

## ÍNDICE GENERAL

Resumen	7
Resum	9
Summary	11
Abreviaturas	13
Virus citados	15
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>19</b>
<b>1. Anticuerpos recombinantes y sus aplicaciones</b>	<b>20</b>
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
<b>2. La enfermedad de la sharka y el <i>Plum pox virus</i></b>	<b>33</b>
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
<b>3. Estrategias de control de las enfermedades virales</b>	<b>40</b>
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

<b>OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN</b>	49
----------------------------------	----

## **CAPÍTULO 1**

<b>“Obtención de plantas transgénicas estables de <i>Nicotiana benthamiana</i> que expresan fragmentos scFv específicos de Nib replicasa de <i>Plum pox virus</i>”</b>	51
--	----

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	53
------------------------	----

<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	56
------------------------------	----

<b>2.1. Transformación genética y regeneración de plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i></b>	56
---	----

<b>2.2. Análisis de las plantas transgénicas</b>	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
--	----

<b>3.1. Transformación genética de plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> y análisis de las plantas transgénicas</b>	60
---	----

<b>3.2. Expresión de diferentes versiones del fragmento scFv2A en plantas transgénicas</b>	61
--	----

## **CAPÍTULO 2**

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

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	71
------------------------	----

<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	72
------------------------------	----

<b>2.1. Preparación del extracto viral estándar de PPV y estimación del número de copias del genoma viral</b>	72
---	----

<b>2.2. Desafío por inoculación mecánica de PPV</b>	73
---	----

<b>2.3. Desafío por inoculación con PPV-GFP</b>	73
---	----

<b>2.4. Evaluación de la infección viral</b>	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
<b>2.5. Análisis estadístico</b>	75
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	77
<b>3.1. Ensayo de protección frente a PPV mediante desafío por inoculación mecánica</b>	77
<b>3.2. Ensayo de protección frente a PPV mediante desafío por inoculación con PPV-GFP</b>	81

### **CAPÍTULO 3**

<b>“Expresión transitoria de fragmentos scFv2A en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>. Evaluación de su capacidad para interferir con la infección viral”</b>	91
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	93
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	96
<b>2.1. Material vegetal y plásmidos utilizados.</b>	96
<b>2.2. Expresión transitoria de fragmentos scFv2A</b>	96
2.2.1. Método de agroinfiltración	96
2.2.2 Análisis “western blot”	97
2.2.3.ELISA-indirecto	97
<b>2.3. Ensayos de interferencia con la infección viral</b>	98
2.3.1. Método de inoculación viral	98
2.3.2. ELISA-DASI	98
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	99
<b>3.1. Evaluación de la acumulación de los fragmentos scFv2A, NLSscFv2A y 6K2scFv2A en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i></b>	99
<b>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</b>	102

### **CAPÍTULO 4**

<b>“Expresión transitoria conjunta de fragmentos scFv2A y PPV-GFP en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>”</b>	109
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	111
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	113

<b>2.1. Material vegetal y plásmidos utilizados</b>	113
<b>2.2. Método de agroinfiltración/agroinoculación</b>	113
<b>2.3. Evaluación de la infección viral</b>	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
<b>2.4. Análisis estadístico</b>	115
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	115
<b>3.1. Evolución de la infección viral en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> por agroinfiltración con pBI-PPV-GFP</b>	115
<b>3.2. Efecto de la expresión estable de fragmentos scFv2A, NLSscFv2A o 6K2scFv2A en la evolución de la infección por PPV-GFP</b>	118
<b>3.3. Efecto de la expresión transitoria de fragmentos scFv2A, NLSscFv2A o 6K2scFv2A en la evolución de la infección por PPV-GFP</b>	123
<b>3.4. Efecto de la expresión conjunta de diferentes fragmentos scFv en la evolución de la infección por PPV-GFP</b>	127
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	137
<b>CONCLUSIONES</b>	147
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	149