclassification of antibody V-H domains". *J Mol. Biol.* **309**(3): 701-716.
- Kamer, G. y Argos, P.** (1984). "Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses". *Nucleic Acids Res.* **12**(18): 7269-7282.
- Kapila, J., DeRycke, R., VanMontagu, M. y Angenon, G.** (1997). "An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves". *Plant Sci.* **122**(1): 101-121.
- Karayiannis, I.** (2006). "Breeding for resistance: Conventional breeding for *Plum pox virus* resistant apricots (*Prunus armenica* L.) in Greece". *EPPO Bull* **36**: 319-322.
- Kasschau, K.D. y Carrington, J.C.** (1998). "A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing". *Cell* **95**(4): 461-470.
- Kasschau, K.D., Cronin, S. y Carrington, J.C.** (1997). "Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of *Tobacco etch potyvirus* helper component-proteinase". *Virology* **228**(2): 251-262.
- Kegler H, Fuchs E, Grüntzig M, Schwarz S.** (1998). "Some results of 50 years of research on the resistance to plum pox virus". *Acta Virol.* **42**(4):200-15.
- Kieke, M.C., Cho, B. K., Boder, E. T., Kranz, D M y Wittrup, K.M.** (1997). "Isolation of anti-T cell receptor scFv mutants by yeast surface display". *Protein Eng* **10** (11):1303-10.

- Klein, P.G., Klein, R.R., Rodríguez-Cerezo, E., Hunt, A.G. y Shaw, J.G. (1994). "Mutational analysis of the *Tobacco vein mottling virus* genome". *Virology* 204(2): 759-769.
- Kohler, G. y Milstein, C. (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity". *Nature* 256(5517): 495-497.
- Kollerova, E., Novakova, S., Subr, Z. y Glasa, M. (2006). "*Plum pox virus* mixed infection detected on apricot in Pakistan". *Plant Disease* 90(8): 1108-1108.
- Koncz, C. y Schell, J. (1986). "The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector". *Mol. Gen Genet.* 204(3): 383-396.
- Koonin, E.V. (1991). "The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses". *J Gen Virol* 72 (Pt 9): 2197-2206.
- Kostelny, S.A., Cole, M.S. y Tso, J.Y. (1992). "Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers". *J Immunol* 148(5): 1547-1553.
- Krska, B., Salava, J. y Polák, J. (2006). "Breeding for resistance: breeding for Plum pox resistente apricots (*Prunus armenica* L.) in the Czech Republic". *EPPO Bull* 36: 330-331.
- Lain, S., Riechmann, J.L. y García, J.A. (1990). "RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus". *Nucleic Acids Res.* 18(23): 7003-7006.
- Lansac, M., Eyquard, J. P., Salvador, B., Garcia, J. A., Le Galla, O., Decroocq, V., y Escalettes, V. S. L. (2005). "Application of GFP-tagged *Plum pox virus* to study *Prunus*-PPV interactions at the whole plant and cellular levels". *Journal of Virological Methods* 129(2), 125-133.
- Le Gall, F., Bové, J.M. y Garnier, M. (1998). "Engineering of a single-chain variable-fragment (scFv) antibody specific for the stolbur phytoplasma (Mollicute) and its expression in *Escherichia coli* and tobacco plants". *Appl Environ Microbiol.* 64(11): 4566-4572.
- Lebas, B.S.M., Ochoa-Corona, F.M., Helliot, D.R., Double, B., Smales, T. y Wilson, J.A. (2006). "Control and monitoring: quarantine situation of *Plum pox virus* in New Zealand". *EPPO Bull.* 36: 296-301.
- Levy, L. (2006). "*Plum pox virus* (PPV) in the United States of America". *EPPO Bull.* 36: 217-218.
- Levy, L., Damsteegt, V. y Welliver, R. (2000). "First Report of *Plum pox virus* (Sharka Disease) in *Prunus persica* in the United States". *Plant Disease* 84(2): 202.
- Li, X.H. y Carrington, J.C. (1993). "Nuclear transport of *Tobacco etch* potyviral RNA-dependent RNA polymerase is highly sensitive to sequence alterations". *Virology* 193(2): 951-958.
- Li, X.H., y Carrington, J.C. (1995). "Complementation of tobacco etch potyvirus mutants by active RNA polymerase expressed in transgenic cells2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(2), 457-61.
- Li, X.H., Valdez, P., Olvera, R.E. y Carrington, J.C. (1997). "Functions of the *Tobacco etch virus* RNA polymerase (N1b): subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (N1a)". *J Virol.* 71(2): 1598-1607.

- Lindbo, J.A.** (2007). "High-efficiency protein expression in plants from agroinfection-compatible *Tobacco mosaic virus* expression vectors". *BMC Biotechnol* 7: 52.
- Lindbo, J.A. y Dougherty, W.G.** (2005). "Plant pathology and RNAi: a brief history". *Annu Rev Phytopathol.* 43: 191-204.
- Llácer, G.** (2006). "Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: Herbaceous hosts". *EPPO Bull.* 36: 227-228.
- Llácer, G. y Cambra, M.** (2006). "Host and symptoms of *Plum pox virus*: fruiting Prunus species". *EPPO Bull.* 36: 219-221.
- Llave, C., Kasschau, K.D. y Carrington, J.C.** (2000). "Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway". *Proc Natl Acad Sci. USA* 97(24): 13401-13406.
- Llop, P., Caruso, P., Cubero, J., Morente, C. y López, M.M.** (1999). "A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction". *J Microbiol Methods* 37(1): 23-31.
- Lohmann, V., Korner, F., Herian, U. y Bartenschlager, R.** (1997). "Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity". *J Virol.* 71(11): 8416-8428.
- Longstaff, M., Brigneti, G., Boccard, F., Chapman, S. y Baulcombe, D.** (1993). "Extreme resistance to potato virus X infection in plants expressing a modified component of the putative viral replicase". *EMBO J.* 12(2): 379-386.
- Ma, J., Hiatt, A., Hein, M., Vine, N.D., Wang, F., Stabila, P., Vandolleweerd, C., Mostov, K. y Lehner, T.** (1995). "Generation and assembly of secretory antibodies in plants". *Science* 268(5211): 716-719.
- MacDiarmid, R.** (2005). "RNA silencing in productive virus infections". *Annu Rev Phytopathol.* 43: 523-544.
- Maiss, E., Timpe, U., Briske, A., Jelkmann, W., Casper, R., Himmler, G., Mattanovich, D. y Katinger, H.W.** (1989). "The complete nucleotide sequence of *Plum pox virus* RNA". *J Gen Virol.* 70 (Pt 3): 513-524.
- Malinowski, T., Cambra, M., Capote, N., Zawadzka, B., Gorris, M.T., Scorza, R. y Ravelonandro, M.** (2006). "Field trials of plum clones transformed with the *Plum pox virus* coat protein (PPV-CP) gene". *Plant Disease* 90(8): 1012-1018.
- Mallender, W.D. y Voss, E.W., Jr.** (1994). "Construction, expression, and activity of a bivalent bispecific single-chain antibody". *J Biol Chem.* 269(1): 199-206.
- Mallory, A.C., Ely, L., Smith, T.H., Marathe, R., Anandalakshmi, R., Fagard, M., Vaucheret, H., Pruss, G., Bowman, L. y Vance, V.B.** (2001). "HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal". *Plant Cell* 13(3): 571-583.
- Marandel, G., Salava, J., Abbott, A., Candresse, T., y Decroocq, V.** (2009). "Quantitative trait loci meta-analysis of Plum pox virus resistance in apricot (*Prunus armeniaca* L.): new insights on the organization and the identification of genomic resistance factors". *Mol Plant Pathol* 10(3), 347-60.
- Marasco, W.A.** (2001). "Intrabodies as antiviral agents". *Curr Top Microbiol Immunol.* 260: 247-270.

- Marillonnet, S., Giritch, A., Gils, M., Kandzia, R., Klimyuk, V. y Gleba, Y.** (2004). "In planta engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*". *Proc Natl Acad Sci. USA* 101(18): 6852-6857.
- Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V. y Gleba, Y.** (2005). "Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants". *Nat Biotech.* 23(6): 718-723.
- Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Bonnert, T.P., McCafferty, J., Griffiths, A.D. y Winter, G.** (1991). "By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage". *J Mol Biol.* 222(3): 581-597.
- Martín, M.T., Cervera, M.T., García, J.A. y Bonay, P.** (1995). "Properties of the active *plum pox potyvirus* RNA polymerase complex in defined glycerol gradient fractions". *Virus Res.* 37(2): 127-137.
- Martín, M.T. y García, J.A.** (1991). "*Plum pox potyvirus* RNA replication in a crude membrane fraction from infected *Nicotiana clevelandii* leaves". *J Gen Virol.* 72 (4): 785-790.
- Martín, M.T., García, J.A., Cervera, M.T., Goldbach, R.W. y Vanlent, J.W.M.** (1992). "Intracellular-localization of 3 nonstructural *Plum pox potyvirus* proteins by immunogold labeling". *Virus Res.* 25(3): 201-211.
- Martín, M.T. y Gélie, B.** (1997). "Non-structural *plum pox potyvirus* proteins detected by immunogold labelling". *Eur J Plant Pathology* 103: 427-431.
- Maynard, J. A., Maassen, C. B., Leppla, S. H., Brasky, K., Patterson, J. L., Iverson, B. L., and Georgiou, G.** (2002). "Protection against anthrax toxin by recombinant antibody fragments correlates with antigen affinity". *Nat Biotechnol* 20(6), 597-601.
- Mazier, M., German-Retana, S., Flamain, F., Dubois, V., Botton, E., Sarnette, V., Le Gall, O., Candresse, T., y Maisonneuve, B.** (2004). "A simple and efficient method for testing *Lettuce mosaic virus* resistance in *in vitro* cultivated lettuce". *Journal of Virological Methods* 116(2), 123-131.
- Matthysse, A.G.** (1986). "Initial interactions of *Agrobacterium tumefaciens* with plant host cells". *Crit Rev Microbiol* 13(3), 281-307.
- McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. y Chiswell, D.J.** (1990). "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains". *Nature* 348(6301): 552-554.
- McCullagh, P. y Nelder, J.A.** (1989). "Generalized Linear Models". CRC, Boca Raton. Florida.
- Merits, A., Rajamaki, M.L., Lindholm, P., Runeberg-Roos, P., Kekarainen, T., Puustinen, P., Makelainen, K., Valkonen P. y Saarma, M.** (2002). "Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells". *J Gen Virol* 83 (5):1211-21.
- Meyers, A., Chakauya, E., Shephard, E., Tanzer, F.L., Maclean, J., Lynch, A., Williamson, A.L., y Rybicki, E.P.** (2008). "Expression of HIV-1 antigens in plants as potential subunit vaccines". *BMC Biotechnol* 8, 53.
- Miroshnichenko, S., Tripp, J., Nieden, U., Neumann, D., Conrad, U. y Manteuffel, R.** (2005). "Immunomodulation of function of small heat shock proteins prevents their

- assembly into heat stress granules and results in cell death at sublethal temperatures". *Plant J.* 41(2): 269-281.
- Mitter, N., Sulistyowati, E., Graham, M.W. y Dietzgen, R.G.** (2001). "Suppression of gene silencing: a threat to virus-resistant transgenic plants?". *Trends Plant Sci.* 6(6): 246-247.
- Moreno, A., Fereres, A. y Cambra, M.** (2009). "Quantitative estimation of *Plum pox virus* targets acquired and transmitted by a single *Myzus persicae*". *Arch Virol.* 154(9): 1391-1399.
- Mumford, R.A.** (2006). "Control and monitoring: control of *Plum pox virus* in the United Kingdom". *EPPO Bull.* 36: 315-318.
- Murashige, T. y Skoog, F.** (1962). "A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures". *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Myrta, A., Di Terlizzi, B., Savino, V. y Martelli, G.P.** (2006). "Control and monitoring: monitoring and eradication of sharka in south-east Italy over 15 years". *EPPO Bull.* 36: 309-311.
- Myrta, A., Varga, A., y James, D.** (2006). "The complete genome sequence of an El Amar isolate of *plum pox virus* (PPV) and its phylogenetic relationship to other PPV strains". *Arch Virol* 151(6), 1189-98.
- Navratil, M., Safarova, D., Karesova, R. y Petrzik, K.** (2005). "First incidence of *Plum pox virus* on apricot trees in China". *Plant Disease* 89(3): 338-338.
- Negrout, V., Eisner, G., Lee, H.I., Han, K.P., Taylor, D. y Wong, H.C.** (2005). "Highly efficient transient expression of functional recombinant antibodies in lettuce". *Plant Sci.* 169(2): 433-438.
- Nelson, R.S., Abel, P.P. y Beachy, R.N.** (1987). "Lesions and virus accumulation in inoculated transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of *Tobacco mosaic virus*". *Virology* 158(1): 126-132.
- Nelson, R.S., McCormick, S.M., Delannay, X., Dube, P., Layton, J., Anderson, E.J., Kaniewska, M., Proksch, R.K., Horsch, R.B., Rogers, S.G., Fraley, R.T. y Beachy, R.N.** (1988). "Virus tolerance, plant-growth, and field performance of transgenic tomato plants expressing coat protein from *Tobacco mosaic virus*". *Bio-Technology* 6(4): 403-409.
- Németh, M.** (1986). "Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees". Martinus-Nijhoff Publishers. Dordrecht, Holland.
- Nickel, H., Kawchuk, L., Twyman, R.M., Zimmermann, S., Junghans, H., Winter, S., Fischer, R. y Pruber, D.** (2008). "Plantibody-mediated inhibition of the *Potato leafroll virus* P1 protein reduces virus accumulation". *Virus Res.* 136(1-2): 140-145.
- Nissim, A., Hoogenboom, H.R., Tomlinson, I.M., Flynn, G., Midgley, C., Lane, D. y Winter, G.** (1994). "Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents". *EMBO J.* 13(3): 692-698.
- Nölke, G., Cobanov, P., Uhde-Holzem, K., Reustle, G., Fischer, R. y Schillberg, S.** (2009). "*Grapevine fanleaf virus* (GFLV)-specific antibodies confer GFLV and *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV) resistance in *Nicotiana benthamiana*". *Mol Plant Pathol.* 10(1): 41-49.

- Nölke, G., Fischer, R. y Schillberg, S.** (2003). "Production of therapeutic antibodies in plants". *Expert Opin Biol Ther.* 3(7): 1153-1162.
- Nölke, G., Fischer, R. y Schillberg, S.** (2006). "Antibody-based metabolic engineering in plants". *J Biotechnol.* 124(1): 271-283.
- Nölke, G., Schneider, B., Fischer, R. y Schillberg, S.** (2005). "Immunomodulation of polyamine biosynthesis in tobacco plants has a significant impact on polyamine levels and generates a dwarf phenotype". *Plant Biotechnol J.* 3(2): 237-247.
- Nuttall, J., Vine, N., Hadlington, J. L., Drake, P., Frigerio, L., y Ma, J. K.** (2002). "ER-resident chaperone interactions with recombinant antibodies in transgenic plants". *Eur J Biochem* 269(24), 6042-51.
- Ohlin, M. y Borrebaeck, C.A.** (1998). "Insertions and deletions in hypervariable loops of antibody heavy chains contribute to molecular diversity". *Mol Immunol.* 35(4): 233-238.
- Olmos, A., Bertolini, E., Gil, M. y Cambra, M.** (2005). "Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted *Plum pox virus* RNA targets in single aphids". *J Virol Methods* 128(1-2): 151-155.
- Oparka, K.J., Prior, D.A.M., SantaCruz, S., Padgett, H.S. y Beachy, R.N.** (1997). "Gating of epidermal plasmodesmata is restricted to the leading edge of expanding infection sites of *Tobacco mosaic virus* (TMV)". *Plant J.* 12(4): 781-789.
- Orlandi, R., Gussow, D.H., Jones, P.T. y Winter, G.** (1989). "Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction". *Proc Natl Acad Sci. USA* 86(10): 3833-3837.
- Orzáez, D., Mirabel, S., Wieland, W.H. y Granell, A.** (2006). "Agroinjection of tomato fruits. A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit". *Plant Physiol.* 140(1): 3-11.
- Owen, M., Gandecha, A., Cockburn, B. y Whitelam, G.** (1992). "Synthesis of a functional anti-phytochrome single-chain Fv protein in transgenic tobacco". *Biotechnology (NY)* 10(7): 790-794.
- Owens, R.J., Limn, C. y Roy, P.** (2004). "Role of an arbovirus nonstructural protein in cellular pathogenesis and virus release". *J Virol.* 78(12): 6649-6656.
- Pack, P. y Plückthun, A.** (1992). "Miniantibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric FV fragments with high avidity in *Escherichia coli*". *Biochemistry* 31(6): 1579-1584.
- Parks, T.D. y Dougherty, W.G.** (1991). "Substrate recognition by the N1a proteinase of two potyviruses involves multiple domains: characterization using genetically engineered hybrid proteinase molecules". *Virology* 182(1): 17-27.
- Parng, C.L., Hansal, S., Goldsby, R.A. y Osborne, B.A.** (1996). "Gene conversion contributes to Ig light chain diversity in cattle". *J Immunol.* 157(12): 5478-5486.
- Persson, M.A., Caothien, R.H. y Burton, D.R.** (1991). "Generation of diverse high-affinity human monoclonal antibodies by repertoire cloning". *Proc Natl Acad Sci. USA* 88(6): 2432-2436.
- Peschen, D., Li, H.P., Fischer, R., Kreuzaler, F. y Liao, Y.C.** (2004). "Fusion proteins comprising a *Fusarium*-specific antibody linked to antifungal peptides protect plants against a fungal pathogen". *Nat Biotechnol.* 22(6): 732-738.

- Philibert, P., Stoessel, A., Wang, W., Sibler, A.P., Bec, N., Larroque, C., Saven, J.G., Courtete, J., Weiss, E. y Martineau, P.** (2007). "A focused antibody library for selecting scFvs expressed at high levels in the cytoplasm". *BMC Biotechnol.* 7: 81.
- Polák, J.** (2006). "Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: woody species others than fruit and ornamental species of *Prunus*". *EPPO Bull.* 36: 225-226.
- Powell, P.A., Stark, D.M., Sanders, P.R. y Beachy, R.N.** (1989). "Protection against *Tobacco mosaic virus* in transgenic plants that express *Tobacco mosaic virus* antisense RNA". *Proc Natl Acad Sci. USA* 86(18): 6949-6952.
- Prins, M., Laimer, M., Noris, E., Schubert, J., Wassenegger, M. y Tepfer, M.** (2008). "Strategies for antiviral resistance in transgenic plants". *Mol Plant Pathol.* 9(1): 73-83.
- Prins, M., Lohuis, D., Schots, A. y Goldbach, R.** (2005). "Phage display-selected single-chain antibodies confer high levels of resistance against Tomato spotted wilt virus". *J Gen Virol.* 86(Pt 7): 2107-2113.
- Ramel, M.E., Gugerli, P. y Bünter, M.** (2006). "Control and monitoring: eradication of *Plum pox virus* in Switzerland". *EPPO Bull* 36: 312-314.
- Raghupathy, M.B., Griffiths, J. S., Stobbs, L.W., Brown, D.C., Brandle, J.E., y Wang, A.** (2006). "Transfection of Arabidopsis protoplasts with a *Plum pox virus* (PPV) infectious clone for studying early molecular events associated with PPV infection". *J Virol Methods* 136(1-2), 147-53.
- Ravelonandro, M., Monsion, M., Delbos, R. y Dunez, J.** (1993). "Variable resistance to *Plum pox virus* and potato virus Y infection in transgenic *nicotiana* plants expressing *Plum pox virus* coat protein". *Plant Sci.* 91(2): 157-169.
- Ravelonandro, M., Scorza, R., Bachelier, J.C., Labonne, G., Levy, L., Damsteegt, V., Callahan, A.M. y Dunez, J.** (1997). "Resistance of transgenic *Prunus domestica* to *Plum pox virus* infection". *Plant Disease* 81(11): 1231-1235.
- Ravelonandro, M., Scorza, R., Callahan, A., Levy, L., Jacquet, C., Monsion, M., y Damsteegt, V.** (2000). "The use of transgenic fruit trees as a resistance strategy for virus epidemics: the plum pox (sharka) model". *Virus Res* 71(1-2), 63-9.
- Regner, F., Machado, A.D., Machado, M.L.D., Steinkellner, H., Mattanovich, D., Hanzer, V., Weiss, H. y Katinger, H.** (1992). "Coat protein mediated resistance to *Plum pox virus* in *Nicotiana clevelandii* and *N. benthamiana*". *Plant Cell Rep.* 11(1): 30-33.
- Reiter, Y., Brinkmann, U., Jung, S.H., Pastan, I. y Lee, B.** (1995). "Disulfide stabilization of antibody Fv: computer predictions and experimental evaluation". *Protein Eng.* 8(12): 1323-1331.
- Revers, F., Le Gall, O., Candresse, T. y Maule, A.J.** (1999). "New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions". *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12(5): 367-376.
- Reynaud, C.A., Anquez, V., Grimal, H. y Weill, J.C.** (1987). "A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire". *Cell* 48(3): 379-388.
- Reynaud, C.A., García, C., Hein, W.R. y Weill, J.C.** (1995). "Hypermutation generating the sheep immunoglobulin repertoire is an antigen-independent process". *Cell* 80(1): 115-125.

- Roberts, I.M., Wang, D., Findlay, K. y Maule, A.J.** (1998). "Ultrastructural and temporal observations of the potyvirus cylindrical inclusions (CIs) show that the CI protein acts transiently in aiding virus movement". *Virology* 245(1): 173-181.
- Rodríguez, M., Ramírez, N.I., Ayala, M., Freyre, F., Perez, L., Triguero, A., Mateo, C., Selman-Housein, G., Gavilondo, J. V., y Pujol, M.** (2005). "Transient expression in tobacco leaves of an aglycosylated recombinant antibody against the epidermal growth factor receptor". *Biotechnol Bioeng* 89(2), 188-94.
- Rodríguez-Cerezo, E., Findlay, K., Shaw, J.G., Lomonossoff, G.P., Qiu, S.G., Linstead, P., Shanks, M. y Risco, C.** (1997). "The coat and cylindrical inclusion proteins of a potyvirus are associated with connections between plant cells". *Virology* 236(2): 296-306.
- Roy, A.S. y Smith, I.M.** (1994). "Plum pox situation in Europe". *EPPO Bull.* 24: 515-523.
- Ruiz-Ferrer, V., Boskovic, J., Alfonso, C., Rivas, G., Llorca, O., López-Abella, D. y López-Moya, J.J.** (2005). "Structural analysis of Tobacco etch potyvirus HC-pro oligomers involved in aphid transmission". *J Virol.* 79(6): 3758-3765.
- Safarnejad, M., Fischer, R. y Commandeur, U.** (2009). "Recombinant-antibody-mediated resistance against Tomato yellow leaf curl virus in *Nicotiana benthamiana*". *Arch Virol.* 154(3): 457-467.
- Sanford, J.C. y Johnston, S.A.** (1985). "The concept of parasite-derived resistance - Deriving resistance genes from the parasites own genome". *J Theor Biology* 113(2): 395-405.
- Santos, M.O., Crosby, W.L. y Winkel, B.S.J.** (2004). "Modulation of flavonoid metabolism in *Arabidopsis* using a phage-derived antibody". *Mol. Breeding* 13(4): 333-343.
- Savenkov, E.I. y Valkonen, J.P.** (2001). "Coat protein gene-mediated resistance to Potato virus A in transgenic plants is suppressed following infection with another potyvirus". *J Gen Virol.* 82(Pt 9): 2275-2278.
- Schaad, M.C., Haldeman-Cahill, R., Cronin, S. y Carrington, J.C.** (1996). "Analysis of the VPg-proteinase (N1a) encoded by Tobacco etch potyvirus: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification". *J Virol* 70(10): 7039-7048.
- Schaad, M.C., Jensen, P.E. y Carrington, J.C.** (1997). "Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein". *EMBO J.* 16(13): 4049-4059.
- Schillberg, S., Zimmermann, S., Findlay, K. y Fischer, R.** (2000). "Plasma membrane display of anti-viral single chain Fv fragments confers resistance to Tobacco mosaic virus". *Mol. Breeding* 6(3): 317-326.
- Schob, H., Kunz, C. y Meins, F., Jr.** (1997). "Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration: a simple, rapid method for investigating sequence requirements for gene silencing". *Mol Gen Genet* 256(5): 581-585.
- Scorza, R. y Ravelonandro, M.** (2006). "Control of Plum pox virus through the use of genetically modified plants". *EPPO Bull.* 36: 337-340.
- Serçe, C. U., Candresse, T., Svanella-Dumas, L., Krizbai, L., Gazel, M., y Caglayan, K.** (2009). "Further characterization of a new recombinant group of Plum pox virus isolates, PPV-T, found in orchards in the Ankara province of Turkey". *Virus Res* 142(1-2), 121-6.

- Sheets, M.D., Amersdorfer, P., Finnern, R., Sargent, P., Lindquist, E., Schier, R., Hemingsen, G., Wong, C., Gerhart, J.C. y Marks, J.D.** (1998). "Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens". *Proc Natl Acad Sci USA* 95(11): 6157-6162.
- Sheludko, Y.V.** (2008). "Agrobacterium-mediated transient expression as an approach to production of recombinant proteins in plants". *Recent Pat Biotechnol.* 2(3): 198-208.
- Sheludko, Y.V., Sindarovska, Y.R., Gerasymenko, I.M., Bannikova, M.A. y Kuchuk, N.V.** (2007). "Comparison of several Nicotiana species as hosts for high-scale Agrobacterium-mediated transient expression". *Biotechnol Bioeng.* 96(3): 608-614.
- Sheng, J. y Citovsky, V.** (1996). "Agrobacterium-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel". *Plant Cell* 8(10): 1699-1710.
- Shimada, N., Suzuki, Y., Nakajima, M., Conrad, U., Murofushi, N. y Yamaguchi, I.** (1999). "Expression of a functional single-chain antibody against GA24/19 in transgenic Tobacco". *Biosci Biotechnol Biochem.* 63(4): 779-783.
- Sibler, A. P., Nordhammer, A., Masson, M., Martineau, P., Trave, G., y Weiss, E.** (2003). "Nucleocytoplasmic shuttling of antigen in mammalian cells conferred by a soluble versus insoluble single-chain antibody fragment equipped with import/export signals". *Exp. Cell Res.* 286(2), 276-287.
- Smith, G.P.** (1985). "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface". *Science* 228(4705): 1315-1317.
- Söderlind, E., Carlsson, R., Borrebaeck, C.A. y Ohlin, M.** (2001). "The immune diversity in a test tube--non-immunised antibody libraries and functional variability in defined protein scaffolds". *Comb Chem High Throughput Screen* 4(5): 409-416.
- Söderlind, E., Strandberg, L., Jirholt, P., Kobayashi, N., Alexeiva, V., Aberg, A.M., Nilsson, A., Jansson, B., Ohlin, M., Wingren, C., Danielsson, L., Carlsson, R. y Borrebaeck, C.A.** (2000). "Recombining germline-derived CDR sequences for creating diverse single-framework antibody libraries". *Nat Biotechnol.* 18(8): 852-856.
- Song, G.Q. y Sink, K.C.** (2005). "Optimizing shoot regeneration and transient expression factors for Agrobacterium tumefaciens transformation of sour cherry (Prunus cerasus L.) cultivar Montmorency". *Scientia Horticulturae* 106(1): 60-69.
- Soriano, J.M., Vera-Ruiz, E.M., Vilanova, S., Martínez-Calvo, J., Llácer, G., Badenes, M.L. y Romero, C.** (2008). "Identification and mapping of a locus conferring Plum pox virus resistance in two apricot-improved linkage maps". *Tree Genetics & Genomes* 4(3): 391-402.
- Spassova, M.I., Prins, T.W., Folkertsma, R.T., Klein-Lankhorst, R.M., Hille, J., Goldbach, R.W. y Prins, M.** (2001). "The tomato gene Sw5 is a member of the coiled coil, nucleotide binding, leucine-rich repeat class of plant resistance genes and confers resistance to TSWV in Tobacco". *Mol. Breeding* 7(2): 151-161.
- Spiegel, S., Kovalenko, E.M., Varga, A. y James, D.** (2004). "Detection and partial molecular characterization of two Plum pox virus isolates from plum and wild apricot in southeast Kazakhstan". *Plant Disease* 88(9): 973-979.

- Stakmann, E.C. y Harrar, J.G.** (1957). "Principles of Plant Pathology". Ronald Press. New York.
- Tavert-Roudet, G., Ravelonandro, M., Bachelier, J. C., y Dúnez, J.** (1998). "Transgenic *Nicotiana benthamiana* plants containing the P1 gene of *plum pox virus* are resistant to virus challenge". *Eur J of Plant Pathol.* 104(1), 103-107.
- Tavladoraki, P., Benvenuto, E., Trinca, S., De Martinis, D., Cattaneo, A. y Galeffi, P.** (1993). "Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack". *Nature* 366(6454): 469-472.
- Tavladoraki, P., Girotti, A., Donini, M., Arias, F.J., Mancini, C., Morea, V., Chiaraluce, R., Consalvi, V. y Benvenuto, E.** (1999). "A single-chain antibody fragment is functionally expressed in the cytoplasm of both *Escherichia coli* and transgenic plants". *Eur J Biochem.* 262(2): 617-624.
- Tenllado, F., Martínez-García, B., Vargas, M. y Díaz-Ruiz, J.R.** (2003). "Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections". *BMC Biotechnol.* 3: 3.
- Terrada, E., Kerschbaumer, R.J., Giunta, G., Galeffi, P., Himmler, G. y Cambra, M.** (2000). "Fully recombinant enzyme-linked immunosorbent assays" using genetically engineered single-chain antibody fusion proteins for detection of Citrus tristeza virus". *Phytopathology* 90(12): 1337-1344.
- Tewari, D., Notkins, A. L., y Zhou, P.** (2003). "Inhibition of HIV-1 replication in primary human T cells transduced with an intracellular anti-HIV-1 P17 antibody gene". *Journal of Gene Medicine* 5(3), 182-189.
- Thompson, D.** (2006). "Control and monitoring: control strategies for *Plum pox virus* in Canada". *EPPO Bull.* 36: 302-304.
- Thompson, D., McCann, M., McLeod, M., Lue, D., Green, M. y James, D.** (2001). "First report of *Plum pox virus* in Canada". *Plant Disease* 85: 97.
- Tonegawa, S.** (1983). "Somatic generation of antibody diversity". *Nature* 302(5909): 575-581.
- Truve, E., Aaspollu, A., Honkanen, J., Puska, R., Mehto, M., Hassi, A., Terri, T.H., Kelve, M., Seppanen, P. y Saarma, M.** (1993). "Transgenic potato plants expressing mammalian 2'-5' oligoadenylate synthetase are protected from potato virus-x infection under field conditions". *Bio-Technology* 11(9): 1048-1052.
- Van Damme, E.J.M., Hao, Q., Chen, Y., Barre, A., Vandenbussche, F., Desmyter, S., Rouge, P. y Peumans, W.J.** (2001). "Ribosome-inactivating proteins: A family of plant proteins that do more than inactivate ribosomes". *Crit Rev Plant Sci.* 20(5): 395-465.
- Van Dijk, A.A., Makeyev, E.V., y Bamford, D.H.** (2004). "Initiation of viral RNA-dependent RNA polymerization". *J Gen Virol* 85(5), 1077-93.
- Van Oosten, H.J. y Van Bakel, C.H.J.** (1970). "Inclusion bodies in plants infected with sharka (plum pox) virus". *Netherland Journal of Plant Pathology* 76: 313-319.
- Vaquero, C., Sack, M., Chandler, J., Drossard, J., Schuster, F., Monecke, M., Schillberg, S. y Fischer, R.** (1999). "Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in *Tobacco* leaves". *Proc Natl Acad Sci. USA* 96(20): 11128-11133.

- Varrelmann, M., Maiss, E., Pilot, R. y Palkovics, L.** (2007). "Use of pentapeptide-insertion scanning mutagenesis for functional mapping of the *Plum pox virus* helper component proteinase suppressor of gene silencing". *J Gen Virol.* 88(3): 1005-1015.
- Vaughan, T. J., Williams, A. J., Pritchard, K., Osbourn, J. K., Pope, A. R., Earnshaw, J. C., McCafferty, J., Hodits, R. A., Wilton, J., Johnson, K. S.** (1996). "Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library". *Nat Biotechnol* 14(3): 309-314.
- Vaughan, T.J., Osbourn, J.K. y Tempest, P.R.** (1998). "Human antibodies by design". *Nat Biotechnol.* 16(6): 535-539.
- Vihinen-Ranta, M., Yuan, W. y Parrish, C.R.** (2000). "Cytoplasmic trafficking of the canine parvovirus capsid and its role in infection and nuclear transport". *J Virol.* 74(10): 4853-4859.
- Vilanova, S., Romero, C., Abbott, A. G., Llácer, G., y Badenes, M. L.** (2003). "An apricot (*Prunus armeniaca* L.) F2 progeny linkage map based on SSR and AFLP markers, mapping *plum pox virus resistance* and self-incompatibility traits". *Theor Appl Genet* 107(2), 239-47.
- Villani, M.E., Di Carli, M., Donini, M., Traversini, G., Lico, C., Franconi, R., Benvenuto, E. y Desiderio, A.** (2008). "Validation of a stable recombinant antibodies repertoire for the direct selection of functional intracellular reagents". *J Immunol Methods* 329(1-2): 11-20.
- Villani, M.E., Roggerio, P., Bitti, O., Benvenuto, E. y Franconi, R.** (2005). "Immunomodulation of cucumber mosaic virus infection by intrabodies selected in vitro from a stable single-framework phage display library". *Plant Mol Biol.* 58(3): 305-316.
- Virsecq Marn, M., Mavric, I., Urbancic-Zemljic, M. y Skerlavaj, V.** (2004). "Detection of Plum pox potyvirus in weeds". *Acta horticulturae* 657: 251-254.
- Voinnet, O.** (2001). "RNA silencing as a plant immune system against viruses". *Trends Genet.* 17(8): 449-459.
- Voinnet, O.** (2005). "Induction and suppression of RNA silencing: Insights from viral infections". *Nature Rev Gen.* 6(3): 206-U201.
- Voinnet, O., Lederer, C. y Baulcombe, D.C.** (2000). "A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*". *Cell* 103(1): 157-167.
- Völkel, T., Korn, T., Bach, M., Müller, R., R E Kontermann, R.E.** (2001). "Optimized linker sequences for the expression of monomeric and dimeric bispecific single-chain diabodies". *Protein Eng.* 14 (10): 815-23.
- Voss, A., Niersbach, M., Hain, R., Hirsch, H.J., Liao, Y.C., Kreuzaler, F. y Fischer, R.** (1995). "Reduced virus infectivity in *Nicotiana tabacum* secreting a TMV-specific full-size antibody". *Mol. Breeding* 1(1): 39-50.
- Walter, G., Tomlinson, I.M., Dear, P.H., Sonnhammer, E.L., Cook, G.P. y Winter, G.** (1995). "Comparison of the human germline and rearranged VH repertoire reveals complementarity between germline variability and somatic mutation". *Ann N Y Acad Sci.* 764: 180-182.

- Wang, P.G., Zoubenko, O. y Tumer, N.E.** (1998). "Reduced toxicity and broad spectrum resistance to viral and fungal infection in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein II". *Plant Mol Biol.* 38(6): 957-964.
- Wang, R.Y., Powell, G., Hardie, J. y Pirone, T.P.** (1998). "Role of the helper component in vector-specific transmission of potyviruses". *J Gen Virol* 79 (Pt 6): 1519-1524.
- Ward, D.V., Zupan, J.R., y Zambryski, P.C.** (2002). "Agrobacterium VirE2 gets the VIP1 treatment in plant nuclear import". *Trends Plant Sci* 7(1), 1-3.
- Waterhouse, P.M. y Fusaro, A.F.** (2006). "Viruses face a double defense by plant small RNAs". *Science* 313(5783): 54-55.
- Wen, R., Zhang, S.C., Michaud, D. y Sanfacon, H.** (2004). "Inhibitory effects of cystatins on proteolytic activities of the Plum pox potyvirus cysteine proteinases". *Virus Res* 105(2): 175-182.
- Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M. y Dunez, J.** (1991). "A polymerase chain-reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection". *J. Virol Methods* 33(3): 355-365.
- Whitham, S., McCormick, S. y Baker, B.** (1996). "The N gene of Tobacco confers resistance to Tobacco mosaic virus in transgenic tomato". *Proc Natl Acad Sci. USA* 93(16): 8776-8781.
- Wilson, P.C., de Bouteiller, O., Liu, Y.J., Potter, K., Banchereau, J., Capra, J.D. y Pascual, V.** (1998). "Somatic hypermutation introduces insertions and deletions into immunoglobulin V genes". *J Exp Med.* 187(1): 59-70.
- Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E. y Hoogenboom, H.R.** (1994). "Making antibodies by phage display technology". *Annu Rev Immunol.* 12: 433-455.
- Wittner, A., Palkovics, L., y Balazs, E.** (1998). "Nicotiana benthamiana plants transformed with the plum pox virus helicase gene are resistant to virus infection". *Virus Res* 53(1), 97-103.
- Wroblewski, T., Tomczak, A. y Michelmore, R.** (2005). "Optimization of Agrobacterium-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and Arabidopsis". *Plant Biotechnol J.* 3(2): 259-273.
- Wydro, M., Kozubek, E. y Lehmann, P.** (2006). "Optimization of transient Agrobacterium-mediated gene expression system in leaves of Nicotiana benthamiana". *Acta Biochimica Polonica* 53(2): 289-298.
- Xiao, X.W., Chu, P.W.G., Frenkel, M.J., Tabe, L.M., Shukla, D.D., Hanna, P.J., Higgins, T.J.V., Muller, W.J. y Ward, C.W.** (2000). "Antibody-mediated improved resistance to CIYVV and PVY infections in transgenic tobacco plants expressing a single-chain variable region antibody". *Mol Breeding* 6(4): 421-431.
- Zaitlin, M. y Palukaitis, P.** (2000). "Advances in understanding plant viruses and virus diseases". *Annu Rev Phytopathol.* 38: 117-143.
- Zhang, M.Y., Zimmermann, S., Fischer, R. y Schillberg, S.** (2008). "Generation and evaluation of movement protein-specific single-chain antibodies for delaying symptoms of Tomato spotted wilt virus infection in tobacco". *Plant Pathol.* 57(5): 854-860.
- Zhang, S.C., Tian, L.M., Svircev, A., Brown, D.C.W., Sibbald, S., Schneider, K.E., Barszcz, E.S., Malutan, T., Wen, R. y Sanfacon, H.** (2006). "Engineering

- resistance to *Plum pox virus* (PPV) through the expression of PPV-specific hairpin RNAs in transgenic plants". *Can J Plant Pathol.* 28(2): 263-270.
- Zimmermann, S., Schillberg, S., Liao, Y.-C. y Fisher, R.** (1998a). "Intracellular expression of TMV-specific single-chain Fv fragments leads to improved virus resistance in *Nicotiana tabacum*". *Mol Breeding* 4(369): 379.
- Zimmermann, S., Schillberg, S., Liao, Y.C. y Fisher, R.** (1998b). "Intracellular expression of TMV-specific single-chain Fv fragments leads to improved virus resistance in *Nicotiana tabacum*". *Mol Breeding* 4(4): 369-379.
- Zottini, M., Barizza, E., Costa, A., Formentin, E., Ruberti, C., Carimi, F. y Lo Schiavo, F.** (2008). "Agroinfiltration of grapevine leaves for fast transient assays of gene expression and for long-term production of stable transformed cells". *Plant Cell Rep.* 27(5): 845-853.
- Zoubenko, O., Hudak, K. y Tumer, N.E.** (2000). "A non-toxic pokeweed antiviral protein mutant inhibits pathogen infection via a novel salicylic acid-independent pathway". *Plant Mol Biol.* 44(2): 219-229.
- Zupan, J.R., Citovsky, V., y Zambryski, P.** (1996). "Agrobacterium VirE2 protein mediates nuclear uptake of single-stranded DNA in plant cells". *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(6), 2392-7.
- Zupan, J., Muth, T.R., Draper, O. y Zambryski, P.** (2000). "The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights". *Plant J.* 23(1): 11-28.