



Desarrollo de virus recombinantes para inducir la acumulación de carotenoides en tejidos comestibles

Trabajo fin de Máster Universitario en Biología Molecular y Celular de
Plantas

Miguel Ezquerro Urzanqui

Director:

José Antonio Daròs Arnau

Tutora:

María Purificación Lisón Párraga

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas

Universitat Politècnica de València

Curso 2016/2017

Índice

1. Resumen/Abstract	1/2
2. Introducción	3
2.1. Prolegómeno histórico	3
2.2 Las plantas como biofactorías.....	4
2.3.Transformación genética transitoria.....	6
2.4. Expresión transitoria con vectores virales	6
2.5. Movilización de los vectores virales.....	9
2.6. Virus del mosaico del nabo (TuMV)	9
2.7. Morfología, composición e idoneidad del TuMV.....	10
2.8. Movimiento e infectividad del TuMV.....	11
2.9. Carotenoides: que son y para que sirven.....	12
2.10. Carotenoides en las plantas	13
3. Objetivos	16
4. Materiales y métodos	17
4.1. Transformación de bacterias por electroporación	17
4.2. Picado de colonias y purificación de plásmidos.....	17
4.3. Fosforilación de secuencias de DNA en 5'	18
4.4. Amplificación de DNA mediante PCR.....	18
4.5. Electroforesis en gel de agarosa	19
4.6. Manipulación y ligación de plásmidos	19
4.7. Elución de ácidos nucleicos de geles de agarosa	20
4.8. Purificación de ácidos nucleicos de una solución	21
4.9. Agroinoculación de plantas.....	21
4.10. Infección mecánica de plantas comestibles	22

4.11. Purificación de RNA de plantas infectadas	23
4.12. Retrotranscripción de RNA y amplificación de cDNA por PCR	23
4.13. Cuidados de las plantas en el invernadero	24
4.14. Secuenciación de DNA y análisis computacional de secuencias	24
5. Resultados y discusión	26
5.1. Construcción del vector viral TuMV-JPN1-crtB.	26
5.2. Construcción del vector viral TuMV-UK1-crtB.	28
5.3. Infección de plantas de <i>Nicotiana benthamina</i>	31
5.4. Confirmación de la infección por RT-PCR	35
5.5. Infección de plantas de interés agronómico.	36
5.6. Optimización de los vectores virales.	40
5.7. Perspectivas futuras.	41
6. Conclusiones	43
7. Bibliografía	44

Agradecimientos

A José Antonio, por invitarme a formar parte de su laboratorio, por sus consejos y su paciencia corrigiendo y mejorando esta memoria.

A mis compañeros de laboratorio, en especial a Verónica, Teresa y Mares por toda la ayuda durante el trabajo experimental y sus conversaciones en las horas muertas.

A familia, compañeros de piso y amigos sin los que hubiera sido imposible llegar hasta aquí.

1. Resumen

Los virus que infectan plantas son agentes patógenos que en general provocan graves pérdidas en muchos cultivos agrícolas. Sin embargo, algunos virus se pueden domesticar y convertir en herramientas biotecnológicas capaces de inducir la producción de compuestos de interés en plantas biofactoría, una actividad denominada “molecular farming”. Investigaciones previas han mostrado que la expresión de la fitoeno sintasa (*crtB*), una enzima clave en la ruta de biosíntesis de los carotenoides de la bacteria del suelo *Pantoea ananatis*, mediante vectores virales derivados del virus del grabado del tabaco (TEV), el virus X de la patata (PVX) o el virus del mosaico del tabaco (TMV) induce la acumulación de carotenoides en el tejido infectado hasta el punto que éste se vuelve amarillo. Mediante análisis cromatográfico se demostró que este color se debe, fundamentalmente, a una disminución en el nivel de acumulación de las clorofilas y un aumento de carotenoides como la luteína y el beta-caroteno, que son compuestos de gran interés desde el punto de vista nutricional y farmacológico.

El objetivo de este proyecto ha sido analizar si la expresión de *crtB* de *P. ananatis* mediante vectores virales derivados de dos aislados del virus del mosaico del nabo (TuMV; género *Potyvirus*, familia *Potyviridae*) en tejidos foliares de plantas comestibles también induce la acumulación de carotenoides de interés nutricional. La razón de usar el TuMV como vector es que tiene una gama de huéspedes muy amplia. Además, se disponía de dos aislados diferentes del virus, UK1 y JPN1, que se caracterizan por producir síntomas agresivos y suaves, respectivamente. En este contexto, se inocularon plantas de *Nicotiana benthamiana* con clones de ambos aislados virales que expresaban *crtB*. Se obtuvo una producción visible de carotenoides con el TuMVJPN1-*crtB*, mientras que con el TuMVUK1-*crtB* la muerte de las plantas era demasiado rápida. Por el contrario, en la inoculación posterior de plantas comestibles con el aislado TuMUK1-*crtB* se obtuvo pigmentación amarilla en plantas como la rúcula o la espinaca, mientras que el aislado TuMVJPN1-*crtB* demostró ser demasiado débil para producir pigmentación alguna.

Palabras clave: vectores virales, virus del mosaico del nabo, carotenoides, molecular farming.

Abstract

Plant viruses are pathogenic agents able to produce important economic loss in many crops. However, some can be domesticated to become biotechnological tools that can induce the production of interesting compounds in biofactory plants. This activity is named “molecular farming”. Previous research showed that the expression of phytoene synthase (*crtB*), a key enzyme of carotenoid biosynthesis in the soil bacterium *Pantoea ananatis*, in some viral vectors derived from tobacco etch virus (TEV), potato virus X (PVX) or tobacco mosaic virus (TMV) induces the accumulation of carotenoids in the infected tissues turning its color into yellow. Chromatographic analysis demonstrated that this color is mainly due to a decrease in chlorophyll level and an increase in carotenoids such as lutein and β -carotene, both compounds with great nutritional and pharmacological interest.

The aim of this project has been to analyze if expression of *P. ananatis crtB* by means of viral vectors derived from two different isolates of turnip mosaic virus (TuMV; genus *Potyvirus*, family *Potyviridae*) in leaf tissues of edible plants also induces the accumulation of nutritional carotenoids. The reason to use TuMV as a vector is the broad host range. In addition, two different TuMV isolates, UK1 and JPN1 that produce aggressive and mild symptoms respectively, were available. In his context, *Nicotiana benthamiana* plants were inoculated with clones of both viral isolates that expressed *crtB*. While a visible carotenoid production was obtained with TuMVJPN1-*crtB*, TuMVUK1-*crtB* quickly killed the plants. On the contrary, when edible plants were inoculated with TuMVUK1-*crtB*, yellow pigmentation was obtained in plants such as rocket salad or spinach. However, TuMVJPN1-*crtB* isolate showed to be too weak to induce yellow pigmentation in these plants.

Key words: viral vectors, turnip mosaic virus, carotenoids, molecular pharming.

2. Introducción

2.1. Prolegómeno histórico

La obtención de productos de valor nutricional provenientes de las plantas tiene su origen en el mismo desarrollo de la especie humana. Los primeros homínidos recolectaban fruta, hojas y frutos secos como alimento de forma análoga a como lo hacen muchos animales. Con el desarrollo de un cerebro complejo, esta tarea se ha ido modificando y ganando en complejidad. Uno de los pasos más importantes en esta evolución fue el desarrollo de la agricultura con el único objetivo de conseguir ese alimento de forma más rápida y sencilla. De la mano de esta agricultura comienza la modificación genética de plantas. Si bien de forma muy rudimentaria, los humanos han modificado las especies cultivadas para su propio beneficio. De forma sencilla, siguiendo criterios puramente productivos, organolépticos y de adaptación a los nuevos terrenos desde hace 10000 años, los seres humanos han transformado especies y variedades.

En la actualidad, con la implantación del método científico y el conocimiento de las bases moleculares de las modificaciones vegetales, la tarea se ha facilitado. La evolución que se ha conseguido en maquinaria y conocimiento permiten una agricultura extensiva y que por el momento es capaz de satisfacer las necesidades nutricionales de todo el mundo, a pesar de que el reparto de ésta no sea equitativo.

Debido a esta pequeña victoria, los científicos se han centrado en nuevos retos, la síntesis de productos de alto valor añadido, que no tienen por qué tener tan solo interés nutricional. Este desafío se denomina “molecular farming”, y consiste en la producción de cualquier metabolito de interés, en un organismo vivo o en una parte derivada de él, modificando para ello (o creando) rutas metabólicas en el mismo, de forma ortogonal. Es decir tratando de interferir lo menos posible en las funciones celulares vitales del sistema elegido.

En los primeros intentos de esta nueva pretensión, se modificaron genéticamente organismos sencillos, tales como bacterias y levaduras, y de hecho se siguen utilizando pues presentan una serie de ventajas respecto a organismos eucariotas superiores. Por ejemplo, *Escherichia coli* es la bacteria más utilizada para producción a escala industrial gracias a su alta capacidad de división y a su sencilla manipulación genética. En cuanto a las levaduras destacan *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*, ésta última gracias a que puede utilizar el metanol como fuente de carbono, algo que es prácticamente único en el reino de los hongos. Además, ambas especies se dividen bastante rápido, tienen gran capacidad para la recombinación homóloga, lo que facilita la modificación genética dirigida y son reconocidas como “GRAS” (seguras) por la FDA (Food and Drug Administration) estadounidense.

Sin embargo, estos organismos, más sencillos evolutivamente, presentan una serie de problemas a veces insalvables a la hora de producir masivamente metabolitos para consumo animal o humano (Merlin et al., 2014). Estos problemas pueden ser la ausencia de patrones de glicosilación en el caso de bacterias, así como la imposibilidad de solubilizar ciertas proteínas, acumulándose masivamente en forma de cuerpos de inclusión y de forma que se impide la recolección. En el caso de las levaduras a pesar de que presentan sistemas de glicosilación estos son sencillos y difieren bastante de los vertebrados superiores y las plantas (Anyago et al., 2015). A pesar de que existen otros sistemas, tales como los cultivos de células de mamíferos o el uso de células animales infectadas por virus, el presente trabajo de fin de máster se centra en el uso de las plantas como biofactorías, con todas sus ventajas e inconvenientes.

2.2. Las plantas como biofactorías

En primer lugar, hay que destacar que las plantas han desarrollado una eficiencia máxima en el proceso de fotosíntesis. Este proceso, tiene su origen con las cianobacterias, de origen acuático. En el ambiente marino en que la fotosíntesis se desarrolló, el CO₂ y los fotones disponibles para realizar este proceso son más escasos que en tierra firme. De forma que, cuando las plantas colonizaron la tierra se encontraron con un excedente de ambos y por tanto comenzaron a producir carbono reducido de manera masiva, consiguiendo así una enorme adaptabilidad y colonizando toda la tierra (Thomas et al., 2001). Al tener asegurada su fuente de carbono, fueron desarrollando en gran manera su metabolismo secundario, hasta hacerlo variadísimo y extremadamente complejo. Por este hecho, se utilizan para la agricultura, porque el ser humano usa ese carbono excedente para su propia nutrición. Y a su vez, están intrínsecamente favorecidas tanto por ese carbono como por esa riqueza metabólica para ser utilizadas como biofactorías prácticamente de forma ilimitada. Además de esta ventaja, que sin duda es su característica más destacada, muchas de las plantas son comestibles, y por tanto bioseguras, y poseen patrones de glicosilación muy similares a los mamíferos.

El primer ejemplo de una planta como biofactoría, se desarrolló a finales del siglo XX con la síntesis de anticuerpo humanos en plantas de tabaco (During, 1988), y a partir de ahí existen numerosísimos ejemplos como la tripsina, primera proteína recombinante con fines comerciales que fue producida en plantas de maíz (Hood et al., 1997) o la primera ruta metabólica completa introducida de forma exitosa en este caso en tabaco (Poirier et al., 1992) para conseguir la síntesis de polihidroxicanoato o PHA.

Las plantas pueden ser ingenierizadas para producir de forma sostenible compuestos de interés nutricional, industrial y farmacéutico. Sin embargo, al poseer un metabolismo secundario tan rico, que por un lado es ventajoso, ya que multitud de enzimas están presentes, es también un desafío conseguir una regulación precisa y

ortogonal de las nuevas rutas creadas, sin provocar cambios negativos en el metabolismo primario de las mismas. Para la producción de moléculas de interés en plantas existen dos posibilidades de modificación: la transformación estable con *Agrobacterium tumefaciens* o por la técnica biolística y la expresión transitoria, es decir la expresión de una o varias proteínas un tiempo determinado, el necesario para conseguir el metabolito de interés sin modificar el DNA nuclear de la especie vegetal. Esto último se consigue mediante el uso de la agroinfiltración o vectores virales.

Respecto a la transformación estable, consiste en utilizar el método de *A. tumefaciens*, es decir utilizar la capacidad natural que tienen estas bacterias para introducir DNA en el genoma vegetal, para lo que se sustituye en el plásmido Ti, parte del T-DNA por un gen de interés (Fraley et al., 1983). Se consigue así la integración del material exógeno en el genoma vegetal y una vez sea transcrito y traducido se producirá la proteína de interés (figura 1). El método alternativo es utilizar la biolística, es decir utilizar micropartículas de oro o tungsteno recubiertas del DNA de interés con las que se bombardea el tejido vegetal (Sanford et al., 1987). Con este último método se puede conseguir una transformación estable tanto en el genoma nuclear como en el genoma plastidial. En caso de integración en el genoma plastidial, esto implica que los genes no sean transmisibles por parte del parental masculino, además de que el gran número de plastos presentes en cada célula vegetal permite una producción mayor con respecto a las transformaciones estables nucleares (Bock., 2014) y se evitan además los fenómenos de silenciamiento génico (Venkatesh et al., 2012).

El inconveniente es que el número de genes que se pueden introducir establemente está limitado por el tamaño de los vectores y en general la transformación es más estable cuanto menor sea el número de genes introducidos.

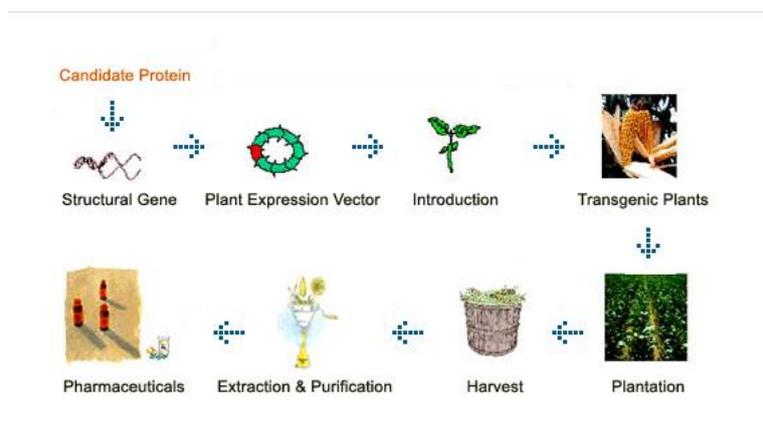


Figura 1: Esquema sencillo de los pasos necesarios para el uso de una planta transgénica como biofactoría hasta obtener el producto de interés. Fuente: www.nexgenbiotech.com.

Consecuentemente, la transformación estable no parece una vía demasiado acertada para el desarrollo de la ingeniería metabólica. Aunque la generación de líneas transgénicas estables, fue el comienzo de este nuevo campo de conocimiento (Obembe et al., 2011).

El proceso de transformación estable, además de la limitación en la transferencia de genes, es complejo metodológicamente. Además del propio protocolo de transformación, se necesitan métodos eficaces de selección de los tejidos transformados e igual de importante, procesos eficaces de regeneración de plantas a partir del material transformado. Estos dos últimos factores, son los principales limitantes de estas técnicas ya que consumen gran cantidad de tiempo y recursos y en muchas ocasiones no existen métodos puestos a punto para especies de interés agronómico (Motte et al., 2014).

Es por ello que nuevas aproximaciones en la ingeniería metabólica de plantas están en desarrollo. El objetivo de las mismas es superar las limitaciones actuales tanto a nivel metodológico, como a reducir el coste temporal de los protocolos, además de permitir la transferencia de rutas metabólicas completas mejorando los rendimientos. Estos nuevos métodos también buscan reducir la complejidad de la extracción y purificación del producto, ya que este es un proceso clave que abarca la mayor parte del coste total.

2.3. Transformación genética transitoria

Para expresar transitoriamente un producto en plantas se puede utilizar la agroinfiltración con vectores basados en *A. tumefaciens*. Se introduce ésta en un tejido donde el material movilizado sea capaz de actuar como una molécula transcripcionalmente activa sin necesidad de ser integrada. La eficiencia del proceso depende del órgano de la planta a utilizar y su estado ontogénico, siendo las hojas jóvenes el tejido más idóneo. Una vez pasan 2-4 días en los que hay un pico en la expresión del transgén de interés, comienza un descenso debido a la degradación de las copias de DNA exógeno (Lacroix y Citovsky, 2013). La agroinfiltración se puede realizar por inmersión (sumergiendo las plantas en una solución con *A. tumefaciens*) aunque la técnica más utilizada es la inyección directa en tejido. Esta última se trata de una técnica simple y barata, que no requiere de medios especializados, pero que no es efectiva a la hora de infectar gran cantidad de plantas.

2.4. Expresión transitoria con vectores virales

Sin embargo, como elección para el presente trabajo fin de máster, se utilizaron los vectores virales como alternativa a la transformación estable tradicional. Los sistemas virales vegetales, en su mayoría de RNA, permiten la expresión heteróloga de varios genes. Es por esta razón que son muy adecuados para el desarrollo de la ingeniería

metabólica en plantas, en la que ya no solo se trata de introducir un transgén, sino de varios, o de modificar rutas metabólicas completas con las que moldear el comportamiento de las células vegetales. Con los vectores virales se consigue una expresión transitoria, en la que los genes de interés no son integrados en el genoma nuclear y la producción del compuesto de interés está restringida a un periodo corto de tiempo (Obembe et al., 2011). Además, a diferencia de los casos anteriores, el producto de interés se puede acumular en los espacios intersticiales, lo que facilita en gran medida la extracción posterior (Horn et al., 2004). Estos sistemas utilizan la gran capacidad replicativa que poseen los virus vegetales para producir proteínas (y metabolitos) en grandes cantidades (Rybicki, 2010). Sus principales ventajas son su alto rendimiento y la posibilidad de usar vectores multigénicos. Sin embargo, estos sistemas presentan una serie de inconvenientes generales de difícil solución, como son la complejidad para el escalado y la necesidad de que el metabolito producido sea procesado inmediatamente, ya que en ciertas ocasiones el almacenaje en grandes cantidades en la planta de ciertos xenobióticos con los que esta no ha tenido nunca contacto, pueden alterar su homeostasis y consecuentemente dañar sus tejidos. Existen otra serie de inconvenientes que si presentan solución, pero condicionan la elección de un tipo de vector viral u otro. Por ejemplo, uno de esos problemas es el límite en el tamaño del gen o genes que se puede introducir en un virus. Otro problema, derivado de estos vectores es que aunque se pueden producir varias proteínas simultáneamente, no se trata de un proceso ilimitado. Esto se debe, al efecto denominado como exclusión viral, que explicado brevemente consiste en que una célula ya infectada previamente con un vector viral, no puede ser infectada por un nuevo clon similar. De forma, que para introducir una ruta metabólica no se puede usar como base una única especie viral, cada clon con una proteína diferente, lo que limita en cierta forma la versatilidad del método. No se sabe el mecanismo molecular que hay detrás de este fenómeno, y la única forma de saltar este control es utilizar virus no competitivos, alejados filogenéticamente, con las diferentes construcciones de forma simultánea.

Por último, otro de los problemas que plantean los virus es la bioseguridad. A pesar de que los virus vegetales son inocuos para el ser humano la posibilidad de que los virus modificados infecten especies vegetales susceptibles cercanas filogenéticamente y geográficamente existe. Para evitar esta serie de problemas derivados de los vectores virales se utilizan diferentes estrategias de modificación del genoma viral (figura 2).

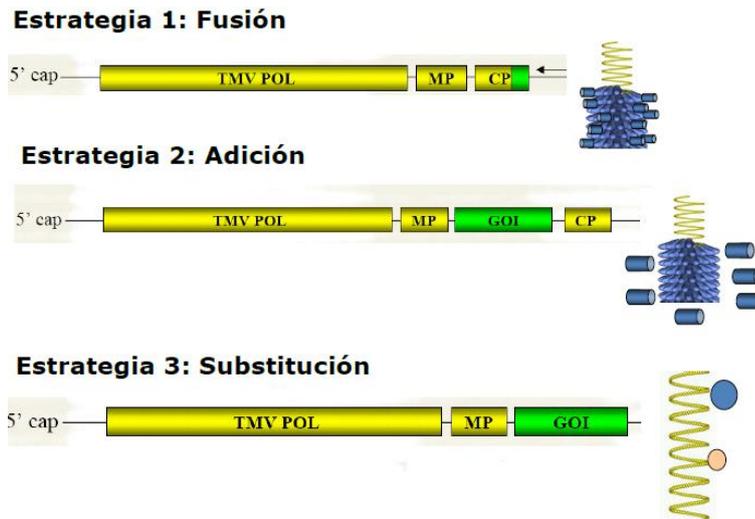


Figura 2- Estrategias utilizadas para el uso de biofactorías vegetales dirigidas por vectores virales.

La primera de las estrategias es la fusión. Es sencilla metodológicamente y consiste en introducir el gen de interés manteniendo el marco de lectura de una proteína viral, normalmente la proteína de cubierta, ya que esta se produce en grandes cantidades al final del ciclo de infección viral. Entre ambas, se suele añadir un péptido diana para alguna proteasa y que así se facilite el proceso de extracción. Sin embargo, no es óptimo unir nada a una proteína viral y con el paso de las generaciones el DNA exógeno se acaba perdiendo (Marillonnet et al., 2005). Se trata además de un virus completo y por tanto con capacidad infecciosa.

La segunda de las estrategias es la adición, que consiste en introducir el transgén como un nuevo transcrito, una proteína independiente dentro del virus manteniendo el marco de lectura. De forma análoga al caso anterior, los virus no suelen tolerar las adiciones y tras un número determinado de generaciones, en base al tamaño de la adición, el virus acabará librándose del exceso de genes. Esta es la estrategia utilizada en la presente memoria.

Por último, la estrategia de sustitución, es la más compleja metodológicamente pero también la más segura (Marillonnet et al., 2005). Con ella se evitan los problemas de eliminación del transgén, los problemas de espacio en el genoma viral y aumenta la bioseguridad (Li et al., 1995). Consiste en sustituir una proteína o parte del cistron viral por el gen de interés (Bedoya et al., 2010). Se suele hacer normalmente con la proteína de la cápside o con la polimerasa necesaria para la transcripción del virus. Se consigue así un vector desarmado, que no es infeccioso. Para que el vector sea infeccioso es necesario aportar a la planta en la que se introducirá el vector, la o las proteínas sustituidas en *trans*. La consecuencia de esto, es la necesidad de hacer plantas transgénicas estables con los inconvenientes que todo ello acarrea.

2.5. Movilización de los vectores virales

Los virus vegetales utilizan en su mayoría vectores animales para transportarse y heridas mecánicas en los tejidos para comenzar su infección. Una vez en la planta, se expanden primero célula a célula en el tejido de origen de la infección y luego utilizan el sistema vascular para su transporte a toda la planta. Obviamente, la movilización de los mismos cuando están siendo utilizados como vectores virales es diferente y está asistido por el investigador.

Una forma artificial para infectar, es introducir los RNA virales desnudos (válido solo para la estrategia de adición o fusión) en las células vegetales con abrasivos, como el carburo de silicio y ese RNA por sí mismo ya será infectivo. Sin embargo, la forma por excelencia para inocular los vectores virales es la agroinfiltración. Utilizando *A. tumefaciens* como lanzadera, se ingenieriza su T-DNA para que contenga al vector viral, como una unidad transcripcional y sea la bacteria la que lo movilice (figura 3) (Marillonnet et al., 2004).



Figura 3- T-DNA conteniendo un vector viral derivado del virus del mosaico del tabaco (TMV) en el que se ha sustituido la proteína de la cápside (CP) por un gen de interés (GOI).

Sin embargo, esta idea no es tan rápida como introducir el RNA directamente, ni está optimizada. Esto se debe a que un virus de RNA en su infección natural, se queda directamente en el citoplasma mientras que por la agroinfiltración pasa por una etapa en el núcleo, algo nuevo que afecta negativamente al rendimiento de la infección. Cabe destacar en todo caso que, esta forma es la única de movilizar los vectores virales desarmados sintetizados por el método de sustitución (Marillonnet et al., 2004).

2.6. Virus del mosaico del nabo (TuMV)

El virus del mosaico del nabo (TuMV "*turnip mosaic virus*") es un virus vegetal perteneciente al género *Potyvirus* y a la familia *Potyviridae*, cuyos miembros se caracterizan por su morfología alargada, el moteado en forma de mosaico que producen en sus huéspedes y la formación de cuerpos de inclusión en los mismos (Revers et al., 2015). Además, los potyvirus se transmiten de forma no persistente por áfidos (Hollings y Brunt, 1981).

El TuMV está presente en todo el mundo. Sus huéspedes principales son las plantas de la familia *Brassicaceae*, aunque puede infectar dicotiledóneas de 39 familias distintas, característica que lo diferencia del resto de potyvirus, que en general tienen un rango de huéspedes muy limitado. El primer registro que existe de una infección de TuMV, es del año 1862, aunque no fue hasta los primeros años de la década de 1920 en que se caracterizaron los síntomas en diferentes especies de brassicas y se denominó al causante como TuMV (Tompkins, 1939). Estos síntomas se basaban en un moteado oscuro y en una necrosis en las flores que causaba una reducción considerable en la producción de mostaza (*Brassica spp.*), col china (*Brassica pekinensis*) y nabo (*Brassica rapa*) (LeBeau et al., 1945). Desde esa caracterización, brotes periódicos fueron detectándose en todo el mundo (Provvidenti et al., 1979), en cultivos de interés comercial, tanto en brassicas como en miembros de la familia *Asteraceae*, como la lechuga y la endivia. En la actualidad se calcula que el 70% de todos los cultivos de grupo de las crucíferas (*Brassicaceae*) cultivadas en China (Feng et al., 1990) están infectadas por este virus. Es por tanto a nivel global, el segundo virus que infecta mayor cantidad de hortalizas tan solo por detrás del virus del mosaico del pepino (Walsh et al., 1985). Es destacable además que no solo afecta a plantas comerciales, también hay informes de infecciones a plantas de laboratorio (Ayotte et al., 1985), e incluso se ha detectado la presencia del TuMV en bancos de germoplasma de crucíferas presentes en los Estados Unidos.

2.7. Morfología, composición e idoneidad

Las partículas del TuMV tienen unas dimensiones de entre 650 y 760 nm de longitud y un diámetro de entre 15-20 nm (Halliwell et al., 1978). Poseen forma de varilla larga, una cápsida flexuosa y su infectividad depende del perfecto mantenimiento de esta forma. El material genético del TuMV es una molécula de RNA de cadena sencilla de unas 10 kb, con polaridad positiva, unida en su extremo 5' de forma covalente a una proteína VPg (proteína viral unida al genoma) y en el extremo 3' posee una cola de poliadeninas (figura 4). El genoma, codifica una poliproteína que es procesada por tres proteasas virales en 10 proteínas, todas ellas sintetizadas en cantidades equimolares. Mediante un mecanismo de deslizamiento transcripcional también se produce P3N-PIPO.

Aproximadamente el 5% del peso del virus es su material genético, y de este RNA el 50% de sus bases poseen cierto apareamiento. La proteína de la cápside, posee 288 aminoácidos, es rica en ácido glutámico (E), y presenta un alto grado de similitud con la proteína de la cápside de otros potyvirus (Kong et al., 1990).

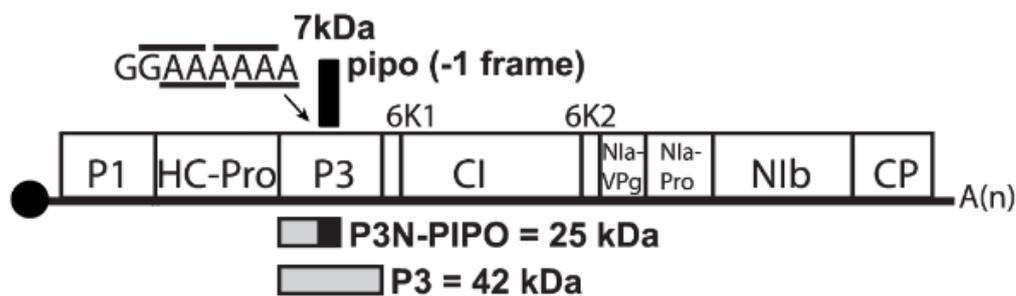


Figura 4- Representación del RNA monocatenario típico de los potyvirus que sintetiza una poliproteína con diez productos génicos más P3N-PIPO.

Los potyvirus son unos sistemas de expresión en plantas muy útiles por dos razones principales. Debido a su ya mencionada forma y cápsida flexuosa pueden incorporar grandes cantidades extra de material genético sin perder infectividad (Kelloniemi et al., 2008). Además, su estrategia de infección consiste en la liberación de diferentes proteínas todas procedentes de una gran poliproteína viral procesada por diferentes proteasas virales. Esto significa que, su material genético se traduce como una poliproteína y luego es procesada. Por tanto, la inserción en el genoma viral de una secuencia heteróloga, correctamente separada por las secuencias dianas de esas proteasas virales, permitirá la producción de esa proteína en cantidades equimolares al genoma viral, lo que en definitiva asegura una gran producción (Carrington et al., 1993).

2.8. Movimiento e infectividad del TuMV

A nivel celular, la infección por el TuMV genera unas estructuras membranosas cercanas o conectadas al retículo endoplásmico (RE). Estas estructuras se cree, sirven de lugar para el almacenaje de proteínas y lípidos involucrados en la replicación del RNA viral (RNA_v) y están derivadas del RE. Su formación depende en gran medida de la proteína viral 6K2, que se asocia a las membranas del mismo (Welsch et al., 2009; Wan et al., 2015). Estas estructuras vesiculares, en las que se encuentra el RNA viral, así como varias proteínas relacionadas con la replicación, procedentes tanto de la célula huésped como del virus, es donde se produce la replicación viral (Grangeon et al., 2012). Además, estas vesículas participan en el movimiento célula a célula del RNA viral intra e intercelular (Grangeon y Jiang, 2013).

Gracias a que derivan del RE, pueden continuar por la ruta secretora utilizando el citoesqueleto, concretamente los filamentos de miosina. Se ha observado además que las partículas virales una vez ensambladas pasan por un estadio en la vacuola, probablemente para unir la proteína HC-Pro, que entre otras funciones, tiene un papel relevante en la transmisión planta-planta del virus por los áfidos (Wan et al., 2015). Finalmente, estas vesículas con la ayuda de varias proteínas se asocian a los plasmodesmos. Estas proteínas son sobre todo P3N-PIPO y CI. Debido a que los

potyvirus no tienen proteína de movimiento (MP), otras proteínas deben cumplir esta importante función. HC-Pro y la proteína de cubierta aumentan el tamaño del plasmodesmo y junto con P3N-PIPO, CI y otras proteínas virales y de la célula huésped permiten el movimiento de las partículas virales de célula a célula (figura 5) (Vijayapalani et al., 2012).

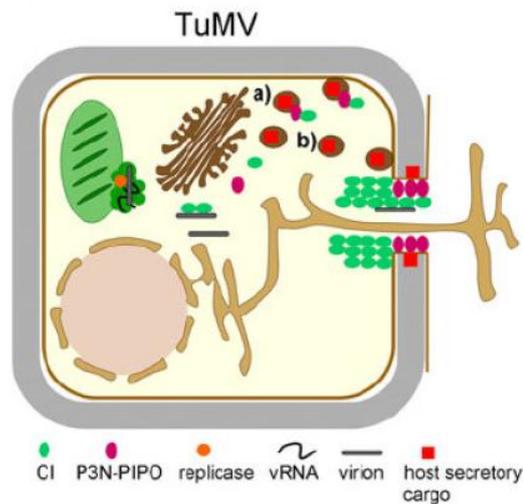


Figura 5- Modelo propuesto del movimiento intracelular del TuMV.

Se ha observado también que el TuMV se mueve sistémicamente por los vasos del xilema y el floema en complejos asociados a membranas, muy probablemente los mismos que utiliza para su movimiento inter e intracelular (Wan y Cabanillas, 2015).

2.9. Carotenoides: que son y para qué sirven.

Debido a la idoneidad que ya se ha comentado de los potyvirus para incorporar material genético, existen numerosos intentos exitosos de incorporación de rutas metabólicas no nativas en células vegetales, utilizando para ello vectores virales derivados de los mismos (Bedoya et al., 2010; Majer et al., 2017). El presente trabajo fin de máster surge de la introducción en células vegetales de una ruta metabólica no nativa, procedente de bacterias que consta de varios pasos para la producción de carotenoides con un vector derivado del virus del grabado del tabaco (TEV) (Majer et al., 2017).

Los carotenoides, son un grupo de moléculas derivadas del isopreno, liposolubles y que en los organismos fotosintéticos actúan en los procesos de transferencia de energía. Los carotenoides poseen numerosos dobles enlaces conjugados, responsables de absorber luz en la región visible y por tanto de que la mayoría de ellos posea colores intensos (Emodi, 1978). Algunos carotenoides (sobre todo el β -caroteno) son esenciales, ya que en animales son precursores del retinol o vitamina A. El retinol es

imprescindible para la visión a baja intensidad de luz y se metaboliza en los bastones, desencadenando una cascada de señalización que termina con la generación de un impulso nervioso a través del nervio óptico en dirección al cerebro. Es además, componente esencial de la retina y una carencia del mismo puede generar ceguera nocturna (a bajas intensidades lumínicas), así como úlceras en la córnea y ceguera total, si el déficit es continuado (Huet et al., 1997). La vitamina A, también posee un importante papel en el mantenimiento de la salud de la piel ya que estimula la producción de colágeno protector contra la radiación ultravioleta (Varani et al., 2000).

La que parece la cualidad con mayor valor comercial de los carotenoides, es su capacidad antioxidante (Edge et al., 1997). Existen numerosos estudios que demuestran que compuestos como el fitoeno, el licopeno y en especial el β -caroteno actúan como antioxidantes no enzimáticos de forma similar al ácido ascórbico o los flavonoides. Se ha propuesto que los carotenoides tienen la capacidad de reaccionar con grupos altamente energéticos como el ión superóxido (O_2^-) inactivándolo, y evitando el daño oxidativo (Young et al., 2001). Es destacable, además, el gran número de estudios que demuestran que un alto nivel de β -caroteno en el plasma sanguíneo reduce en gran medida la probabilidad de contraer ciertos tipos de cáncer, como el cáncer de pulmón y el de piel (Ziegler, 1989). Cabe destacar que el interés de estos compuestos no es tan solo nutricional. Carotenoides complejos, como la astaxantina y la cantaxantina, que no se producen en plantas de forma natural, tienen un uso muy extendido en la industria química y farmacéutica (Higuera et al., 2006).

2.10. Carotenoides en las plantas

Todos los organismos fotosintéticos, así como algunas bacterias no fotosintéticas y ciertos hongos sintetizan carotenoides. Sin embargo, los animales no poseen esta característica y necesitan ingerir carotenoides o sus precursores en la dieta. En los animales, los carotenoides son transportados por el plasma sanguíneo unidos a la proteína de unión a retinol (RBP) a todos los tejidos.

En las plantas los carotenoides C_{40} son sintetizados y almacenados en los plastidios. Como todos los isoprenoides, los carotenoides derivan de la condensación de moléculas de isopentenil pirofosfato (IPP) con pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP). En los plastidios, estos compuestos a diferencia de los sintetizados en el citoplasma provienen de la ruta del metileritrol 4-fosfato (MEP) y se usan para la síntesis de carotenoides y otros compuestos fotosintéticos (figura 6). Sin embargo, los precursores procedentes del citoplasma vienen de la ruta del mevalonato (MVA), y se usan para sintetizar esteroides y no carotenoides, siendo por tanto dos rutas bien diferenciadas. El compuesto del que derivan todos los carotenoides es el geranilgeranil difosfato o GGPP, sintetizado por la GGPP sintasa a partir de la condensación

de tres IPP con un DMAPP. A partir de aquí, la enzima fitoeno sintasa (PSY) produce fitoeno condensando dos moléculas de GGPP. El fitoeno es una molécula no coloreada y hacen falta varias enzimas y reacciones de desaturación e isomerización para transformar el fitoeno en licopeno, primer carotenoide coloreado y que produce el característico color rojo de los frutos de tomate. Finalmente, a partir de licopeno se pueden generar β -caroteno y diferentes xantofilas derivadas por una ruta, o luteína por una alternativa diferente (figura 6).

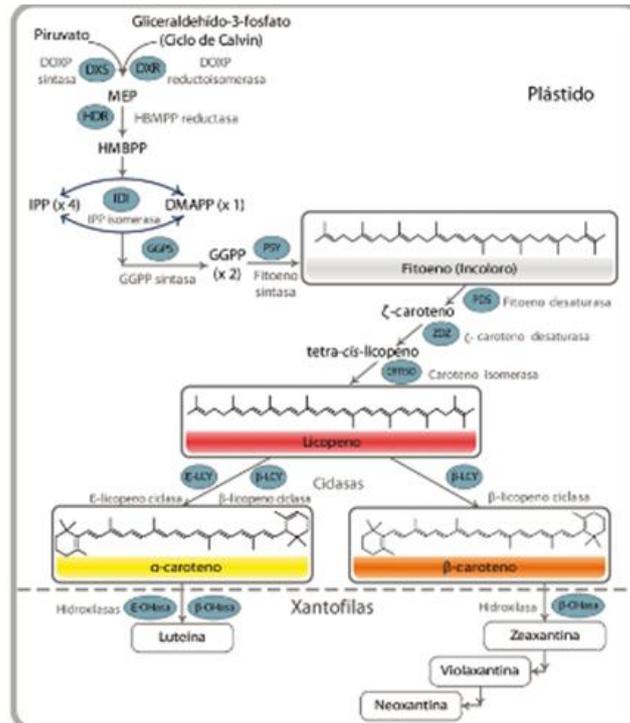


Figura 6 – Ruta de síntesis de los carotenoides en las células vegetales dentro del plástido.

Hasta ahora, la mayor parte de intentos de ingeniería metabólica en plantas se han centrado en potenciar y modificar componentes de la ruta endógena de síntesis de carotenoides localizada en los plástidos, la derivada del metileritrol 4-fosfato. Lamentablemente, la gran regulación existente en una ruta compleja y de gran importancia biológica, presente a varios niveles, ha hecho que sea extremadamente complejo el mejorar la biosíntesis de carotenoides.

Por este hecho, Majer et al. (2017) buscaron alternativas que mejoraran la síntesis de carotenoides en plantas evitando la ruta plástidal. En este contexto la ingeniería metabólica mediante el uso de vectores virales demostró ser una alternativa exitosa. Utilizando un vector derivado del TEV se consiguió la síntesis de carotenoides a partir de precursores citoplasmáticos (figura 7), ya que este virus no pasa por el cloroplasto en su ciclo de infección.

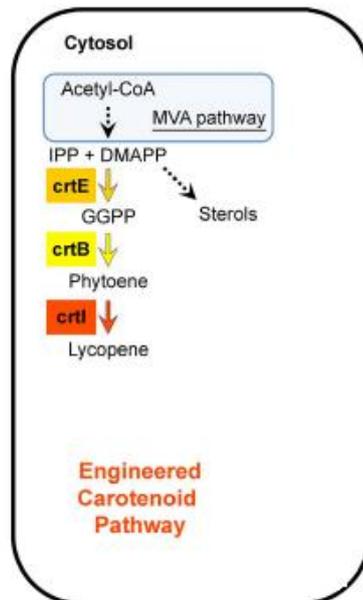


Figura 7- Ruta de síntesis de carotenoides modificada a partir de los precursores citoplasmáticos gracias a un vector viral derivado del TEV (Mayer et al., 2017).

A raíz de este trabajo, en el presente proyecto fin de máster se ha intentado ir un paso más allá, buscando plantas de interés agronómico en las que sintetizar carotenoides. Se han utilizado vectores virales derivados del TuMV para expresar la enzima fitoeno sintasa (*crtB*) de la bacteria del suelo *Pantoea ananatis*. Se eligió este virus dentro de la familia *Potyviridae* porque a diferencia del resto de miembros tiene una amplísima gama de huéspedes pertenecientes a varias familias vegetales diferentes. Además, se utilizaron dos aislados diferentes del TuMV para construir los vectores, el TuMV-JPN1 y el TuMV-UK1, más suave y más agresivo respectivamente con los que se pretendió aumentar la versatilidad de los experimentos. El efecto de estos vectores virales sobre la ruta de los carotenoides se ensayó en plantas con hojas verdes comestibles como la espinaca, la lechuga y la rúcula.

3. Objetivos

1. Construcción de dos vectores virales derivados de dos aislados del TuMV, el JPN1 y el UK1, expresando la enzima fitoeno sintasa de *Pantoea ananatis*
2. Evaluación de la infectividad de estos vectores en plantas modelo de *Nicotiana benthamiana*.
3. Evaluación de la infectividad de estos vectores en plantas de interés nutricional susceptibles de ser infectadas por el virus.
4. Evaluación a nivel cualitativo del nivel de carotenoides producido con los dos vectores virales en las plantas infectadas.

4. Materiales y métodos

4.1. Transformación de bacterias por electroporación

Se partió en primer lugar de dos plásmidos previamente construidos en el grupo de investigación que son el pGTuMV-JPN1 y el pBTuMV-UK1-Z con capacidad de replicación en *E. coli* y que contienen el cDNA de un aislado de TuMV-JPN1 (un virus con síntomas más suaves) y del TuMV-UK1 (un virus más agresivo) respectivamente. Con estos plásmidos y otros plásmidos intermedios construidos a lo largo del trabajo, se electroporaron células competentes de *E. coli* DH5 α . Se utilizaron entre 0.2 μ l a 1 μ l de cada plásmido en 40 μ l de células competentes sobre un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se traspasó todo el contenido a una cubeta de electroporación de 0.1 cm enfriada previamente en hielo y adecuadamente secada para evitar descargas eléctricas y se electroporó a 1500 V durante 5 ms en un electroporador ECM399 (BTX). Rápidamente, se añadió 1 ml de medio SOC (20 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 0.5 g/l NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, glucosa a 20 mM, pH 7.0), se recogieron las células con una pipeta y se devolvieron al tubo Eppendorf original. Las células se incubaron a 37 °C en agitación (200 rpm) durante 1 h. Posteriormente, se plaquearon en dos placas Petri distintas. Una de ellas con 10 μ l del cultivo y la otra con aproximadamente 100 μ l, tras centrifugar las células 2 minutos a 13000 rpm y decantar la mayor parte del sobrenadante. Se utilizó medio LB suplementado con los antibióticos necesarios según el plásmido utilizado para crecer las bacterias en placas Petri durante 24 h a 37 °C.

Posteriormente, una vez construidos y purificados los diferentes plásmidos finales, se incorporaron estos en células de *A. tumefaciens* competentes mediante electroporación. En este caso el protocolo es muy similar, pero se utilizó 1 μ l de plásmido en 40 μ l de células competentes sobre un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se electroporó siguiendo el mismo protocolo descrito previamente, pero las células se incubaron a 28 °C durante 2-3 h tras la electroporación. Después, se plaquearon 10 μ l y el resto en dos placas de Petri distintas, con medio LB suplementado con tres antibióticos, tetraciclina 7.5 μ g/ml, rifampicina 50 μ g/ml y kanamicina 50 μ g/ml, y se dejaron incubar 3 días a 28 °C.

4.2. Picado de colonias y purificación de plásmidos

Se seleccionaron colonias aisladas de un tamaño intermedio de las placas de Petri, que se traspasaron mediante un palillo estéril a un tubo de ensayo con medio LB líquido, junto con el antibiótico correspondiente y se incubaron en agitación durante 24 h a 37°C. Posteriormente se traspasaron 2 ml de cultivo saturado de células a un tubo Eppendorf, se centrifugaron durante 2 min a 13000 rpm y se descartó el sobrenadante.

La purificación de plásmidos bacterianos se llevó a cabo utilizando el kit Genejet Plasmid Miniprep (Thermo Scientific). En primer lugar, se añadieron 250 µl de solución de resuspensión con RNasa A (0.4 mg/ml) mantenida a 4°C y se resuspendieron las células utilizando el vórtex. Seguidamente, se añadieron 250 µl de solución de lisis y se mezcló por inversión 5 veces. A continuación se añadieron 350 µl de solución de neutralización, se mezcló exhaustivamente por inversión 5 veces, y se centrifugó durante 5 min a 13000 rpm. A continuación, se transfirió el sobrenadante (900 µl aproximadamente), a una columna de gel de sílice sobre un tubo Eppendorf de 2 ml, se centrifugó durante 1 min a 13000 rpm y se descartó el filtrado. Posteriormente, se procedió a añadir 500 µl de solución de lavado sobre la columna de gel de sílice, centrifugando durante 30 s a 13000 rpm y se descartó el filtrado. Se realizó un segundo lavado con 500 µl de la misma solución y después se centrifugó durante 1 min para eliminar los restos de la solución de lavado. Finalmente, se traspasó la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se añadieron 80-100 µl de tampón de elución, y se dejó incubar la mezcla durante 2 min a temperatura ambiente. Para finalizar, se centrifugó 2 min a 13000 rpm para recoger el eluido y descartar la columna. El material genético purificado se guardó en hielo y era inmediatamente cuantificado por espectrofotometría (NanoDrop 1000, Thermo Scientific).

4.3. Fosforilación de secuencias de DNA en 5'

Se preparó una mezcla de reacción de 20 µl totales con 1 µl de DNA, 2 µl de tampón PNK (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0.1 mM espermidina, 0.1 mM EDTA), 0.8 µl de ATP (10 mM), 0.4 µl de T4 polinucleótido kinasa (PNK) (4 U) y 15.8 µl de H₂O. La mezcla se incubó durante 30 min a 37°C.

4.4. Amplificación de DNA mediante PCR

Las diferentes amplificaciones de DNA se realizaron mediante PCR utilizando la DNA polimerasa *Phusion* de alta fidelidad de copia (tasa error 4.4×10^{-7}) (Thermo Scientific). Para la realización de las PCRs se utilizaron siempre puntas con filtro y cabina de PCR, que previamente había sido descontaminada con luz ultravioleta. La mezcla consistió en 4 µl de tampón HF (Thermo Scientific) (x5), 0.6 µl de DMSO, 0.4 µl de dNTPs (10 mM), 0.4 µl del cebador 1 (25 µM), 0.4 µl del cebador 2 (25 µM), 0.2 µl de DNA polimerasa *Phusion* (2 U/µl), 1 µl de DNA molde y H₂O hasta 20 µl, para cada reacción individual, todo ello añadido en hielo. Cada PCR se llevó a cabo en un termociclador con el programa indicado en la tabla 1. La relación de cebadores y para que fueron empleados se muestra en la tabla 2.

Tabla 1- Programa del termociclador utilizado para las reacciones de PCR

Proceso		Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial		30 s	98°C
30 ciclos	Desnaturalización	10 s	98°C
30 ciclos	Hibridación	30 s	55°C
30 ciclos	Extensión	15 s/ 1 kb de producto	72°C
Extensión final		10 min	72°C

Tabla 2- Relación de cebadores utilizados durante el proyecto, con indicación de para que fueron empleados.

Código de cebador	Secuencia	Uso
D2460	5'- TGCTTTAATCGTTTTGTGTATGTTATGTTGAGTTTTTATATTTTT TCCTCTC-3'	Amplificación del plásmido pG35Z
D2461	5'- TAACATACACAAAACGATTAAGCAAAC-3'	Amplificación del TuMV-UK1 del plásmido p35Tunos
D2462	5'- TCCTCACTACATGCGCTAAC-3'	
D2463	5'- TTGGTGTTAGCGCATGTAGTGAGGATCGTCTCGATTGCCTTA AC-3'	Amplificación del plásmido pG35Z
D2464	5'-TCTGCATCAAGCGTTTCACCTG-3'	Mutación DAE para eliminar la transmisibilidad por áfidos
D2465	5'-GTTGACAGACGAGCAAAGCAG-3'	
D2466	5'- TTTATCACCAGGCAGGAGAGATGAATAATCCGTCTACTCAA TCATGC-3'	Amplificación del crtB del plásmido pACCRT-EIB
D2467	5'- TGGTAAACGCACACCTCAGCGAGCGGGCGCTGCCAGAG-3'	
D2468	5'- CCGCCGTCTCCTCATTCTCCTGCCTGGTGATAAACACAAGCC TC-3'	Amplificación del fragmento LacZ del pBSΔE
D2469	5'- GGCGCGTCTCGGCTCGCTGAAGCTTGCCTTACCACCAAGCA GGTGAACGCTTGATGCA-3'	
D2503	5'-TTTATCACCAGGCAGGAGAAATGAATAATCCGTCTACTCAA TCATGCGGTC-3'	Amplificación del cDNA del crtB
D2504	5'- GGTAACGCAAGCTTCAGCGAGCGGGCGCTGCCAGAG-3'	
D2592	5'- GTCCCTTGATCCTATCAAATG-3'	Retrotranscripción de RNA a cDNA de tejido infectado
D2593	5'- GCAGGTGAAACGCTTGATGCAG-3'	Amplificación del cDNA del virus TuMV-UK1
D2594	5'- CAACCCCTGAACGCCAGTAAG-3'	
D2595	5'- GCAGGTGAGACGCTTGATGCCG-3'	Amplificación del cDNA del virus TuMV-JPN1
D2596	5'- TAACCCCTTAACCCAAGTAAG- 3'	

4.5. Electroforesis en gel de agarosa

Con el objetivo de analizar la integridad y el tamaño de los diferentes plásmidos y DNA amplificados se utilizó la electroforesis en gel de agarosa. Dependiendo de la cantidad de muestras a analizar se utilizaron geles pequeños (8 x 6.5 x 0.5 cm) o geles grandes (15 x 11 x 0.5 cm). Para realizar la electroforesis en los geles pequeños se vertieron 25 ml de agarosa (1%) fundida en tampón de electroforesis, y se dejaron solidificar 15 min. Para la electroforesis en los geles grandes, se vertieron 75 ml de agarosa en los correspondientes moldes dejándolos enfriar el mismo tiempo. Una vez solidificado el gel, se retiraba el peine y éste se colocaba en su correspondiente cubeta de electroforesis sumergido en tampón TAE (40 mM Tris, 20 mM acetato de sodio, 1 mM EDTA). A las muestras a analizar, se les añadió una cantidad proporcional de tampón de carga (x10) (12.5 mg azul bromofenol, 12.5 mg xilencianol, 28.75 g 87% glicerol, 1 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0) y H₂O hasta 20 µl. Las muestras se cargaron en los correspondientes pocillos y se corrió la electroforesis durante 75 min a 60 V para los geles pequeños y durante 90 min a 75 V para los geles grandes.

Para visualizar los ácidos nucleicos separados por electroforesis, los geles se tiñeron en una cubeta de plástico con 200 ml de agua y 10 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) y se dejaron en agitación (125 rpm) 15 min. Después, se realizaron tres lavados con agua para eliminar en la medida de lo posible el bromuro de etidio, y se visualizaban los ácidos nucleicos teñidos en el transiluminador (Uvitec).

4.6. Manipulación y ligación de plásmidos

Durante el proceso de construcción de los plásmidos intermedios y finales, se realizaron diferentes manipulaciones a nivel de secuencia de los mismos. Para llevar a cabo ese trabajo se utilizó la ingeniería genética clásica basada en la tecnología de corte con enzimas de restricción y empalme con DNA ligasa. Se digirieron los diferentes plásmidos con distintas enzimas de restricción. Estas digestiones, se realizaron en tubos Eppendorf de 0.5 ml añadiendo una cantidad variable de DNA a digerir según su concentración (medida por espectrofotometría) junto con 1 µl (10 U) de la enzima o enzimas de restricción comercial correspondientes y 2 µl de tampón de digestión (x10) y H₂O hasta alcanzar un volumen de 20 µl. Finalmente, las digestiones se incubaron a 37 °C durante 1 h.

También se realizó una reacción de digestión parcial a 37 °C durante 1 h con el objetivo de recoger alícuotas de la reacción a diferentes tiempos. Se preparó para ello una mezcla de reacción con la mitad de la concentración habitual de la enzima. Estas alícuotas se recogieron a tiempos variables a los 4, 8, 16, 32 y 64 min, respectivamente. Los tubos Eppendorf en los que se recogieron las alícuotas contenían

7 μ l de EDTA (0.25 M), para detener la reacción de digestión al secuestrar el magnesio que la enzima necesita para poder funcionar.

Para construir los plásmidos, también se realizaron diferentes reacciones de ligación. Estas reacciones fueron realizadas en tubos Eppendorf de 0.2 ml añadiendo las cantidades adecuadas de DNA (con relación molar de 1 molécula de plásmido por 3 de inserto), 1 μ l de la enzima DNA ligasa T4 (Thermo Scientific), 1 μ l de tampón DNA ligasa T4 (x10) y H₂O, en caso de ser necesaria, hasta alcanzar un volumen de 10 μ l. Finalmente, las ligaciones se incubaron a 22 °C durante 1 h.

Como método alternativo a la construcción de plásmidos mediante una reacción de ligación, se utilizó el ensamblaje isotérmico de Gibson. Este último consiste en el ensamblaje de dos o más fragmentos de DNA gracias a que poseen extremos idénticos. Para realizar el ensamblaje se utilizó una mezcla de tres enzimas (exonucleasa, DNA polimerasa y DNA ligasa) que actúan de forma secuencial. Se realizaron los ensamblajes Gibson con el kit NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB). Se añadieron los distintos fragmentos de DNA y un volumen de Gibson Assembly Master Mix (2X) en un tubo Eppendorf de 0.2 ml. Las reacciones se incubaron a 50°C 1 h.

4.7. Elución de ácidos nucleicos de geles de agarosa

Para eluir DNA separado en gel de agarosa, se utilizó el kit de columnas Zymo Research. En primer lugar, se cortaron las bandas (lo más pequeñas posibles) del gel con una cuchilla estéril y se depositaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. A continuación, se añadieron 3 volúmenes de Agarose Dissolving Buffer (ADB) según el peso y se incubó la muestra durante 5-10 min a 55 °C. Una vez disuelta la agarosa, la mezcla se vertió en una columna de sílice colocada sobre un tubo Eppendorf de 2 ml. Seguidamente, se centrifugó durante 30 s a 13000 rpm y se descartó el filtrado. A continuación, se realizaron dos lavados con 200 μ l de Washing Buffer (WB), centrifugando 1 min en cada ocasión y retirando el filtrado en ambos casos, para eliminar completamente cualquier contaminante. Para finalizar, se traspasó la columna a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml, añadiendo 8 μ l de Elution Buffer (EB) (x1) y se incubó la mezcla durante 1 min a temperatura ambiente, para finalmente ser centrifugada a 13000 rpm 1 min y recoger el eluido.

4.8. Purificación de ácidos nucleicos de una solución

De forma análoga al caso anterior para purificar ácidos nucleicos de mezclas de reacción, como digestiones, ligaciones y ensamblaje de Gibson, se utilizó el kit de columnas Zymo Research. En este caso se añadió a la solución 100 μ l de DNA Binding Buffer (DBB), traspasando la mezcla a una columna de gel de sílice sobre un tubo

Eppendorf de 2 ml. De nuevo, se centrifugó durante 30 s a 13000 rpm y descartó el filtrado. Después, se realizaron dos lavados con 200 µl de WB, los cuales se centrifugaron durante 30 s a 13000 rpm, y se eliminó el filtrado. En el caso de necesitar la solución purificada para electroporar, se realizaba un lavado adicional con 200 µl de etanol al 80%. A continuación, se traspasó la columna a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml, se añadieron 8 µl de EB (x1) (en el caso de que la solución purificada se utilizase para electroporar, se utilizaba EB (x0.1)), se incubó durante 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó 1 min a 13000 rpm. Por último, se recogió el eluido y se congeló a -20°C o se dejó en hielo si iba a ser utilizado inmediatamente después.

4.9. Agroinoculación de plantas

Una vez construidos los plásmidos finales, estos se introdujeron en células competentes de *A. tumefaciens* por electroporación como se ha explicado en el apartado 1. Se crecieron en placa de LB con triple antibiótico y se seleccionaron colonias aisladas de *A. tumefaciens*. Se picaron las mismas en 10 ml de medio LB líquido con kanamicina (50 µg/ml). Los cultivos se incubaron a 28 °C en agitación hasta que se observó turbidez. A continuación, se midió la densidad óptica (DO) de los cultivos con un espectrofotómetro y se seleccionaron aquellos que presentaban una DO a 600 nm de entre 0.5 y 1. Se transfirió un volumen de 500 µl de los cultivos seleccionados a tubos Eppendorf de 1.5 ml que contenían 500 µl de glicerol 20%, para conservarlos a -80 °C. A continuación, se calculó la cantidad necesaria de cultivo que habría que centrifugar para obtener una densidad óptica de 0.5 tras resuspender las células. Una vez calculado se sedimentaron las mismas, traspasando la cantidad adecuada de cada uno de los cultivos seleccionados a tubos Eppendorf de 2 ml y centrifugando durante 2 min a 13000 rpm. Después, se retiró la mayor parte del sobrenadante y se resuspendieron las células en 1.8 ml de una disolución compuesta por 10 mM MES-NaOH pH 5.6, 10 mM MgCl₂. A cada una de estas preparaciones se le añadieron 2.7 µl de acetosiringona a 150 µM. Posteriormente, los cultivos se incubaron durante 2 h a 28 °C y se procedió a infiltrar las plantas.

En el proceso se infiltraron las hojas por el envés apoyando una jeringa sin aguja cargada con el cultivo de *A. tumefaciens* y presionando ligeramente con el dedo en el haz, comprobando la entrada del cultivo en el apoplasto, lo que provoca un cambio de color en la hoja (figura 8). Se inocularon plantas de *N. benthamiana* con cuatro preparados virales de TuMV-JPN1, TuMVJPN1-crtB, TuMV-UK1 y TuMVUK1-crtB. En cada planta se inocularon 3 hojas. También se dejó una maceta de plantas control sin inocular.



Figura 8- Detalle de la agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana*.

Fuente: biology.fullerton.edu/msacco/Research.html.

4.10. Infección mecánica de plantas comestibles

A partir del tejido infectado de plantas agroinoculadas de *N. benthamiana* recogido cuidadosamente y congelado a -80°C , se realizó la infección mecánica de diferentes especies comestibles con los vectores virales. Para ello, los tejidos fueron triturados en tubos Eppendorf de 2 ml con una bolita de acero. Los tubos se congelaron en N_2 líquido y fueron agitados durante 1 minuto a 30 s^{-1} . Una vez el tejido estaba triturado, y siempre en hielo para reducir la actividad enzimática en los mismos, se añadió 1 ml de tampón de inoculación TI (50 mM fosfato potásico, pH 8.0, 1% PVP-10, 1% PEG-6000, 10 mM 2-mercaptoetanol) y se mezcló con vórtex. Se preparó además, de forma independiente un tubo con 1 ml de tampón de inoculación y 0.1 g de carburo de silicio que actúa como agente abrasivo para facilitar la entrada de los virus en el tejido foliar.

Para realizar la infección mecánica, se tomó la hoja de la planta a inocular, cogiéndola suavemente por la punta y tras añadir una gota de $5\text{ }\mu\text{l}$ de la mezcla de carburo de silicio, con un bastoncillo, suavemente se extendió el preparado viral por la mitad de la hoja hasta que ésta brilló por el líquido. Dependiendo del tamaño de la planta y las hojas, se infectaron entre 1 a 3 hojas. Las hojas centrales de tamaño medio son las más adecuadas para la infección ya que actúan como órganos fuente, movilizandolos recursos hacia el resto de la planta y ayudando en el transporte viral.

4.11. Purificación de RNA de plantas infectadas

Para extraer y purificar RNA a partir de tejido foliar infectado, en primer lugar, se recolectó el tejido. A continuación, se trituró 0.1 g del tejido recogido en un tubo

Eppendorf de 2 ml, con 1 bolita de acero de forma análoga a como se ha descrito anteriormente. Para ello, se congelaron los tubos con el tejido en N₂ líquido y se molió con Tissuelyser durante 1 min a 30 s⁻¹. Una vez el tejido estuvo triturado, se añadió a cada tubo Eppendorf 1 ml de TEX (4 M tiocianato de guanidinio, 0.1 M acetato sódico pH 5.5, 10 mM EDTA, 0.1 M β-mercaptoetanol), se mezcló con ayuda de vórtex y se centrifugó durante 5 min a 13000 rpm. Después, se recogieron 600 µl del sobrenadante en un tubo nuevo, a los cuales se añadieron 390 µl de etanol 96%. Se mezcló todo con el vórtex y se centrifugó 1 min a 13000 rpm. A continuación, se transfirieron 700 µl de sobrenadante a una columna Zymo de gel de sílice (Zymo-Spin I columns, Zymo Research) posicionada sobre un tubo Eppendorf de 2 ml, se centrifugó durante 1 min a 13000 rpm y se descartó el filtrado. Posteriormente, se procedió a lavar la columna con 500 µl de TLA (70% etanol, 10 mM acetato sódico pH 5.5) centrifugando 30 s y descartando el filtrado. Se realizó un segundo lavado, con otros 500 µl de TLA pero centrifugando 1 min y transfiriendo después la columna de gel de sílice cuidadosamente a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Por último, se eluyó el RNA con 10 µl de tampón TEL (20 mM Tris-HCl en H₂O, pH 8.5), se incubó 1 min a temperatura ambiente, se centrifugó durante 2 min a 13000 rpm, se descartó la columna y se guardó el RNA a -20°C

4.12. Retrotranscripción (RT) de RNA y amplificación de cDNA por PCR

Se realizó la transcripción inversa (RT) del RNA a cDNA y posteriormente se llevó a cabo la amplificación de este cDNA mediante PCR para observar el estado de la infección en las plantas agroinoculadas e inoculadas mecánicamente. Tanto la preparación de las RT como de las PCR se realizaron en la cabina de PCR y utilizando puntas de filtro. En primer lugar, se añadieron 5.5 µl del RNA purificado y 1 µl del cebador D2592 (tabla 2) (5 µM) en tubos Eppendorf de 0.2 ml. Para la reacción control, se añadieron 5.5 µl de agua en lugar de RNA y 1 µl de cebador. Después, las preparaciones se incubaron en un termociclador durante 1.5 min a 98 °C para eliminar posibles estructuras secundarias del RNA. En el momento en que la temperatura del termociclador bajó hasta los 42 °C, se pausó el programa y se añadió a cada preparación: 3.5 µl de una mezcla que contenía: 2 µl de tampón RT (x5) (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 1 µl de dNTPs 10 mM, 0.25 µl de inhibidor de RNasas (40 U/µl) y 0.25 µl de M-MuLV RT, la retrotranscriptasa (200 U/µl), todo ello mantenido en hielo. A continuación, se reanudó el programa y se incubaron las reacciones durante 45 min a 42 °C posteriormente, 10 min a 50 °C, 5 min a 60 °C y, por último, 15 min a 70 °C para inactivar la enzima.

Seguidamente, una vez se obtuvo el cDNA, se realizaron las reacciones de amplificación de este cDNA con la polimerasa de *Thermus thermophilus* HB27 (*Tth*) en

tubos Eppendorf de 0.2 ml. Para ello, se preparó una mezcla de reacción de: 2 μ l tampón Tth (x10), 0.4 μ l de dNTPs (10 mM), 0.8 μ l del cebador 1 (25 μ M), 0.8 μ l del cebador 2 (25 μ M), 0.2 μ l de *Tth* DNA polimerasa (5 U/ μ l; Biotools), 1 μ l de molde de la reacción RT y H₂O hasta alcanzar un volumen final de 20 μ l. Los cebadores diferían en el caso de amplificar un aislado viral u otro. Para el caso del TuMV-UK1 se utilizaron los cebadores D2593 y D2594 y para el TuMV-JPN1 los D2595 y D2596. Para la reacción control se añadieron las mismas cantidades de reactivos sin molde de cDNA. A continuación, se incubaron las reacciones en un termociclador siguiendo el siguiente programa: una desnaturalización inicial de 2 min a 94 °C seguida de 30 ciclos de 40 s a 94 °C, 30 s a 55 °C y 1 min a 72 °C, finalizando con 10 min a 72°C.

4.13. Cuidados de las plantas en el invernadero

Las plantas utilizadas para los experimentos se cultivaron en el invernadero del IBMCP en condiciones controladas de temperatura (25 °C) y en ciclo de día medio (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad). Se realizaron semilleros de varias especies y se trasplantaban a macetas de mayor tamaño conforme crecían. Cuando alcanzaron el tamaño óptimo eran inoculadas mecánicamente.

4.14. Secuenciación DNA y análisis computacional de las secuencias

Los plásmidos construidos se secuenciaron para comprobar la ausencia de mutaciones. Para ello se recurrió al servicio de secuenciación del IBMCP. Las muestras a secuenciar se proporcionaron en alícuotas de 5 μ l indicando la concentración de los plásmidos, junto con el correspondiente cebador de secuenciación a 5 μ M. Para el análisis de las secuencias se utilizaron los recursos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

5. Resultados y discusión

La primera tarea de este proyecto consistió en construir clones infecciosos del TuMV que expresaran la fitoeno sintasa (*crtB*) de la bacteria del suelo *Pantoea ananatis*. La estrategia que se siguió fue la de adición. Es decir, sobre la propia secuencia completa del virus, se añadió la secuencia codificante de la enzima. Para ello se partió de tres plásmidos, el pBSΔE, un plásmido derivado del pBluescript II KS+ (código GenBank X52327.1), el pGTuMV-JPN1 (López-González et al., 2017) y el p35Tunos (Sánchez et al., 1998) con capacidad de replicación en *E. coli*. Estos dos últimos contienen el cDNA de la variante de secuencia TuMV-JPN1 (un virus que induce síntomas suaves) (Jenner y Walsh, 1996) y TuMV-UK1 (que induce síntomas más agresivos) (Ohshima et al., 2003), respectivamente.

5.1 Construcción del vector viral TuMV-JPN1-*crtB*

La construcción del vector viral para el caso del TuMVJPN1-*crtB* fue más sencilla que en el caso del TuMVUK1-*crtB*, debido a que se tomó como base el plásmido pBTuMV-JPN1-Z (derivado del pBSΔE) que tiene clonado el péptido α de la β-galactosidasa (*LacZ*) de *E. coli*, de tal forma que se puede sustituir por un fragmento cualquier de DNA si se amplifica con los cebadores adecuados. El fragmento de DNA que se introdujo en la secuencia fue el cDNA del *crtB* de *P. ananatis*. La secuencia del *crtB* se amplificó a partir del plásmido pACCRT-EIB por PCR con los cebadores D2466 y D2467. El DNA amplificado se utilizó para hacer un ensamblado de Gibson con el vector pBTuMV-JPN1-Z previamente digerido con la enzima *Bsa*I, que corta a ambos lados del *LacZ* facilitando el clonaje (figura 9).

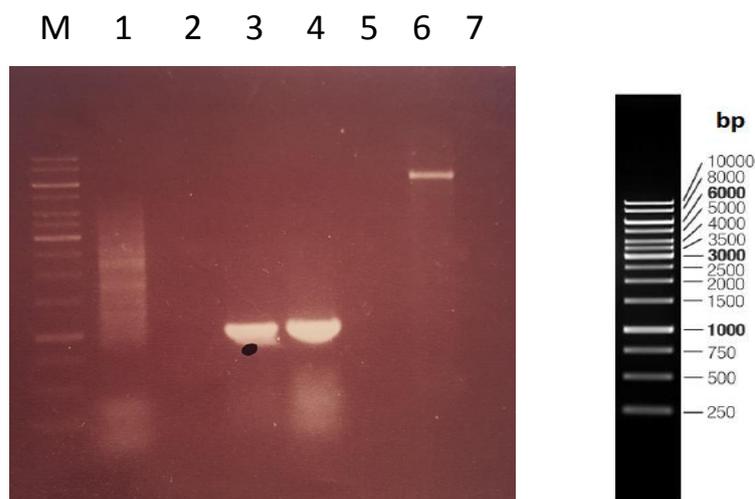


Figura 9- Gel de electroforesis en cuyos carriles 3 y 4 está los productos de PCR con el fragmento *crtB* amplificado. Carril 6 vector pBTuMV-JPN1-Z digerido con *Bsa*I. Carril 1, control de PCR. Carril M, marcador de pesos moleculares (ver tamaños a la derecha).

Gracias al diseño de los cebadores, la secuencia de crtB amplificada, coincide en sus extremos 5' y 3' con las secuencias que flanquean al LacZ, de forma que lo sustituye en el plásmido. Al realizar el ensamblaje de Gibson, el LacZ del plásmido se eliminó y por tanto, se seleccionaron en placa con X-gal las colonias blancas, en las que el lacZ no se ha reconstruido y que son los posibles clones recombinantes. Se purificó DNA plasmídico, para confirmar a continuación en un gel de agarosa si el tamaño correspondía a la nueva construcción. Se hizo una doble digestión con las enzimas de restricción PstI y NdeI del plásmido construido pBTuMVJPN1-crtB y del plásmido final de destino, el pGTuMV-JPN1 (figura 10).

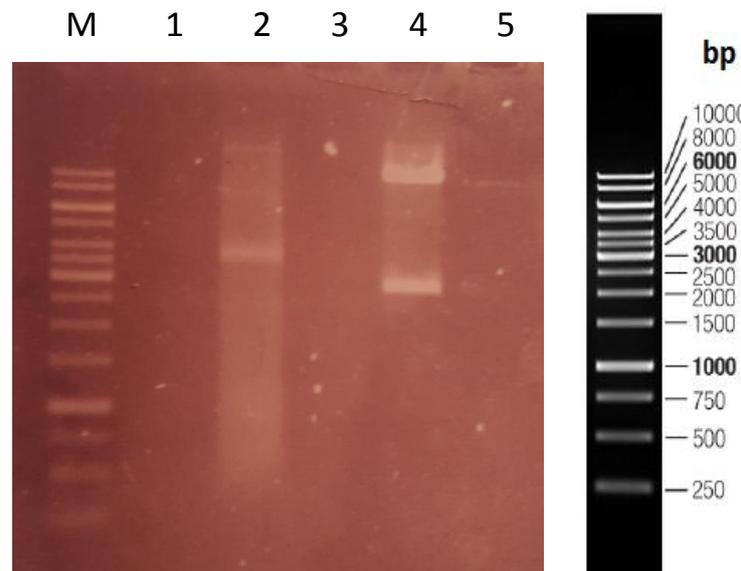


Figura 10. Gel de electroforesis con la doble digestión PstI y NdeI del pBTuMVJPN1-crtB en el carril 2 y en el carril 4 del pGTuMV-JPN1 final. Carril M, marcador de pesos moleculares (ver tamaños a la derecha).

Con esta doble digestión se tomó por un lado el vector pGTuMV-JPN1 abierto y el fragmento del plásmido intermedio pBTuMVJPN1-crtB (3500 pb aproximadamente), que se había modificado. Se separaron ambos fragmentos en un gel de agarosa y fueron ligados con T4 DNA ligasa. Tras la ligación, se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α y se purificó el DNA plasmídico, obteniendo el plásmido final pGTuMVJPN1-crtB. Para comprobar la correcta inserción del crtB, se realizó un gel comparando el tamaño respecto a un plásmido pGTuMVJPN1-GFP (figura 11), que contiene la proteína fluorescente verde (GFP), un inserto de tamaño ligeramente menor y que tendrá una mayor movilidad en un gel de agarosa. Con los clones seleccionados número 1 y 4, se transformó *A. tumefaciens*, para agroinfiltrar plantas de *N. benthamiana*, y comprobar la infectividad del vector viral construido.

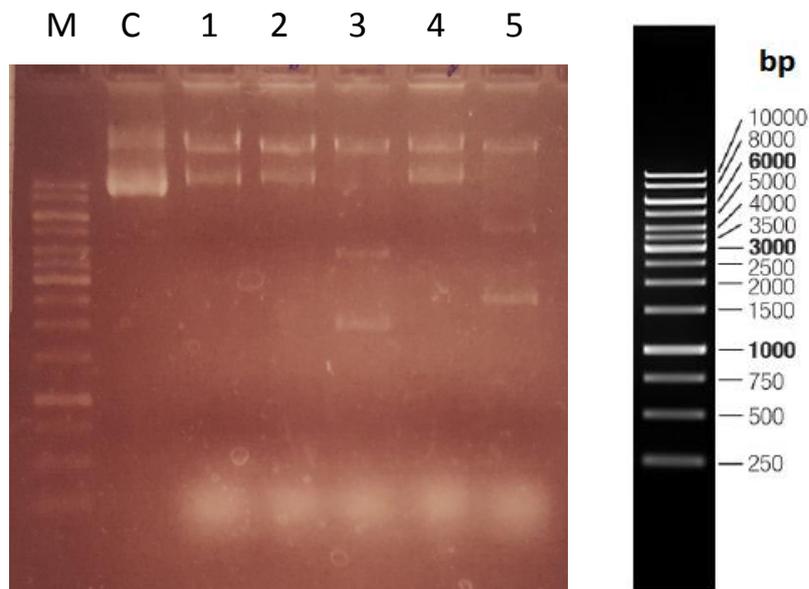


Figura 11- Gel de electroforesis con el DNA plasmídico purificado de los pGTuMVJPN1-crtB. Carril C, control pGTuMVJPN1-GFP. Carril M, marcador de pesos moleculares (ver tamaños a la derecha).

5.2 Construcción del vector viral TuMVUK1-crtB

La construcción del vector viral derivado del TuMV-UK1 fue más costosa. El primer objetivo fue obtener la secuencia del virus TuMV-UK1 del vector p35Tunos (Sánchez et al., 1998). El plásmido de destino para el clon infeccioso fue el pG35Z. Se amplificó por PCR con los cebadores D2461 y D2462 el cDNA completo de TuMV-UK1. De forma paralela con los cebadores D2460 y D2463 se amplificó el vector en el que se introducirá el fragmento, el pG35Z (figura 12).

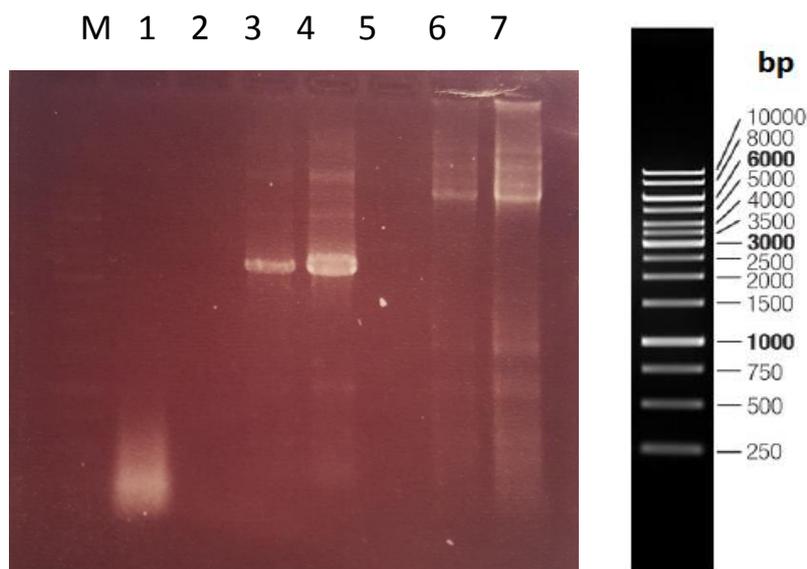


Figura 12- Gel de electroforesis de la PCR del pG35Z, carriles 3 y 4 y del p35Tunos carriles 6 y 7. Carril 1, DNA perteneciente a otro experimento. Carril M, marcador de pesos moleculares (ver tamaños a la derecha).

El fragmento del vector de destino pG35Z, de unas 3.5 kb amplificado por PCR, se digirió con la endonucleasa DpnI que reconoce y corta DNA metilado para evitar que cualquier resto del molde no sintetizado en la PCR esté presente. A continuación, se unieron los fragmentos utilizando la reacción de ensamblaje Gibson. Con la preparación, se electroporó células competentes de *E. coli* DH5 α y se seleccionó el plásmido pGTuMV-UK1.

Seguidamente, al tener que realizar diferentes modificaciones a nivel de secuencia en el extremo 3' del clon infeccioso, se subclonó un fragmento del cDNA viral de 2233 pb, perteneciente a la frontera entre la NIb y la CP (proteína de cubierta), en un vector pBS Δ E. Este fragmento se tomó del p35Tunos inicial. Para ello, se digirió con las enzimas de restricción SacI y ApaI. Con el fragmento digerido, y utilizando los cebadores D2464 y D2465, se realizó una PCR para mutar el sitio de transmisión por áfidos del virus.

Esta mutación, denominada DAE, consistió en el cambio puntual del aminoácido glicina (G) por un ácido glutámico (E) debido a la sustitución de los 2 nucleótidos finales del codón original GGU a GAG. La mutación se consigue gracias a un cebador que no aparee completamente. La mutación modifica un residuo clave para la unión del virión, por la CP, al estilete del áfido vector (Dombrosky et al., 2005). Con esta mutación se aumenta la bioseguridad del vector, evitando que, aunque algún áfido se alimente de las plantas infectadas pueda pasar el virus modificado a otros posibles huéspedes. A continuación, una vez hecha la PCR, el fragmento modificado se purificó, y se fosforilaron sus extremos para ser sustrato de la T4 DNA ligasa. Finalmente, el fragmento se ligó al plásmido pBS Δ E abierto con SacI y ApaI.

Seguidamente, en el pBTuMV-UK1-DAE resultante, se introdujo la secuencia del LacZ, junto con un sitio de procesamiento artificial para NIaPro y un polilinker con dos sitios BsaI separados por la secuencia del propio LacZ. Para ello se amplificó por PCR utilizando los cebadores D2468 y D2469 el fragmento LacZ, a partir del plásmido pBTuMV-JPN1-Z. Los cebadores, además, fueron diseñados con un sitio Esp3I. Con esa misma enzima, se digirió el plásmido pBTuMVUK1-DAE. La enzima corta en la frontera entre la NIb y la CP, y será allí donde se añada el nuevo fragmento con el LacZ durante la ligación con T4 DNA ligasa. Una vez hecha la misma, se obtuvo el pBTuMVUK1-DAE-Z.

El siguiente paso en la construcción del vector viral fue la sustitución del fragmento conteniendo al LacZ por el fragmento con la fitoeno sintasa, crtB de *P. ananatis*. Para ello se amplificó por PCR el fragmento crtB, procedente del pBTuMVJPN1-crtB con los cebadores D2503 y D2504. De forma paralela, el vector pBTuMVUK1-DAE-Z se digirió con la enzima de restricción Esp3I. Una vez abierto el plásmido alrededor del LacZ se sustituyó el fragmento por el del crtB mediante el ensamblaje Gibson. La mezcla obtenida se utilizó para electroporar *E. coli* DH5 α . Se purificó el DNA plasmídico de varios clones y se analizó electroforéticamente (figura 13).

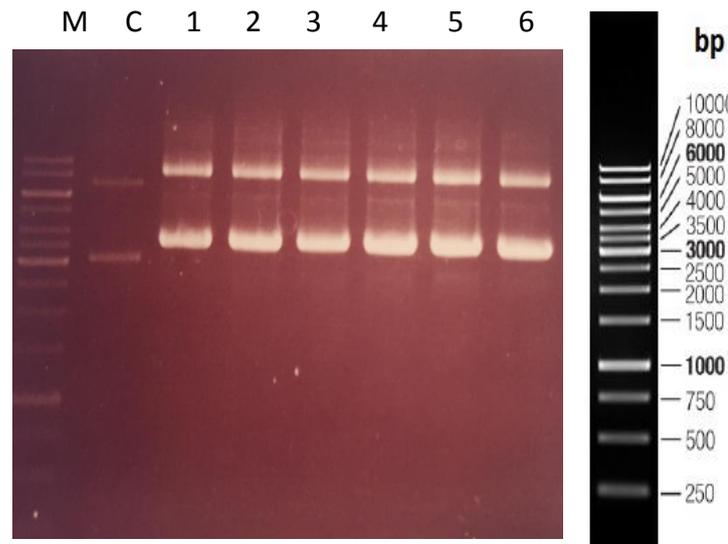


Figura 13- Gel de electroforesis con el DNA plasmídico purificado del pBTuMVUK1DAE-crtB (carriles 1 a 6). El control en el carril C es pBTuMVUK1-Z. Carril M, marcador de pesos moleculares (ver tamaños a la derecha).

A continuación, se realizó una doble digestión con las enzimas Apal y MluI del plásmido pBTuMVUK1DAE-crtB y el pGTuMV-UK1 para reconstruir el clon viral con todas sus modificaciones. Como existía un sitio MluI en la secuencia de crtB, se realizó una digestión parcial con esta enzima (figura 14 a). Se purificaron las bandas del gel de electroforesis correspondientes a los 4, 8 y 16 min de aproximadamente 2500 pb. Este fragmento y el vector pGTuMV-UK1 abierto se ligaron con T4 DNA ligasa. El producto de la ligación se usó para electroporar células competentes de *E. coli* DH5 α . A continuación, se purificó y analizó el DNA plasmídico (figura 14 b). Con el plásmido pGTuMVUK1DAE-crtB de los clones 1 y 4 se electroporó células competentes de *A. tumefaciens*, como paso previo a la agroinoculación de plantas con los vectores virales ya finales (figura 15).

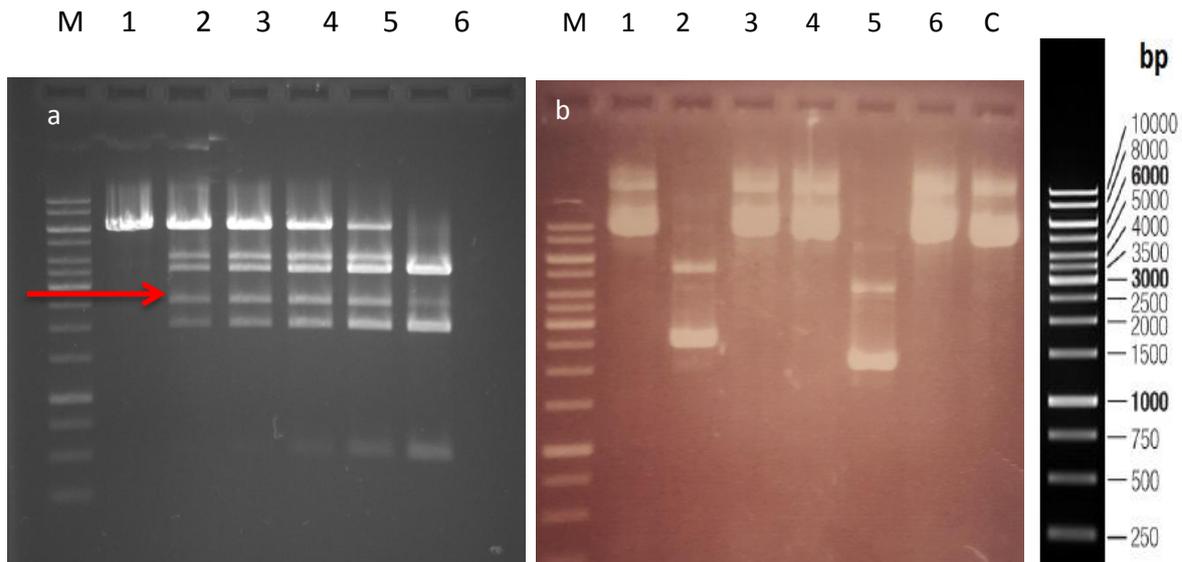


Figura 14- (a) Gel de agarosa de la digestión parcial MluI del pBTuMVUK1DAE-crtB para tomar la banda del crtB de los carriles 2, 3 y 4. (b) Gel electroforético del DNA plasmídico purificado del vector final pGTuMVUK1DAE-crtB. El carril 1, 3, 4 y 6 son correctos. El carril 7 pertenece al control, el plásmido final pGTuMVJPN1-crtB. Carril M, marcador de pesos moleculares (ver tamaños a la derecha).

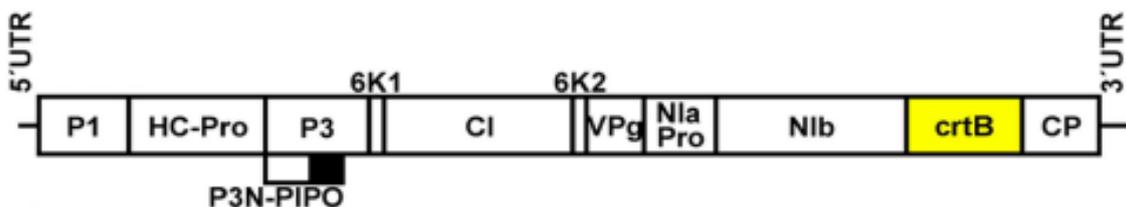


Figura 15- Representación del genoma viral, tanto de TuMVJPN1-crtB como de TuMVUK1-crtB, tras las diversas modificaciones llevadas a cabo. Se incluyeron dos sitios de procesamiento de crtB por NlaPro para que las proteasas virales la corten a partir de la poliproteína viral.

5.3 Infección de plantas de *Nicotiana benthamiana*

Una vez se construyeron los vectores virales, la parte central del trabajo consistió en comprobar si estos inducían la síntesis de carotenoides en diversas plantas de interés agronómico susceptibles a la infección por TuMV. En primer lugar, para probar la capacidad de infección de las construcciones, se agroinfiltró plantas de *N. benthamiana* con los vectores construidos. Los vectores virales, vehicularizados gracias a *A. tumefaciens*, fueron inyectados por agroinfiltración. Para los cuatro clones infecciosos en estudio (TuMV-JPN1, TuMVJPN1-crtB, TuMV-UK1, TuMVUK1-crtB) se inocularon 6 plantas por clon, así como una maceta control con 3 plantas sin inocular.

A partir del análisis visual de las plantas inoculadas con cada aislado viral se observó que todos los clones TuMV-JPN1, TuMVJPN1-crtB, TuMV-UK1 y TuMVUK1-crtB son infecciosos. Los resultados, además, mostraron que el aislado UK1 era más agresivo que el JPN1, tal y como se preveía (figuras 16, 17 y 18). Sin embargo, la visualización de focos de infección amarillos, presumiblemente producidos por un aumento de síntesis

de carotenoides en el tejido foliar no fue muy clara. En el caso del TuMV-UK1 y TuMVUK1-crtB, los resultados parecen indicar que el virus es demasiado agresivo para que en las plantas de *N. benthamiana* se produzcan carotenoides, ya que tanto con la fitoeno sintasa como sin ella el virus produce una sintomatología general similar (figura 16). A partir de los 6 días post infección (dpi), la clorosis, necrosis de ciertas partes de la planta y el marchitamiento es común a ambos aislados sin que la activación de la síntesis de carotenoides sea apreciable. Sin embargo, este virus más agresivo no se descartó, pues podría presentar una mayor eficacia al infectar el resto de especies de plantas de interés en este estudio.



Figura 16- Plantas de *N. benthamiana* a los 7 dpi infectadas por el TuMV-UK1 (izquierda) y TuMVUK1-crtB (derecha). En ambos casos no se observa pigmentación amarilla, sino un declive muy precoz de la planta con marchitamiento y focos de infección incoloros propios del virus sin modificar.

En las plantas de *N. benthamiana* inoculadas con los vectores TuMV-JPN1 y TuMVJPN1-crtB, por el contrario, sí que se observó una clara diferencia en sus síntomas al comienzo de la infección. A partir del séptimo día, el 80% de las plantas inoculadas con el clon infeccioso con el crtB mostraron focos de infección de color amarillo (Figura 17). Se trata de una coloración amarilla alrededor de los vasos del tejido foliar, señal de que la síntesis de carotenoides está teniendo lugar, ya que se superpone al color verde habitual de la clorofila. En el caso de las plantas con los clones de TuMV-JPN1 sin el crtB, esta coloración no se observa en ningún caso. A partir de los 25 dpi, sin embargo, en ambas plantas las nuevas hojas que comenzaron a crecer parecían libres de virus y éste no fue capaz de inducir la síntesis de carotenoides en las hojas más distales.



Figura 17- Plantas de *N. benthamiana* a los 7 dpi infectadas por el TuMV-JPN1 (izquierda) y TuMVJPN1-crtB (derecha). En el segundo caso se aprecia el color amarillo de algunas hojas.



Figura 18- Detalle de las hojas de *N. benthamiana* a los 7 dpi de una planta control e infectadas con TuMV-UK1, TuMVUK1-crtB, TuMV-JPN1 y TuMVJPN1-crtB, respectivamente.

Es destacable que las plantas control se mantuvieron en perfecto estado durante todo ese tiempo, mostrando además un crecimiento superior respecto a las plantas infectadas, hasta el final del experimento (figura 19).



Figura 19- Planta control de *N. benthamiana* de la misma edad que las infectadas.

N. benthamiana es la planta modelo por excelencia en estudios de virología de plantas. Esta especie tiene dos genes que codifican RNA polimerasas dependientes de RNA (RdRP), y uno de estos genes posee una inserción de 72 nucleótidos, que limita mucho su actividad. Esta enzima es inducible por infecciones virales y limita la acumulación de los viriones. La deficiencia de actividad de la RdRP hace que *N. benthamiana* sea hipersusceptible a las infecciones por virus vegetales de RNA (Yang et al., 2004). Por este motivo fue la planta elegida para analizar la infectividad de los vectores construidos. Además de observar o no infección, los tiempos a los que esta se manifiesta son muy importantes para evaluar la agresividad del virus y su interacción con la planta, ya que el objetivo es que la producción de carotenoides sea abundante y rápida, antes de que las plantas presenten síntomas graves de infección. Por ello se evaluaron dos tipos de aislados de TuMV, el JPN1, un aislado menos agresivo y el UK1, más agresivo, que produce síntomas con mayor presteza. Esta diversificación es muy importante, porque las plantas en las que se quiere llevar a cabo la producción de carotenoides pertenecen a una familia diferente a *N. benthamiana*, no son plantas modelo y no se tienen indicios de como responderán ante el virus. La observación directa de las plantas de *N. benthamiana* sugiere que cuando se agroinfiltró con los aislados TuMV-JPN1 y TuMVJPN1-crtB el movimiento del virus fue muy similar al ocurrido con el TEV-Ros1 en la infección de *Nicotiana tabacum* (Bedoya et al., 2012). El clon de TuMVJPN1-crtB, en su movimiento sistémico se saltaba la hoja superior a la agroinfiltrada, colonizaba después casi la totalidad de la tercera y cuarta hoja por encima de la inoculada y tan solo aparecían focos de infección de color amarillo y tamaño reducido en las hojas más distales (Heinlein, 2015). Como se ha comentado previamente, las nuevas hojas que crecieron a partir de los 25 dpi aparentemente estaban libres de virus. Esta observación es coherente con que en los primeros días de

infección se produce una replicación y movimiento muy intenso del virus que va decayendo a la vez que las defensas antivirales de la planta se activan. No se puede descartar, de todos modos, la presencia mínima de partículas de TuMVJPN1-crtB en tejidos no coloreados, bien porque no están expresando la proteína o por ser insuficientes para producir coloración. Por último, en ambos casos, el TuMV-JPN1 y TuMVJPN1-crtB producen un arrugamiento de las hojas, distinguible del tejido foliar control (figura 18) y a su vez más débil que el producido por TuMV-UK1 y TuMVUK1-crtB.

Por el contrario, indiferentemente fuera el TuMV-UK1 o TuMVUK1-crtB, el virus fue demasiado agresivo para producir coloración o crecimiento de nuevas hojas ya que a los 6 dpi prácticamente había necrotizado todo el tejido foliar de las plantas inoculadas, evitando cualquier defensa por parte de éstas. Queda por comparar la interacción de estos dos aislados virales en plantas comestibles susceptibles a la infección por TuMV, con el comportamiento observado en las plantas de *N. benthamiana*.

5.4 Confirmación de la infección por RT-PCR

A pesar de que el análisis visual fue bastante claro, se realizó un diagnóstico molecular para confirmar que el virus es el causante de la coloración amarilla en el tejido foliar de *N. benthamiana*. Para ello, se hizo una retrotranscripción de RNA y una amplificación de cDNA por PCR a partir de RNA procedente del tejido foliar de las plantas inoculadas y de las plantas control. El cebador utilizado para producir el cDNA fue el D2592. Este cDNA se amplificó por PCR de forma específica. Para las plantas infectadas por clones UK1 se utilizaron los cebadores D2593 y D2594, mientras que para las plantas infectadas por JPN1 se utilizaron los cebadores D2595 y D2596. Estos cebadores amplifican dos fragmentos virales del mismo tamaño, 837 pb del cistrón CP, situado en el extremo 3' del genoma viral.

El diagnóstico molecular confirmó en los tejidos recolectados la presencia de RNA viral, tanto del TuMV-UK1 como de TuMV-JPN1, de forma que la sospecha de que la infección y coloración de las plantas se debía al aislado viral se fortaleció (figura 20).

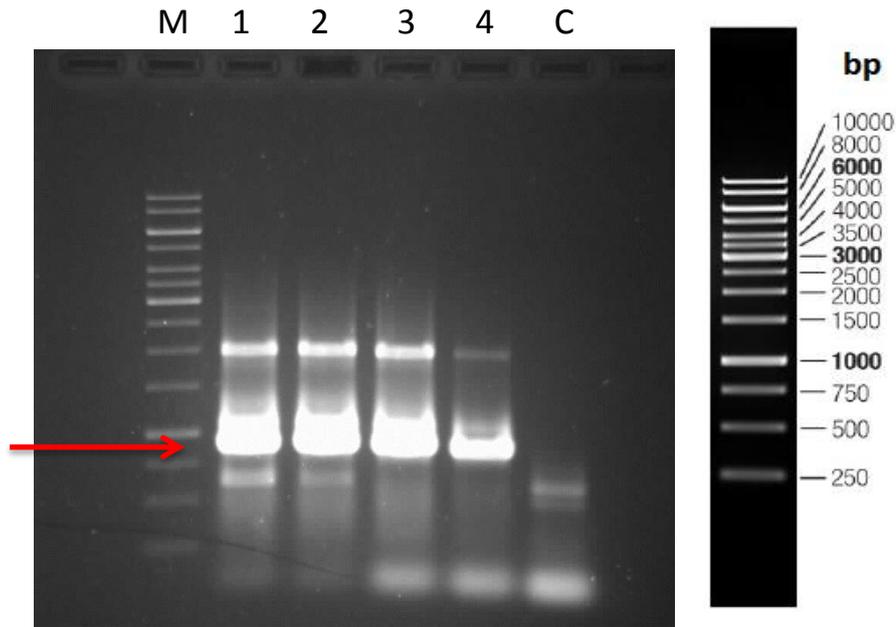


Figura 20- Gel de electroforesis tras la RT-PCR a partir de RNA de plantas de *N. benthamiana* infectadas por TuMV-UK1, TuMVUK1-crtB, TuMV-JPN1, TuMVJPN1-crtB y control respectivamente (carriles 1 a 4 y C). En el tejido control aparecen algunas bandas de amplificación inespecíficas. La flecha roja indica el producto esperado de 837 pb. Carril M, marcador de pesos moleculares (ver tamaños a la derecha).

5.5 Infección de plantas de interés agronómico

El TuMV es un miembro del género *Potyvirus* con la particular característica de tener un rango de huéspedes muy amplio (Feng et al., 1990). Esta propiedad lo hace un gran candidato para probar la funcionalidad de los vectores derivados del TuMV en multitud de especies de interés agronómico. Numerosos miembros de la familia *Brassicaceae* como la col de bruselas (*Brassica oleracea*), el rábano (*Raphanus sativus*) o el nabo (*Brassica rapa*) pueden ser infectadas por el TuMV (Shattuck, 2010). Sin embargo, dada la amplia variedad de huéspedes susceptibles presentes en otras familias vegetales, la búsqueda se centró en plantas cuya parte comestible fueran las hojas verdes. De esta forma, el cambio de color esperado derivado de la síntesis de carotenoides sería más espectacular. Las especies seleccionadas fueron inoculadas mecánicamente a partir de tejido infectado obtenido de las plantas agroinfiltradas de *N. benthamiana*. La relación de especies ensayadas se muestra en la tabla 3.

Tabla 3- Relación de especies comestibles inoculadas con los virus vectores construidos derivados del TuMV

Especie	Familia	Resultado
Lechuga romana (<i>Lactuca sativa</i> var romana)	<i>Asteraceae</i>	Negativo
Lechuga capitata (<i>Lactuca sativa</i> var capitata)	<i>Asteraceae</i>	Negativo
Espinaca (<i>Spinacia oleracea</i>)	<i>Amaranthaceae</i>	Parcialmente positivo
Acelga (<i>Beta vulgaris</i> var. Cicla)	<i>Chenopodiaceae</i>	Negativo
Rúcula (<i>Eruca vesicaria</i> var sativa)	<i>Brassicaceae</i>	Positivo
Canónigos (<i>Valerianella locusta</i>)	<i>Valerianaceae</i>	Negativo

En una primera aproximación, en la que se utilizaron 6 plantas para cada una de las cuatro construcciones virales, se realizó una observación visual, con el objetivo de clasificar y seleccionar de forma rápida los aislados virales y las plantas en las que la interacción fuera la deseada. El primer resultado destacable es que en todas las especies ensayadas los clones TuMV-JPN1 y TuMVJPN1-crtB no produjeron síntomas aparentes de infección. Debido a su probada infectividad en las plantas de *N. benthamiana*, la conclusión es que estos aislados virales no eran lo suficientemente potentes para producir síntomas en estas especies comestibles. Por este motivo, a partir de ese momento, el proyecto se centró en el análisis de clones TuMV-UK1 y especialmente del TuMVUK1-crtB.

Respecto a estos clones infecciosos hay que destacar el resultado negativo en la infección de las dos variedades de *Lactuca sativa*, *Valerianella locusta* y *Beta vulgaris*. Estas especies, a pesar de ser huéspedes susceptibles según la bibliografía, no mostraron síntomas claros de infección en las inoculaciones por tripiclado que se realizaron (figura 21 a). Sin embargo, algunas plantas analizadas por RT-PCR (no mostrado) parecían tener el virus.

Los resultados con *Spinacia oleracea* si fueron más interesantes. La aparición de focos de infección amarillos con el TuMVUK1-crtB fue común en varias de las plantas pero tan solo en aquellas hojas inoculadas mecánicamente (figura 21 b). Este resultado demuestra que el virus es capaz de infectar a la planta, pero tiene dificultado el movimiento sistémico y hará falta un estudio futuro de los posibles mecanismos moleculares involucrados en este fenómeno.



Figura 21- (a) Planta de lechuga romana a los 20 dpi tras infección mecánica con el clon TuMVUK1-crtB. El crecimiento de la planta es normal y no aparece la sintomatología típica del TuMV. (b) Planta de espinaca a los 20 dpi tras infección mecánica con el clon TuMVUK1-crtB. Se aprecia la aparición de focos de infección de color amarillo en la hoja inoculada.

Los resultados más prometedores tuvieron lugar en las plantas de *Eruca vesicaria* var *sativa*, denominada comúnmente rúcula. En estas plantas la coloración amarilla fue intensa extendiéndose a gran parte del tejido foliar, especialmente en las zonas cercanas al borde de las hojas. Además del común arrugamiento de las hojas producidas por el TuMV-UK1, las plantas infectadas con el clon con crtB mostraron una pigmentación amarilla desde los 25 dpi (figuras 22 y 23). A pesar de que la producción de carotenoides parece estar presente, esta comienza tarde y dura breves días antes de que las plantas analizadas empezaran a colapsar como consecuencia de la infección viral, hecho que comenzaba aproximadamente a los 30 dpi. Se hicieron múltiples réplicas de infección en plantas de rúcula y, en todas, el resultado fue muy similar. Cuando la coloración amarilla era evidente, simultáneamente la planta comenzaba a mostrar síntomas de infección y una reducción de crecimiento. Este hecho por un lado parece demostrar que hay una expresión simultánea de la enzima crtB y de la poliproteína vírica que indicaría el origen viral y el uso de los precursores citoplasmáticos para la síntesis de β -caroteno en la planta. Sin embargo, el objetivo de obtener una alta producción alterando en la menor medida la homeostasis de la planta parece incompatible con los resultados obtenidos.



Figura 22- Planta de rúcula infectada con TuMVUK1-crtB a los 28 dpi.



Figura 23- (a) Detalle del tejido foliar de plantas de rúcula control a los 28 dpi. (b) Detalle del tejido foliar de plantas de rúcula TuMV-UK1 a los 28 dpi. (c) Detalle del tejido foliar de plantas de rúcula TuMV-UK1-crtB a los 28 dpi. Se aprecia la diferencia de tamaño entre las hojas control y las infectadas.

Cabe destacar que tal y como se aprecia en las figuras 22 y 23 la síntesis de carotenoides no es apreciable en la zona más distal de la hoja, en dirección al crecimiento de la misma, en un mecanismo que recuerda a la menor propagación del virus TuMVJPN1-crtB en las plantas de *N. benthamiana* a medida que los días pasan y se activan las defensas antivirales de las plantas de rúcula. En el caso de las especies en las que no hay una infección clara, probablemente serán las propias defensas antivirales de la planta las que son capaces de controlar la replicación y movimiento del virus, no mostrando por tanto coloración amarilla ni sintomatología clara. Esto probablemente se deba a que se han utilizado semillas comerciales, muchas de las cuales contienen híbridos menos susceptibles a ciertas enfermedades debido a cruces de las variedades de interés agronómico con variantes naturales resistentes (Zink y Duffus, 1970).

Por último, faltaría demostrar que exista una correlación entre la pigmentación amarilla y el nivel de carotenoides en los tejidos infectados (Perelló et al., 2014). El resultado esperado sería que a mayor nivel de pigmentación, mayor contenido en β -caroteno y otros derivados y una reducción en el nivel de clorofila de las hojas, que ayudaría a dilucidar los mecanismos implicados en los cambios metabólicos que produce el virus en las plantas comestibles en las que se activa la síntesis.

5.6 Optimización de los vectores virales

Los resultados experimentales de este trabajo indican que la síntesis de carotenoides no se ha activado en muchas de las plantas analizadas que, sin embargo, según la bibliografía son huéspedes del TuMV. Con el propósito de mejorar el rendimiento o de buscar posibles soluciones a este problema se plantean tres factores que han podido ser la causa de estos resultados. El primero de ellos es la interacción planta-virus, que incluiría el transporte, por ejemplo en el caso de la espinaca, o la mayor dificultad para el virus de replicarse en la planta debido a la inserción en su genoma de un nuevo cistron (Majer et al., 2015). El segundo puede deberse a la secuencia del gen insertado. La secuencia de la enzima fitoeno sintasa fue obtenida de la bacteria *P. ananatis*, una bacteria patógena tanto de plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas, que es también capaz de infectar humanos (Coutinho et al., 2009). El uso de la secuencia, denominada crtB de esta bacteria no es casualidad, ya que su enzima es muy activa, y en cultivo en placa las colonias tienen una pigmentación amarilla debido al β -caroteno. Sin embargo, la inserción bajo el control de un virus puede modificar la expresión de esta proteína reduciendo su rendimiento. El tercer factor podría ser la propia optimización de la secuencia viral. Por ejemplo, la eliminación de los sitios críticos de splicing del genoma viral, que suelen resultar en RNA mensajeros con alteraciones en la pauta de lectura (Gleba et al., 2007) dando lugar a proteínas truncadas no funcionales, o a la pérdida de secuencias importantes para la infección natural del virus

(como P3N-PIPO), es un aspecto muy importante a tener en cuenta. En general la presencia de estos sitios críticos reduce el rendimiento de producción de la molécula de interés (Marillonnet et al., 2016).

Por el contrario, las plantas de rúcula infectadas con el TuMVUK1-crtB mostraron una intensa coloración amarilla pero también una clara sintomatología negativa probablemente causada por el virus. La posibilidad de utilizar secuencias de localización subcelular (Majer et al., 2015), o la inducción según ciertas condiciones biológicas o por la presencia de algunas moléculas sería interesante para dirigir los carotenoides a un compartimento subcelular de interés, evaluando de esta forma si una síntesis excesiva de carotenoides en los citoplasmas celulares altera el equilibrio celular y es la causante en parte del rápido declive de la planta una vez comienza la síntesis. En este aspecto, existen gran diversidad de variantes, por ejemplo a nivel industrial lo que interesa es tener la enzima fuera de la célula, en el apoplasto para que ésta o el producto de su metabolismo sea fácilmente recolectable. Es sencillo y barato luego purificar la proteína, a partir del líquido intersticial alrededor de las células en el que suele haber pocos contaminantes. Esto se consigue con un péptido de secreción de entre 12 a 16 aminoácidos añadido estratégicamente en la secuencia (Majer et al., 2015). También podría ser interesante localizar los metabolitos en la vacuola, orgánulo que principalmente sirve de almacén y detoxificador, con lo que se podría aliviar el posible efecto tóxico de los carotenoides. Sin embargo, la localización de los precursores naturales necesarios para la síntesis de carotenoides está en el citoplasma, por lo que una relocalización posterior se antoja sumamente desafiante.

5.7 Perspectivas futuras

Según los resultados de este trabajo, en las plantas de rúcula en las que se ha conseguido la síntesis de carotenoides el mayor problema es el declive paralelo de la planta causado probablemente por la infección viral. Lo ideal en este sentido sería conseguir una expresión transitoria de la enzima introducida y, llegado a un punto, poder eliminar el vector viral y observar la evolución de la planta. Lamentablemente, la eliminación de los vectores virales de plantas infectadas es muy complicado debido a que no existen antivirales dirigidos para los virus de plantas. Sin embargo, en este contexto se están realizando numerosos progresos hacia lo que puede ser el futuro de la modificación genética de plantas, utilizando vectores virales eliminables a conveniencia (Chujo et al., 2017). La base para estos vectores virales es la inserción en la secuencia viral de un sitio diana para un microRNA endógeno del huésped. Este microRNA debe ser inducible por algún factor y expresarse a un nivel bajo en el resto de situaciones para que no interfiera con la replicación y normal transporte del virus hasta el momento de su eliminación. Por ejemplo, un microRNA candidato sería el miR398. Este es un miRNA muy conservado en el reino vegetal, siendo un nodo muy

importante en la red de miRNA inducidos por estreses abióticos (Zhu et al., 2011). Su expresión se induce, por ejemplo, por una alta concentración de sacarosa en el medio, por estrés ultravioleta o por estrés hídrico, siendo por tanto fácilmente inducible de forma artificial. Además, la sobreexpresión del miR398 afecta a la germinación de semillas y al crecimiento de las plántulas en *N. tabacum* (Feng et al., 2010), hecho que sugiere que su expresión está muy regulada en condiciones fisiológicas.

Sería muy interesante evaluar esta posibilidad en el futuro, para lo que hará falta un estudio de posibles miRNA candidatos conservados entre las familias de las especies en las que se quiera activar la síntesis de carotenoides. Con esta tarea podría conseguirse la puesta a punto de un sistema seguro de producción masiva de carotenoides beneficiosos para la salud a nivel industrial, en el que las plantas podrían reutilizarse, una vez se haya eliminado el vector viral. O incluso, la producción de plantas con hojas comestibles bioseguras enriquecidas en estos compuestos, que serían más llamativas para el consumidor gracias a su pigmentación amarilla.

6. Conclusiones

1. Se han construido con éxito dos vectores virales derivado del TuMV, uno a partir del aislado TuMV-JPN1 y otro a partir del TuMV-UK1, que llevan insertados el gen de la fitoeno sintasa (crtB) de *Pantoea ananatis* entre los cistrones virales que codifican la polimerasa viral (Nlb) y la proteína de la cápside (CP)
2. Estos vectores virales son capaces de infectar plantas de *Nicotiana benthamiana* produciendo síntomas fácilmente detectables a los 6 dpi, aunque tan solo el vector TuMVJPN1-crtB induce eficazmente la síntesis de carotenoides.
3. El vector TuMVJPN1-crtB no es suficientemente potente para infectar las plantas comestibles ensayadas en este trabajo, mientras que con el TuMVUK1-crtB se obtuvo una mejor acumulación de carotenoides, particularmente en espinaca y rúcula.
4. Para seguir desarrollando el sistema de producción, sería necesario un estudio de mayor minuciosidad centrado en la interacción entre el TuMVUK1-crtB y la rúcula, así como una medida cuantitativa del nivel de carotenoides producidos en estas plantas.

7. Bibliografía

- Anyago, D. C., & Mortensen, U. H. (2015). Manipulating the glycosylation pathway in bacterial and lower eukaryotes for production of therapeutic proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 36, 122-128.
- Ayotte, R., P. M. Harney, & B. R. Christie. (1985). Inheritance of self-incompatibility in rutabaga (*Brassica napus* L. ssp. *rapifera* (Metzg.) Sinsk.). *Can. J. Gen. Cytol.* 27, 710-715.
- Bedoya, L., Martínez, F., Rubio, L. & Daròs, J. A. (2010). Simultaneous equimolar expression of multiple proteins in plants from a disarmed potyvirus vector. *J. Biotechnol.* 150, 268–275 .
- Bedoya, L. C., Martínez, F., Orzáez, D., & Daròs, J. A. (2012). Visual tracking of plant virus infection and movement using a reporter MYB transcription factor that activates anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiol.* 158, 1130-1138.
- Carrington, J. C., Haldeman, R., Dolja, V. V. & Restrepo-Hartwig, M. A. (1993). Internal cleavage and trans-proteolytic activities of the VPgproteinase (NIa) of tobacco etch potyvirus *in vivo*. *J. Virol.* 67, 6995–7000.
- Chujo, T., Yoshikawa, M., Ariga, H., Endo, M., Toki, S. & Ishibashi, K. (2017). A removable virus vector suitable for plant genome editing. *Plant J.* 91, 558–561.
- Coutinho, T. A., & Venter, S. N. (2009). *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. *Mol. Plant Pathol.* 10, 325-335.
- Dombrovsky, A., Huet, H., Chejanovsky, N., & Raccah, B. (2005). Aphid transmission of a potyvirus depends on suitability of the helper component and the N terminus of the coat protein. *Arch. Virol.* 150, 287-298.
- During, K. (1988). Wound-inducible expression and secretion of T4 lysozyme and monoclonal antibodies in *Nicotiana tabacum*. *PhD Thesis*. Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln, Germany.
- Edge, R., McGarvey, D. J., & Truscott, T. G. (1997). The carotenoids as anti-oxidants-a review. *J. Photochem. Photobiol.* 41(3), 189-200.
- Emodi A. (1978). Carotenoids: Properties and applications. *Food Technol.* 32: 38-42, 78
- Feng. L., L. Xu. & J. Liu. (1990). On turnip mosaic virus strains in cruciferous hosts. *Acta Phytopathol. Sinica* 20, 185-188.
- Feng, X.M, Qiao, Y, Mao, K. & Hao, Y.-J. (2010). Ectopic overexpression of AtmiR398b gene in tobacco influences seed germination and seedling growth. *PCTOC.* 102, 53-59.
- Gleba, Y., Klimyuk, V., & Marillonnet, S. (2007). Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18(2), 134-141.
- Grangeon R., Agbeci M., Chen J., Grondin G., Zheng H. & Laliberte JF. (2012). Impact on the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus of turnip mosaic virus infection. *J. Virol.* 86, 9255–9265.

- Grangeon R., Jiang J., Wan J., Agbeci M., Zheng H., Laliberte JF. (2013). 6K2-induced vesicles can move cell to cell during turnip mosaic virus infection. *Front. Microbiol.* 4, 351.
- Halliwell, R. S., R. H. Brlansky. & J. Johnson. (1978). Identification of turnip mosaic in Texas. *Tex. Agr. Expt. Sta. Pub.* MP-1396.
- Heinlein, M. (2015). Plant virus replication and movement. *Virology.* 479, 657-671.
- Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L., & Goycoolea, F. M. (2006). Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46(2), 185-196.
- Hollings, M., & A. A. Brunt. (1981). *Handbook of Plant Virus Inf.* Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam. Potyviruses. p. 731-807
- Hood, EE., Witcher, DR., Maddock, S., Meyer, T., Baszczynski, C., Bailey, M. Flynn, P., Register, J., Marshall, L., Bond, D., Kulisek, E., Kusnadi, A., Evangelista, R., Nikolov, Z., Wooge, C., Mehig, R.J., Ronald, H., William, K., Ritland, D., Li & C.P. Howard, J.A. (1997). Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. *Mol. Breed.* 3, 291–306.
- Horn, ME., Woodard, SL. & Howard, JA. (2004). Plant molecular farming: systems and products. *Plant Cell Rep.* 22, 711–720.
- Horsch, RB., Fraley, RT., Rogers, SC., Sanders, PR., Lloyd, A & Hoffman, N. (1984). Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science* 223, 496–498.
- Huet, F., Semama, D., Maingueneau, C., Charavel, A., & Nivelon, J. L. (1997). Vitamin A deficiency and nocturnal vision in teenagers with cystic fibrosis. *Eur. J. Pediatr.* 156(12), 949-951.
- Jenner, C. E., & Walsh, J. A. (1996). Pathotypic variation in turnip mosaic virus with special reference to European isolates. *Plant Pathol.* 45(5), 848–856.
- Kelloniemi, J., Mäkinen, K. & Valkonen, J. P. (2008). Three heterologous proteins simultaneously expressed from a chimeric potyvirus: infectivity, stability and the correlation of genome and virion lengths. *Virus Res.* 135, 282–291.
- Kong, L., R. Fang, Z. Chen, & K. Mang. (1990). Molecular cloning and nucleotide sequence of coat protein gene of turnip mosaic virus. *Nucleic Acid Res.* 18:5555.
- Lacroix, B. & Citovsky, V. (2013). The roles of bacterial and host plant factors in *Agrobacterium* mediated genetic transformation. *Int. J. Dev. Biol.* 57, 467–481.
- Li, X. H. & Carrington, J. C.(1995). Complementation of tobacco etch potyvirus mutants by active RNA polymerase expressed in transgenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 457–461.
- López-González, S., Aragonés, V., Daròs, J. A., Sánchez, F., & Ponz, F. (2017). An infectious cDNA clone of a radish-infecting Turnip mosaic virus strain. *Eur. J. Plant Pathol.* 148(1), 207-211.
- Majer, E., Llorente, B., Rodríguez-Concepción, M., & Daròs, J. A. (2017). Rewiring carotenoid biosynthesis in plants using a viral vector. *Sci. Rep.* 7, 41645.

- Majer, E., Navarro, J. A., & Daròs, J. A. (2015). A potyvirus vector efficiently targets recombinant proteins to chloroplasts, mitochondria and nuclei in plant cells when expressed at the amino terminus of the polyprotein. *J. Biotechnol.* 10, 1792-1802.
- Marillonnet, S., Giritch, A., Gils, M., Kandzia, R., Klimyuk, V., & 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, 6852-6857.
- Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V., & Gleba, Y. (2005). Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat. Biotechnol.* 23, 718.
- Marillonnet, S., Engler, C., Klimyuk, V., & Gleba, Y. (2016). *U.S. Patent No. 9,267,143*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Obembe, O., Popoola, JO., Leelavathi, S., Reddy, S.V. (2011). Advances in plant molecular farming. *Biotechnol. Adv.* 29, 210-222.
- Merlin, M., Gecchele, E., Capaldi, S., Pezzotti, M., & Avesani, L. (2014). Comparative evaluation of recombinant protein production in different biofactories: the green perspective. *BioMed Res. Int.* 14 pags, Article ID 136419.
- Motte, H., Vereecke, D., Geelen, D., & Werbrouck, S. (2014). The molecular path to in vitro shoot regeneration. *Biotechnol. Adv.* 32(1), 107-121.
- Perelló C., Rodríguez-Concepción M., & Pulido P. (2014). Quantification of Plant Resistance to Isoprenoid Biosynthesis Inhibitors. *Methods Mol. Biol.* Vol 1153.
- Poirier, Y., Dennis, D.E., Klomparens, K. & Somerville, C. (1992). Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants. *Science.* 256, 520-52.
- Providenti, R., R. W. Robinson, and J. W. ShaH. (1979). Chicory: A valuable source of resistance to turnip mosaic for endive and escarole. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 104, 726-728.
- Revers F, & Garcia JA. (2015). Molecular biology of potyviruses. *Adv. Virus Res.* 92, 101-199
- Ruf, S., & Bock, R. (2014). Plastid transformation in tomato. *Methods Mol Biol.* 1132, 265-276.
- Rybicki, E.P. (2010). Plant-made vaccines for humans and animals. *Plant Biotechnol. J.* 8, 620-637.
- Sánchez, F., Martínez-Herrera, D., Aguilar, I., & Ponz, F. (1998). Infectivity of turnip mosaic potyvirus cDNA clones and transcripts on the systemic host *Arabidopsis thaliana* and local lesion hosts. *Virus Res.* 55(2), 207-219.
- Sanford, J.C., Klein, T.M., Wolf, E.D., & Allen, N. (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Part. Sci. Technol.* 5, 27-37.
- Shattuck, V. I. (2010). The biology, epidemiology, and control of turnip mosaic virus. *Hortic. Rev.* 14, 199-238.

- Tomimura, K., Gibbs, A. J., Jenner, C. E., Walsh, J. A., & Ohshima, K. (2003). The phylogeny of turnip mosaic virus; comparisons of 38 genomic sequences reveal a Eurasian origin and a recent 'emergence' in east Asia. *Mol. Ecol.* 12, 2099–2111.
- Tompkins, C.M. (1934). A destructive disease of cauliflower and other crucifers. *Phytopathology.* 24, 1136-1137.
- Thomas H. & Sadras V. (2001). The capture and gratuitous disposal of resources by Plants. *Funct. Ecol.* 15, 3-12.
- Varani, J., Warner, R. L., Gharaee-Kermani, M., Phan, S. H., Kang, S., Chung, J., & Voorhees, J. J. (2000). Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. *J. Invest. Dermatol.* 114(3), 480-486.
- Venkatesh, J. & Park SW. (2012). Plastid genetic engineering in Solanaceae. *Protoplasma* 249, 981–999.
- Walker, J. C., F. J. LeBeau, & G. S. Pound. (1945). Viruses associated with cabbage mosaic. *J. Agr. Res.* 70, 379-404.
- Wan J, Basu K, Mui J, Vali H, Zheng H, & Laliberté J-F. (2015). Ultrastructural characterization of turnip mosaic virus-induced cellular rearrangements reveals membrane-bound viral particles accumulating in vacuoles. *J. Virol.* 89, 12441–12456
- Walsh J. A., & J. A. Tomlinson. (1985). Viruses infecting winter oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*). *Annu. Appl. Biol.* 107, 485-495.
- Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, Walther P, Fuller SD, Antony C, Krijnse-Locker J, & Bartenschlager R. (2009). Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe Interact.* 5, 365–375
- Vijayapalani P, Maeshima M, Nagasaki-Takekuchi N, & Miller WA (2012). Interaction of the Trans-Frame Potyvirus Protein P3N-PIPO with Host Protein PCaP1 Facilitates Potyvirus Movement. *PLoS Pathog.* 8, e1002639.
- Wan J, Cabanillas DG, Zheng H, & Laliberte JF. (2015). Turnip mosaic virus moves systemically through both phloem and xylem as membrane associated complexes. *Plant Physiol.* 167, 74-88
- Yang, S. J., Carter, S. A., Cole, A. B., Cheng, N. H., & Nelson, R. S. (2004). A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 6297-6302.
- Young AJ, & Lowe GM. (2001). Antioxidant and Prooxidant properties of carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 385, 20-7
- Zhu, C., Ding, Y. and Liu, H. (2011). MiR398 and plant stress responses. *Physiol. Plant.* 143, 1-9.
- Ziegler, R. G. (1989). A review of epidemiologic evidence that carotenoids reduce the risk of cancer. *J. Nutr.* 119, 116-122.
- Zink, F. W., & Duffus, J. E. (1970). Linkage of turnip mosaic virus susceptibility and downy mildew, *Bremia lactucas*, resistance in lettuce. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 95, 420-22.