

Universidad Nacional de la Plata

Facultad de Ciencias Exactas



DESARROLLO DE METODOS DE DIAGNOSTICO Y DE
PLANTAS TRANSGENICAS DE PAPA PARA EL CONTROL
DE INFECCIONES PRODUCIDAS POR EL VIRUS PVY

Fernando Bravo Almonacid

TESIS

La Plata, 1992

670899

DOI
A
12
Inv. 54372

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas ha sido realizado en el Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET).
Bajo la dirección del Dr. Alejandro N. Mentaberry.



a Sebastián
a Lilien
a Ela y Lalo
a Elinor y Carlos

....."Sencillamente, para pensar en el tema del área que es de nuestro interés directo, la tecnología no es otra cosa que el producto del cerebro humano, la tecnología es justamente haber llenado el universo de productos, procesos y equipos que no existían y no hubiesen existido jamás si no hubiera sido por el talento y la creatividad del hombre. No hay tecnología sin recurso humano. Por supuesto esto es una gran perogruyada que Uds. me deberán perdonar; pero cuando se hayan repuesto de la sorpresa de oír decir cosa tan trivial como que la tecnología es producto fundamental de la capacidad humana, miren alrededor, analicen la sociedad en que estamos y vean si es cierto que hemos tomado conciencia clara y plena de ese fenómeno y que obramos en consecuencia".

Jorge A. Sábato

AGRADECIMIENTOS

A Alejandro Mentaberry que aceptó dirigir este trabajo de tesis y supo constituir y sostener un grupo de trabajo que intenta hacer las cosas bien.

A mis amigos y compañeros de trabajo, Betina Orman, Silvia Cabral Ximena Ares, Liliana Haim, Rosana Celnik, Gabriela Calamante, Florencia Rodríguez, Pablo Rabinowicz, Pablo Zaltz por todo lo que me brindaron y porque están cuando los necesito.

A Silvia Cabral además, porque sin su excelente trabajo, esta tesis no tendría el capítulo de transformación.

A Danny Altschuler, por todo su apoyo cuando recién ingresaba al Instituto. A Guillermo Taccioli, Ricardo Attar y Erich Grotewold por tantos cómo, dónde y porqués respondidos con infinita paciencia.

A mis amigos Laura, Daniel, Luis y Ana, con quienes compartimos sueños y preocupaciones.

Al Dr. Héctor Torres, quién asumió la responsabilidad de sostener mi beca en los últimos meses.

A Alberto Kornblihtt, Gerardo Glikin, María Teresa Téllez-Iñón, Alejandro Gladini, Mirtha Flawiá, Mariano Levin, Luis Jimenez de Azua y Norberto Judewicz, por el apoyo brindado en el transcurso de estos años.

A las varias generaciones de compañeros del INGEBI con quienes compartí estos años de trabajo. A Graciélita Bianchini, Jorge Muschiatti, Horacio Martinetto, Omar Coso, Mercedes Goin, Leo Erijman, Albertito Díaz Añel, Marisa Farber, Diego Fraidenraich,

Veronica Illa, Malala Gómez, Rita Ulloa, Claudia Ochatt, Sandra Ogueta, Nora Paños, Viviana Bernath, Andrés Muro, Gustavito Pesce, Anabella Srebrow, Claudio Alonso, Alejo Schijman, Patricia Levy-Yeyati, Dan Kaplan, Alfredo Panebra, Martín Vázquez, Sonia Lafon, Enrique Mesri, Gabriela Levitus, Nelson Dusseti.

A Esteba Hopp y su equipo de hoppianos, con quienes comencé mi tarea de investigación

A Olga Gracia, Fernando Nome, Delia Docampo, Maria Luisa Mayoral, y a los amigos del CIGB, por la propagación de la cepa y facilitarme anticuerpos utilizados en este trabajo.

A Tito Contreras, Luis Acosta, Norberto Malarini, Nené Parodi, María Julia Alvarez, Leonor Acevedo, Irma Gelmi, Gabriel Paissan, Adriana Urman, Mariano Rodriguez y Marta Judewicz por su invaluable apoyo técnico.

A la CIC-BA, no se si agradecerles por el tiempo que me otorgaron la beca, o dejar constancia aquí de la irresponsabilidad de los últimos meses. Que quede esto entonces como agradecimiento-crítica.

Finalmente, el agradecimiento más importante a quienes fueron mi refugio y contención, Lili y Sebi.

Indice

	Pág.
<u>INTRODUCCION</u>	1-34
CLASIFICACION DE LOS VIRUS VEGETALES	2
CARACTERISTICAS DE LAS ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR LOS VIRUS VEGETALES	5
Concepto de enfermedad generalizada	5
Persistencia de la enfermedad viral	6
Principales síntomas externos	6
Inclusiones: síntoma interno específico	6
Vías de infección	7
Influencia del entorno	9
POTYVIRUS	10
PROTEINAS CODIFICADAS POR LOS POTYVIRUS	11
Proteínas asociadas al virión:	11
Proteína de cubierta	11
Proteína VPg.	12
Proteínas que se encuentran en las plantas infectadas en forma de inclusiones	13
Inclusión citoplasmática en forma de molinete	13
Inclusión citoplasmática amorfa (<i>helper component</i>)	13
Inclusiones nucleares.	14
ESTRUCTURA GENOMICA Y ORGANIZACION	14
REPLICACION	15
DISEMINACION VIRAL	17
DETECCION Y DIAGNOSTICO DE VIRUS VEGETALES	18
Métodos biológicos	19
Métodos serológicos	19
Métodos basados en la hibridación molecular	21
TRANSFORMACION DE PLANTAS	22
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	23
Desarrollo de vectores para la transferencia de genes mediada por <i>Agrobacterium</i>	26
Transferencia directa de genes	27
TRANSFORMACION DE PLANTAS Y MEJORAMIENTO VEGETAL	29
Resistencia a virus	30
Protección cruzada	30
Plantas transgénicas que expresan secuencias virales	31
Protección cruzada mediada por cápside	31
Expresión de genes no estructurales	33

<u>OBJETIVOS</u>	35
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	37-84
CEPAS Y CONDICIONES DE CULTIVO	37
<i>Escherichia coli</i>	37
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38
Cepa Viral	38
PURIFICACION DE PVY	39
Método de Gugerli	39
Método de Murphy modificado	40
AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ACIDOS NUCLEICOS	41
Purificación del gRNA a partir del virión de PVY	41
Preparación de plásmidos	42
Purificación del DNA de bacteriófagos λ recombinantes	43
Preparación de ssDNA (Bluescript)	45
MARCACION DE SONDAS	46
Marcación por <i>multipriming</i>	46
Marcación por <i>nick translation</i>	46
Preparación de sondas sulfonadas	47
Eliminación de nucleótidos no incorporados	48
METODOS ELECTROFORETICOS	49
Electroforesis de DNA	49
Agarosa nativa	49
Agarosa alcalina	49
Aislamiento de fragmentos de DNA por electroelución	50
Geles desnaturalizantes	51
Electroforesis de RNA en geles de agarosa	52
Electroforesis de proteínas	52
Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa	53
Transferencia por peso	54
CONSTRUCCION DE UNA BIBLIOTECA DE cDNA EN EL FAGO VECTOR λgt11	54
Síntesis de cDNA por el método de Gubler & Hoffman.	54
Síntesis de la primer cadena	54
Síntesis de la segunda cadena	55
Metilación de los sitios EcoRI del cDNA	56
Rellenado por <i>fill-in</i> de los sitios 3' recesivos	57
Ligación de <i>linkers</i> EcoRI	57
Digestión con la enzima EcoRI para generar extremos cohesivos	58
Separación del exceso de <i>linkers</i> y fraccionamiento por tamaño de los cDNAs	58
Clonado de los cDNAs en el vector λ gt11	59
Determinación de la relación óptima inserto/brazos del vector en la mezcla de ligación	59

Empaquetamiento <i>in vitro</i> del DNA ligado	60
Obtención de bacterias RY1090 competentes	60
Plaqueo de la biblioteca de λ gt11 en bacterias RY1090	60
Titulación de los fagos recombinantes	61
Amplificación de la biblioteca en λ gt11	61
CONSTRUCCION DE UNA BIBLIOTECA DE cDNA EN EL PLASMIDO VECTOR pUC13	62
SUBCLONADO DE FRAGMENTOS DE DNA EN PLASMIDOS	62
Preparación de vectores e insertos	62
Reacciones de ligación de DNA	63
Preparación de bacterias competentes, <i>E. coli</i>	64
Transformación	65
Preparación de bacterias competentes, <i>A. tumefaciens</i>	66
Transformación	66
IDENTIFICACION DE SECUENCIAS POR HIBRIDACION	67
Identificación de colonias recombinantes	67
Identificación de secuencias de DNA (<i>Southern-blot</i>)	68
Identificación de secuencias de RNA (<i>Northern-blot</i>)	69
Condiciones de hibridación	69
TOMA DE MUESTRAS PARA DIAGNOSTICO.	70
<i>Squash-blot</i>	70
Preparación de muestras para <i>Dot-blot</i>	71
SECUENCIACION DE DNA	73
Secuenciación de DNA de cadena simple	73
Secuenciación de DNA plasmídico de cadena doble	73
TENICAS INMUNOLOGICAS	74
<i>Screening</i> serológico de la biblioteca construída en λ gt11	74
Soluciones y <i>buffers</i>	74
Anticuerpos Utilizados	74
Transferencia a nitrocelulosa de las proteínas producidas por los fagos recombinantes e inducción con IPTG	74
Deteccion inmunológica de las proteínas recombinantes	75
Aislamiento de un clon positivo	76
Detección por <i>squash-blot immunoassay</i> (SBIA)	76
<i>Western-blot</i>	78
<i>Dot-ELISA</i>	78
<i>Enzyme-linked immunoabsorbent assay</i> (ELISA)	78
Protocolo de inmunización y purificación de anticuerpos	79
TRANSFORMACION DE TUBERCULOS DE PAPA MEDIANTE <i>A. tumefaciens</i>	80
Desinfección del material	80
Obtención de los discos	80
Cocultivo	80
Transferencia a medio selectivo	81
Repique de los brotes	82
Rusticacion	82

DETECCION DE MARCADORES	82
Ensayo de actividad β -glucuronidasa	82
Ensayo de actividad de npt II.	83
 <u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	 85-149
 CLONADO MOLECULAR DEL GENOMA DEL PVY	
Purificación de partículas virales de PVY	85
Purificación del gRNA viral	85
Síntesis de cDNA viral	88
Clonado de los cDNAs en el vector λ gt11	88
Rastreo inmunológico de la biblioteca	91
Caracterización de los clones conteniendo secuencias de la proteína de cubierta	91
Determinación de la secuencia nucleotídica de los clones recombinantes	94
 DESARROLLO DE UN METODO DE DIAGNOSTICO POR HIBRIDACION MOLECULAR PARA EL VIRUS PVY	 100
Preparación de las muestras	101
Especificidad de la sonda molecular	101
Sensibilidad de la detección: hibridación directa	103
Sensibilidad de la detección: hibridación indirecta	103
Detección de PVY en muestras de papa provenientes del campo	105
Discusión	105
 OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI-PVY UTILIZANDO COMO ANTIGENO UNA PROTEINA RECOMBINANTE PRODUCIDA EN <i>E.COLI</i>	 108
Construcción del plásmido pRIT2T-Y	108
Producción y caracterización de la proteína de fusión	108
Purificación de la proteína de fusión	110
Producción y análisis de los anticuerpos obtenidos contra la proteína de fusión	110
Discusión	113
 DESARROLLO DE LA TECNICA DE <i>SQUAH-BLOT IMMUNOASSAY</i> (SBIA)	 116
Especificidad del método	116
Sensibilidad del SBIA	116
Detección de PVY y PVX en muestras provenientes del campo	118
Detección de PVY y PVX en distintos tejidos de papa y en tubérculos en distintos estadios de brotación	124
Discusión	127
 EXPRESION DE UN GEN QUIMERICO DE CAPSIDE DEL VIRUS PVY EN PLANTAS TRANSGENICAS DE PAPA	 129
Construcción de un gen quimérico de la cápside viral	129
Construcción de una nueva biblioteca de cDNA del virus PVY	129
Purificación del RNA viral y síntesis de cDNA	130
Construcción del plásmido pBS5'AUGCAP	131
Introducción del gen quimérico en un vector de expresión vegetal	131

Transformación de <i>A. tumefaciens</i> con los plásmidos pBI-121 y pBI-PVY	134
Transformación genética de plantas de papa	136
Ensayo de actividad de la enzima β -glucuronidasa	139
Ensayo de actividad de la enzima neomicina fosfotransferasa	143
Análisis de las plantas transgénicas mediante la técnica de PCR	143
Análisis de las plantas mediante la técnica de <i>Western-blot</i>	147
Discusión	147
<u>CONCLUSIONES</u>	150
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	153

Introducción

Los virus de plantas son responsables de pérdidas considerables en la producción agrícola mundial. El *Sharka* o viruela de los durazneros, damascos y ciruelos, ha diezclado durante los últimos 15 años a este conjunto de frutales en Francia, así como la tristeza, producida por el *citrus tristeza virus*, había devastado los cítricos de Argentina, Uruguay y Brasil, en 1920. La acción conjunta del *potato leaf roll virus* (PLRV) y del *potato virus Y* (PVY), produce una enfermedad degenerativa de considerable gravedad en las plantas de papa. En ciertos años y en determinadas regiones europeas, el *rice dwarf virus* (RDV), el *tomato spotted wilt* (TSWV) y el *cucumber mosaic virus* (CMV), han llegado a afectar hasta el 100% de las producciones de arroz, tomate y melón, respectivamente (Bols L., 1982).

La adopción de medidas de control de los vectores que transmiten a los virus, el uso de material vegetal libre de virus y la introducción en ciertos cultivares de genes de resistencia mediante técnicas de mejoramiento vegetal, han permitido controlar en parte los efectos de estos patógenos. Estas medidas de control presentan, sin embargo, ciertas desventajas y limitaciones.

Por una parte, los insecticidas utilizados para eliminar los vectores virales son responsables de una creciente contaminación y deterioro del medio ambiente. Por la otra, la utilización de plantas libres de virus requiere del desarrollo de métodos de diagnóstico que certifiquen esta calidad, los que deben ser sencillos, económicos y transferibles a laboratorios de baja complejidad para implementar su utilización masiva de los mismos.

La introducción de resistencia por medio del mejoramiento clásico es una tarea compleja ya que los caracteres de interés agronómico son generalmente poligenéticos ó se encuentran asociados a características no deseadas. Mas aún, para poder hacer los

cruzamientos es necesario identificar a los genes de resistencia en variedades genéticamente compatibles con el cultivar a mejorar.

El creciente desarrollo de la transformación de especies vegetales, en combinación con otras técnicas de la ingeniería genética, ha permitido introducir en plantas genes de distintas especies, logrando que estos nuevos caracteres se incorporen en forma estable al genoma de las mismas y se transmitan a su descendencia. Así, en los últimos años se han obtenido plantas transgénicas con mayor resistencia a enfermedades virales, al ataque de insectos o tolerantes a dosis normalmente letales de herbicidas, las que sin duda tendrán un gran impacto en la producción agrícola mundial.

CLASIFICACION DE LOS VIRUS VEGETALES

Se ha intentado clasificar a los virus vegetales de acuerdo a distintos criterios, tales como la morfología del virión, el rango de huésped, o la serología (Van Regenmortel, M.H.V., 1982). La clasificación utilizada actualmente se basa en la naturaleza y estructura del material genético (Matthews, R.E.F., 1981). En la Tabla 1 se muestran los distintos grupos virales actualmente aceptados y sus miembros tipo. En la Figura 1 se puede apreciar un diseño esquemático de las morfologías correspondientes a estos mismos grupos representativos.

La gran mayoría de los virus vegetales poseen genomas a RNA y excepto para aquéllos asociados con las familias *Reoviridae* (RNA bicatenario) y *Rhabdoviridae* (RNA monocatenario), dichos genomas tienen polaridad positiva. Esto significa que el RNA viral tiene la misma polaridad que un RNA mensajero (mRNA). En algunos de estos virus el genoma completo está compuesto por una sola molécula de RNA (genoma monopartito) mientras que en otros está

Characterization	Family or group	Number of members	Number of probable or possible members	Total	
dsDNA nonenveloped	<i>Caulimovirus</i>	8	6	14	
	Commelina yellow mottle virus group	1	0	1	
ssDNA nonenveloped	<i>Geminivirus</i>	11	14	25	
dsRNA nonenveloped	<i>Cryptovirus</i>	13	13	26	
	Reoviridae	9	0	9	
ssRNA enveloped	Rhabdoviridae	11	66	77	
	Bunyaviridae	1	0	1	
ssRNA nonenveloped					
<i>Monopartite genomes</i>					
Isometric particles	<i>Carmovirus</i>	7	8	15	
	<i>Luteovirus</i>	11	16	27	
	<i>Marafivirus</i>	5	0	5	
	MCDV group	1	1	2	
	<i>Necrovirus</i>	1	1	2	
	<i>Potexvirus</i>	18	21	39	
	PYFV group	2	1	3	
	<i>Sobemovirus</i>	2	8	10	
	<i>Tobamovirus</i>	12	3	15	
	<i>Tombusvirus</i>	10	3	13	
	<i>Tymovirus</i>	18	1	19	
	Rod-shaped particles	<i>Capillovirus</i>	2	2	4
		<i>Closterovirus</i>	11	1	12
		<i>Carlavirus</i>	27	23	50
<i>Potyvirus</i>		50	70	120	
<i>Bipartite genomes</i>					
Isometric particles	Comovirus	16	0	16	
	Dianthovirus	3	0	3	
	Fabavirus	3	0	3	
	Nepovirus	26	8	34	
	PEMV	1	0	1	
Rod-shaped particles	<i>Furovirus</i>	3	4	7	
	<i>Tobravirus</i>	3	0	3	
<i>Tripartite genomes</i>					
Isometric particles	<i>Bromovirus</i>	4	1	5	
	<i>Cucumovirus</i>	3	1	4	
	<i>Ilarvirus</i>	11	2	13	
Isometric and bacilliform particles	AMV	1	0	1	
Rod-shaped particles	<i>Hordeivirus</i>	3	1	4	
<i>Quadripartite genomes</i>					
Rod-shaped particles	<i>Tenuivirus</i>	3	4	7	
Total		312	279	590	

Tabla 1. Familias y grupos de virus vegetales.

Las 35 familias y grupos virales aceptados hasta el presente se han ordenado teniendo en cuenta la morfología de la partícula y el tipo de ácido nucleico que constituye su genoma, (tomado de Matthews, 1991).

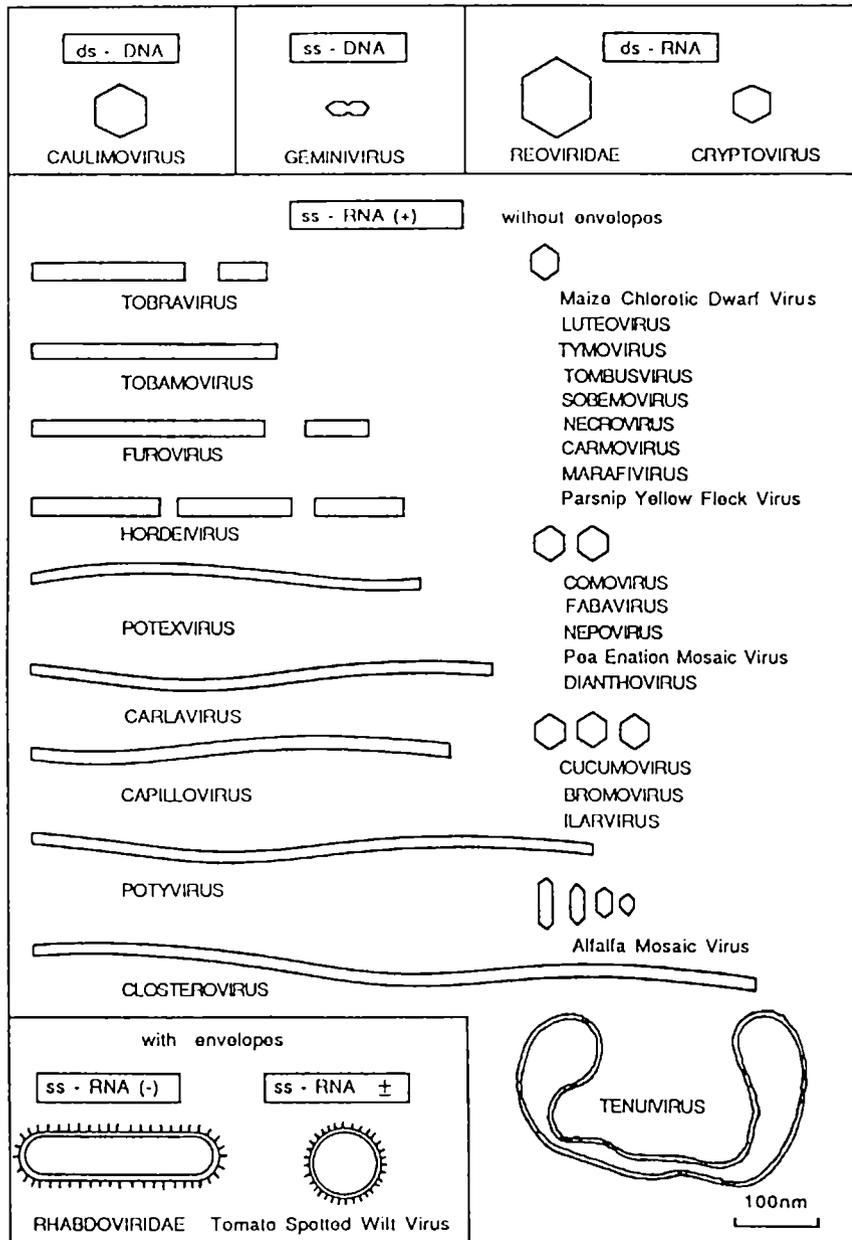


Figura 1. Diseño esquemático de las familias y grupos de virus de plantas. (tomado de Matthews, 1991).

compuesto por dos, tres o cuatro moléculas (genomas bi, tri y cuatripartitos, respectivamente). Existen, además, virus con genomas a DNA mono y bicatenarios.

CARACTERISTICAS DE LAS ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR LOS VIRUS VEGETALES

Las virosis vegetales son generalizadas, persistentes, frecuentemente transmitidas por insectos y ocasionan a la planta síntomas variables que generalmente no producen la muerte de los tejidos (Cornuet, P. 1987).

Concepto de enfermedad generalizada

El desarrollo de una enfermedad generalizada sirve usualmente para distinguir entre las enfermedades causadas por virus y las causadas por bacterias, las que generalmente producen síntomas localizados, permaneciendo sano el resto de los tejidos. Las virosis vegetales, por el contrario, afectan paulatinamente todas las partes de la planta: raíz, tallo, hojas y flores. Es claro que, en este proceso, existen numerosas excepciones y límites. La infectividad del virus en el tejido vegetal es función de: 1) su velocidad de replicación; 2) su capacidad de migración; y 3) la reacción de la planta huésped frente a estas dos primeras características. La interacción entre estas variables puede crear un amplio espectro de situaciones.

Existe una fuerte heterogeneidad en la distribución de un virus vegetal a nivel tisular y celular. A nivel de la célula, numerosos virus se acumulan en el citoplasma, otros lo hacen en vesículas citoplasmáticas (como el *cowpea mosaic virus*), y otros, como el *pea enation mosaic virus*, se sitúan en el núcleo. A nivel tisular, la especialización es aún más marcada que en los virus

que atacan a los animales. Se distinguen dos grupos principales: 1) los virus que provocan "mosaico" que invaden generalmente tejido de los parénquimas lacunar y de empalizada y, 2) los virus que producen amarilleamiento (por ejemplo, luteovirus) que se localizan en el líber (o corteza interna) y células adyacentes.

Persistencia de la enfermedad viral

Los virus vegetales provocan enfermedades persistentes. Esto quiere decir que una vez que la planta ha sido infectada, lo estará para el resto de su existencia (Cornuet, P. 1987). La epidemiología de las virosis vegetales es influenciada así por la persistencia de la infección. El vegetal enfermo permanece como una fuente de virus toda su vida y la epidemia progresa lenta e inexorablemente sin riesgo de extinguirse.

Principales síntomas externos

Los síntomas de las enfermedades producidas por virus vegetales constituyen otro grupo de caracteres originales. Aunque por el momento no se sabe a qué corresponden a nivel molecular, puede imaginarse globalmente que los síntomas virales resultan de la interacción entre el efecto depresivo de la multiplicación del virus y la reacción de defensa de la planta.

Es probable que, además del efecto de competencia por los aminoácidos y los nucleótidos durante la replicación viral, se ocupen, en el transcurso de este proceso, sitios de la membrana celular que acarreen el bloqueo de funciones importantes.

Inclusiones: síntoma intracelular específico

Dentro de las células de plantas infectadas se pueden observar diversos elementos asociados a la infección viral. Estos elementos, visibles al microscopio óptico, constituyen las deno-

minadas inclusiones. Las mismas pueden ser cristalinas o amorfas, y se observan mejor dentro de células donde la infección es de larga data. Están constituidas por acúmulos de partículas virales o de proteínas codificadas por el virus. Las inclusiones son en general específicas del virus y de la cepa y se han propuesto métodos de diagnóstico basados en la observación de estos elementos. Los potyvirus son particularmente ricos en diversos tipos de inclusiones. En la Figura 2 se observan algunos ejemplos de estas inclusiones.

Vías de infección

En numerosas enfermedades comunes de las plantas se encuentran generalmente esporas adaptadas a la diseminación por aire o por agua. En el caso de los virus vegetales, no hay una contaminación directa por polución del aire o del agua. Es necesario que haya un contacto real entre la planta enferma y la planta sana, ya sea a través de heridas recíprocas o más comúnmente, por un vector animal (generalmente insectos) que tome el virus de una planta enferma, lo transporte y lo inocule en una planta sana.

Cada virus está asociado, con una gran especificidad, a un tipo determinado de vector. A nivel molecular, se podría concebir que ciertas secuencias de aminoácidos de la superficie de la cápside viral tienen una alta afinidad por las proteínas estructurales de la superficie de ciertos órganos del vector (estiletes del pulgón u odontostilo de nemátodo).

Para ciertos virus vegetales, es posible la transmisión por semilla, polen o por contacto directo. Los potexvirus, por ejemplo, se encuentran en alta concentración dentro de la célula, siendo éste uno de los factores que le permiten transmitirse por contacto directo de planta a planta; por otra parte, no cuentan con insectos vectores. Este tipo de virus (es decir, no transmisibles por vectores) sólo se encuentra en cultivos que reúnen un

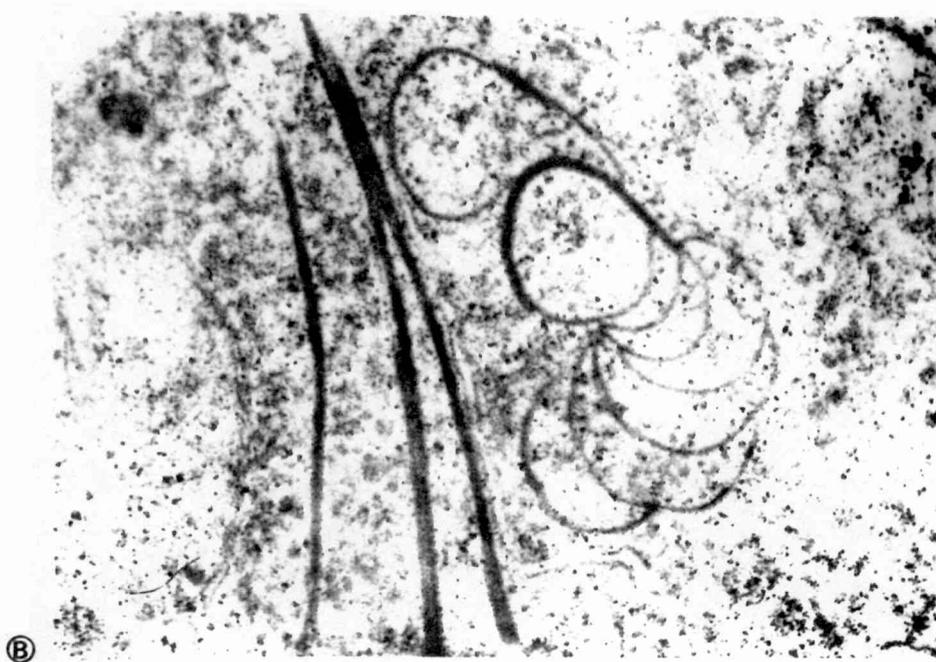
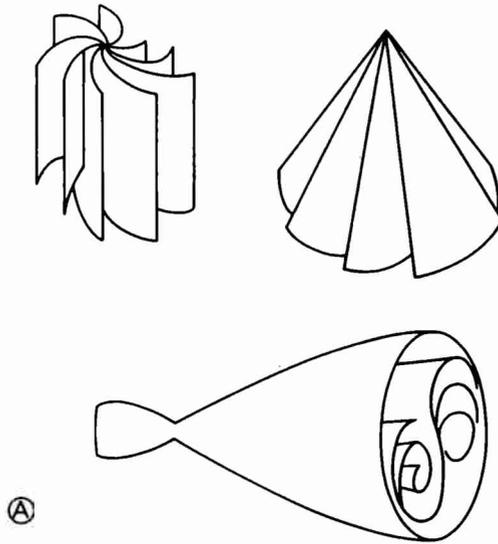


Figura 2. Inclusiones características de los Potyvirus.
A: Diseño esquemático de los molinetes o *Pinhweels*.
B: Microscopía electrónica de los mismos.

gran número de individuos sensibles y genéticamente idénticos, como ser la papa o plantas hortícolas sometidas a un modo de multiplicación anormal. Así, estos tipos de virus están asociados a la agricultura y horticultura.

Los ilarvirus están adaptados a la transmisión por polen. Por este motivo, se encuentran en árboles frutales donde cada individuo produce una gran cantidad de polen, lo que compensaría en parte la ineficacia de este tipo de transmisión.

Evidentemente la agricultura y principalmente el modo de propagación vegetativa, es una causa del desarrollo de enfermedades a virus. Todas las especies donde se utilizan tubérculos, bulbos, estolones, acodos, esquejes e injertos para la multiplicación acumulan diversos virus, ya que la infección es persistente. De todos estos, aquellos virus transmitidos por semilla son la causa actual de las principales pérdidas en agricultura.

Influencia del entorno

Las enfermedades producidas por virus vegetales son muy sensibles a la influencia del medio, de la nutrición, de la luz ambiente, de la temperatura y de la humedad. Estos factores pueden intervenir independientemente o en conjunto para modificar los síntomas. El clima especializa el tipo de enfermedad y puede tornar en predominante un número restringido de posibles transmisiones. En clima seco, desértico o muy frío, la mayoría de los virus se transmiten por semilla.

POTYVIRUS

El grupo de los Potyvirus es el más grande y económicamente el más importante de los 35 grupos y familias de virus de plantas actualmente reconocidos (Matthews, 1991; Brown, 1986). Contiene 120 miembros que representan el 20% de los virus que afectan distintos cultivos en todo el mundo (Francki, 1985). La mayoría de los miembros de la familia poseen un número de huéspedes limitado y esta especialización minimiza la competencia entre ellos. Se transmiten en la naturaleza por distintas especies de áfidos, mecánicamente y a través de las semillas de plantas infectadas. Estas características, sumadas a la gran variedad de cultivos que son afectados por potyvirus, aseguran su presencia en el campo a lo largo de todo el año.

Todos los miembros de la familia comparten ciertas características comunes. Las partículas virales tienen forma de bastones flexuosos de 700-900 nm de largo y 12-15 nm de diámetro, sus genomas están compuestos por una única molécula de RNA de polaridad positiva de aproximadamente 10.000 nucleótidos de longitud, poseen en su extremo 5' una proteína (VPg) unida covalentemente y el extremo 3' se encuentra poliadenilado. Todos los miembros codifican para una proteína que se acumula en el citoplasma como un cuerpo de inclusión que toma forma de molinetes.

Las partículas poseen un coeficiente de sedimentación de 150 S, contienen 5% de RNA y 95% de proteína. Los viriones están formados por 2.000 copias de una misma proteína de cubierta y una copia de la proteína Vpg.

PROTEINAS CODIFICADAS POR LOS POTYVIRUS

Proteínas asociadas al virión:

Proteína de cubierta

Es el componente mayoritario del virión con aproximadamente 2.000 unidades monoméricas por molécula de RNA (Hollings *et al.*, 1981). Las subunidades monoméricas de las proteínas de cubierta de distintos potyvirus varían en tamaño entre 30-45 kd. Se ha descrito para varios potyvirus la presencia de más de una banda en geles de poliacrilamida de preparaciones de virus purificado. La razón de la existencia de más de una banda se debería según Huttinga y Mosch (1974) a degradación durante los pasos de purificación por acción de proteasas del huésped o microbianas. Shukla *et al.* (1988b) demostraron que la degradación involucra la remoción de los extremos amino y carboxilo de la proteína y que por tratamiento con tripsina, en 6 virus probados, se liberan 30 residuos del extremo amino y entre 18 a 20 del extremo carboxilo. Las partículas tratadas fueron indistinguibles de las no tratadas, por observación al microscopio electrónico y mantenían la infectividad. Esto sugiere que los extremos amino y carboxilo de la proteína estarían orientados hacia el exterior en el virión.

Se han determinado directamente las secuencias aminoacídicas de las proteínas de cubierta correspondientes a PVY (Shukla *et al.*, 1986, 1988c), *sugarcane mosaic virus* (SCMV) (Shukla *et al.* 1987) y *passion-fruit woodiness virus* (PWV) (Shukla *et al.* 1988d). Además a partir de las secuencias de cDNA se obtuvieron datos de *plum pox virus* (PPV) (Ravelonandro *et al.*, 1988), *pepper mottle virus* (PeMV) (Dougherty *et al.*, 1985a), *tobacco vein mottling virus* (TVMV) (Domier *et al.*, 1986), *tobacco etch virus* (TEV) (Allison *et al.*, 1985 a,b), PVYn (Robaglia *et al.*, 1989), PVYo (Bravo-Almonacid *et al.*, 1989) y *pepper severe mosaic virus*

(PeSMV) (Rabinowicz *et al.*, en prensa). Existen marcadas diferencias de tamaño entre las distintas proteínas de cubierta de varios potyvirus (263 a 330 aminoácidos). Estas variaciones en longitud se deben a diferencias en el extremo amino terminal (hasta 66 aa) que constituye la región más variable. En contraste, la variación en longitud en el extremo carboxilo de las proteínas de cubierta, es de solo uno o dos residuos. En el centro de las proteínas de cubierta y en el extremo carboxilo existe un cierto nivel de homología. Estas regiones conservadas estarían involucradas en interacciones proteína-proteína y/o RNA-proteína (Dougherty *et al.*, 1985).

La comparación de las secuencias de distintas cepas de un determinado virus muestran un alto grado de homología, con diferencias preferentemente localizadas en el extremo amino. Shukla y Ward (1988) compilaron las secuencias existentes al momento para distintos potyvirus y cepas, y mostraron que distintos miembros de la familia poseen un grado de homología que varía entre 38 y 71% con un promedio de 54%. Las cepas de un mismo virus poseen homologías que varían entre 90 y 99%, con un promedio de 95%. Esto sugiere una distribución bimodal de las homologías para los distintos miembros y cepas de la familia.

Proteína VPg.

Otra proteína que se puede aislar de preparaciones purificadas de potyvirus es la denominada proteína unida al genoma (VPg). En el caso de TEV se ha demostrado que la misma se encuentra unida covalentemente al extremo 5' del RNA genómico (Hari V. 1981). La función que tendría dicha proteína se ha inferido de estudios realizados en otros virus que poseen una organización genómica y una estrategia de traducción similar (Baron *et al.*, 1982, Morrow *et al.*, 1984, Vartapetian *et al.*, 1984). En los mismos esta proteína se encontraría involucrada en la iniciación de la síntesis del RNA genómico.

Proteínas que se encuentran en tejidos infectados en forma de inclusiones intracelulares.

Inclusión citoplasmática en forma de molinete

Como se mencionó previamente, en todos los potyvirus se encuentran cuerpos de inclusión proteicos, que se agregan en forma de molinete en el citoplasma y cuyo peso molecular varía entre 65 y 75 kd. La morfología de estas inclusiones es específica de cada virus. Edwardson y col. (Edwardson *et al.*, 1984), propusieron dividir taxonómicamente a los potyvirus de acuerdo con la forma de estas inclusiones.

Inclusión citoplasmática amorfa (*helper component*)

Estos cuerpos de inclusión han sido detectados en infecciones producidas por varios potyvirus pero no en todas. La cantidad de ésta proteína acumulada en el citoplasma de la planta infectada y su estabilidad han permitido su purificación y su caracterización. El componente facilitador (*helper component*) es la proteína codificada por el virus necesaria para la transmisión por áfidos. Varias evidencias indican que se tratarían de la misma proteína: i) estudios inmunológicos han demostrado que los anticuerpos que reaccionan con éstas inclusiones también lo hacen con la proteína que se encuentra mayoritariamente en la fracción purificada que posee actividad de *helper component*, ii) estos anticuerpos son capaces de inactivar a esta fracción, iii) ambas proteínas comigran en geles de poliacrilamida (de Mejía *et al.*, 1985).

Esta proteína posee además en su extremo carboxilo un dominio con actividad de proteasa involucrada en el procesamiento de la poliproteína viral.

Inclusiones nucleares.

Aunque todos los potyvirus codifican dos proteínas que pueden dar lugar a la inclusión nuclear, sólo se ha observado la agregación de estas proteínas en el núcleo, en infecciones producidas por un limitado número de potyvirus. Estas inclusiones son variables en forma (platos, cubos, bipirámides, etc.) y tamaño, dependiendo esto, no sólo del virus sino también del aislado en particular (Christie *et al.*, 1977). Están compuestos por cantidades equimoleculares de dos proteínas. En TEV se encuentran presentes las de 58 y 49 kd. Estudios recientes han demostrado que la proteína de 49 kd codificada por TEV es la proteasa responsable de efectuar varios cortes específicos en la mitad carboxilo terminal de la poliproteína viral. Existe poca información sobre el componente de 58 kd. Sin embargo, sobre la base de comparaciones de secuencias, se ha propuesto que este componente sería una RNA polimerasa dependiente de RNA (Domier *et al.*, 1987).

ESTRUCTURA GENOMICA Y ORGANIZACION

Mediante estudios de traducción *in vitro* de varios RNAs de potyvirus (Dougherty *et al.*, 1980, Hellmann *et al.*, 1980, Hellmann *et al.*, 1983), análisis de RNAs aislados de plantas infectadas (Dougherty W.G. 1983, Vance *et al.*, 1984) y a partir de los datos de secuencias nucleotídicas obtenidas de TEV (Allison *et al.*, 1986) y TMV (Domier *et al.*, 1986), se concluyó que que estos virus expresan sus genomas sintetizando una única poliproteína de manera análoga a los picornavirus y que no sintetizan RNAs subgenómicos. Sólo se pudo hallar en plantas infectadas un RNA genómico (de aproximadamente 10kb) que da lugar, en experimentos de traducción *in vitro*, a poliproteínas de alto peso molecular (Dougherty W.G. 1983). El análisis de la secuencia nucleotídica

tídica reveló la presencia en los genomas de TEV y TVMV, de un único marco de lectura abierto, el que daría lugar a una poliproteína de 346 kd para TEV (Allison *et al.*, 1986) y 340 kd para TVMV (Domier *et al.*, 1986). Este precursor poliproteico es clivado por acción de tres proteasas codificadas por el propio virus, la proteína NIa (Dougherty *et al.*, 1988), la región carboxilo terminal del componente *helper* (HC-Pro) (Carrington *et al.*, 1988) y la región carboxilo terminal de la proteína de 35 kd (P1) (Verchot *et al.*, 1991). En la Figura 3 se muestra un esquema del modo de acción de estas proteasas en el procesamiento de la poliproteína de TEV, para dar lugar a las proteínas virales maduras.

REPLICACION

Existen pocos estudios realizados sobre los mecanismos de replicación en potyvirus. La mayoría de los datos existentes surgen del análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los potyvirus con las de otros virus que poseen una organización genómica y estrategia de expresión similar y que han sido motivo de estudios más profundos, como por ejemplo los virus animales pertenecientes a la familia Picornaviridae.

Así se ha demostrado la presencia, en la proteína de inclusión citoplasmática (CI), de un motivo relacionado con la unión de nucleótidos trifosfatos. El mismo se encuentra presente en varias proteínas capaces de unir e hidrolizar nucleótidos (Gorbalenya *et al.*, 1989). Basados en este análisis comparativo Lain *et al.*, 1990, 1991, demostraron que la CI de PPV posee actividad de ATPasa y es capaz de desenrollar una doble hebra de RNA. Esto sugiere que la actividad de RNA helicasa, necesaria en el esquema de replicación, estaría dada por esta proteína.

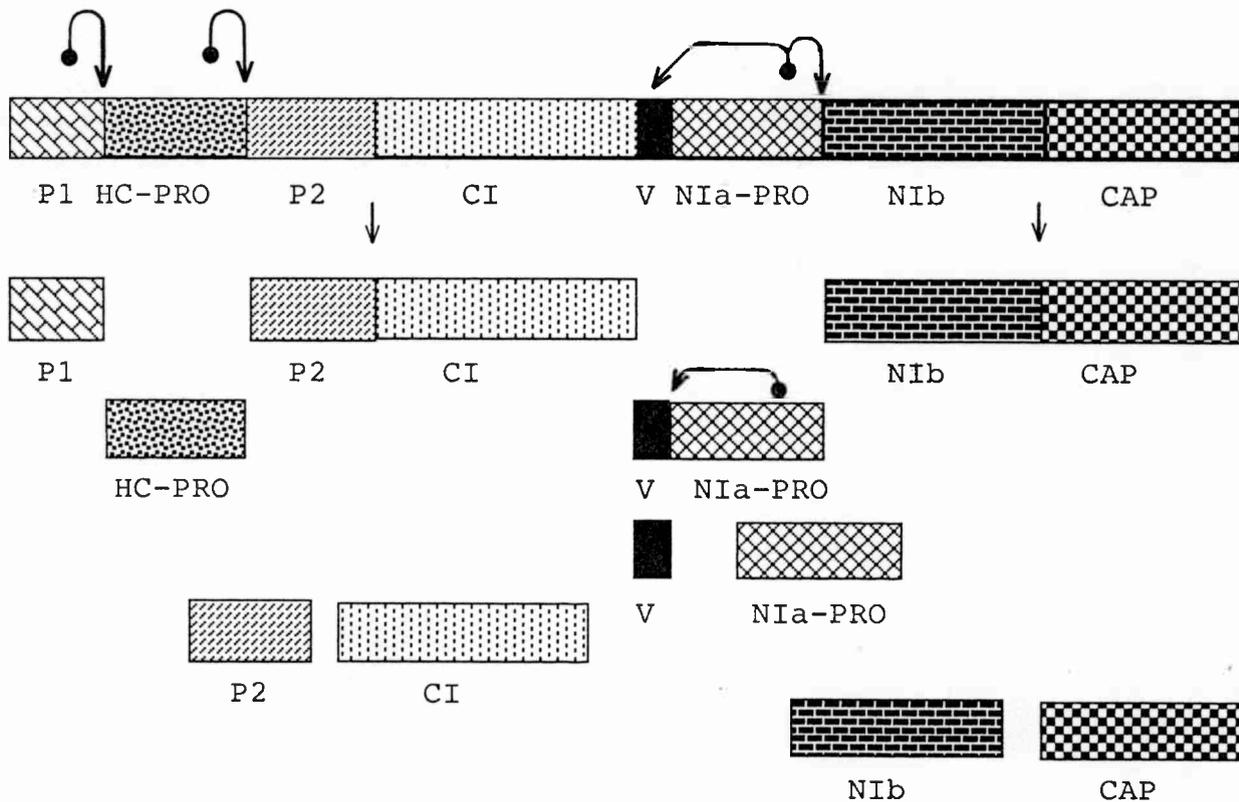


Figura 3. Organización genómica y procesamiento de la poliproteína de TEV.

El esquema muestra la poliproteína, que a sido dibujada ha escala. Las reacciones de clivaje que ocurren en *cis* (autoproteólisis), se indican con flechas curvas y aquellas que se producen en *trans*, con flechas rectas. Los dominios catalíticos de las proteasas se encuentran en la región carboxilo de las proteínas. Los primeros eventos del procesamiento involucran a tres proteasas (P1, HC-PRO y NIa-PRO) que actúan en *cis* y ellos son, probablemente, cotraduccionales. Posteriormente la proteasa NIa-PRO, procesa los productos intermedios para dar lugar a las restantes proteínas maduras. HC-PRO: componente *helper*-proteasa, NIa y NIB: inclusiones nucleares a y b respectivamente, V: proteína VPg, CAP: proteína de cubierta.

Se ha postulado que la proteína de inclusión nuclear b (NIb) sería la RNA replicasa ya que en ella se encuentra el motivo conservado Gly-Asp-Asp presente en todas las RNA polimerasas dependientes de RNA.

La proteína de inclusión nuclear a (NIa), además de actuar como proteasa específica en el procesamiento de la poliproteína, aportaría su extremo amino para originar la proteína Vpg (Murphy *et al.*, 1990). En poliovirus esta proteína estaría involucrada en la replicación actuando como iniciador (Takeda *et al.*, 1986).

DISEMINACION VIRAL

Se ha sugerido que las proteínas P1, *helper componet* (HC) y de cápside viral (CP), estarían involucradas en el transporte de los potyvirus entre células de una misma planta o bien entre diferentes plantas.

La proteína P1, además de poseer en su extremo carboxilo actividad de proteasa, ha sido propuesta como la proteína necesaria para el transporte de célula a célula, en base a la homología que existe entre la P1 de TVMV y la proteína de movilización (30 kd) de *tobacco mosaic virus* (TMV) (Domier *et al.*, 1987).

Como ocurre con la mayoría de los virus vegetales, el transporte entre plantas se realiza mediado por insectos vectores específicos, que en el caso de los potyvirus son áfidos. La proteína *helper* (HC) participa en este proceso y es necesaria su presencia, además del propio virus, para que un áfido sea capaz de transmitir el virus a otra planta (Pirone y Thornbourny, 1983). La otra proteína involucrada en el transporte mediado por áfidos es la proteína de cubierta. La región amino terminal se encuentra orientada hacia el exterior del virión y, cuando la misma es removida por tratamiento con tripsina, el virus mantiene su capacidad de infectar plantas mediante inoculación mecánica, pero deja

de ser transmitido por áfidos (Solomon R. 1989). Datos de comparación de secuencias mostraron la existencia del motivo (I/V)DAG conservado en el extremo amino terminal de varios potyvirus transmisibles por áfidos (Maiss *et al.*, 1989). Recientemente Atreya *et al.*, (1991), trabajando con una copia completa de TVMV, mostraron que una mutación puntual en la región de la cápside, que cambia la secuencia VDAG por VDAE, es capaz de modificar la característica de transmisible por áfidos a no transmisible.

DETECCION Y DIAGNOSTICO DE VIRUS VEGETALES

El uso de fungicidas es una forma eficaz de control de varias enfermedades causadas por hongos en distintos cultivos. En el caso de las enfermedades virales no existe un método directo que permita el control de las mismas. La lucha contra estos patógenos es básicamente preventiva y está orientada a reducir las vías de infección utilizando semillas libres de virus y a limitar la diseminación de la enfermedad eliminando los vectores virales.

Este tipo de medidas no ofrece una solución definitiva al problema y exige medidas de control fiscal rigurosas y una acción coordinada y responsable de los distintos productores. En el caso de cultivos propagados vegetativamente se han establecido programas de certificación de semillas. Para la implementación de las medidas de control es necesario contar con métodos que permitan una correcta identificación del virus que afecta a un determinado cultivo.

En la elección de un método diagnóstico hay que tener en cuenta ciertas características, a saber: sensibilidad, especificidad, reproducibilidad, número de muestras que pueden ser procesadas por un operador en un tiempo dado, costo y nivel de sofisticación de los equipos y el material necesario, nivel de entre-

namiento que necesita el operador, posibilidad de adaptarse a condiciones de campo y, por último, posibilidad de automatización de la técnica.

Los métodos utilizados en la detección y diagnóstico de los virus vegetales pueden ser agrupados en distintas categorías de acuerdo a la propiedad del virus de la cual depende. Así, existen métodos basados en la actividad biológica, en las características antigénicas y en el tipo de ácido nucleico componente de los virus.

METODOS BIOLOGICOS

Los métodos biológicos consisten en utilizar extractos obtenidos de las plantas a analizar para infectar una o más plantas indicadoras donde, al cabo de un cierto tiempo, se producirán los síntomas característicos. Estos métodos son muy laboriosos, y lentos, necesitan invernáculos donde mantener las plantas indicadoras y llevar a cabo los ensayos y exigen la implementación de normas de seguridad para evitar la diseminación de los patógenos.

METODOS SEROLOGICOS

Muchos de los problemas asociados al diagnóstico mediante ensayos biológicos se resolvieron con la introducción de métodos inmunológicos. Existe una gran variedad de técnicas serológicas, pero desde que Clark y Adams (1977) introdujeron el uso del *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), ésta fue ampliamente aceptada y se convirtió en la técnica de referencia, reemplazando en gran parte a los métodos biológicos utilizados en diagnóstico.

Varias modificaciones de la técnica de ELISA han sido desa-

rolladas para simplificarla y aumentar la sensibilidad. El uso de membranas como soportes sólidos de reacción en lugar de las placas de poliestireno, permitió el desarrollo de las técnicas de *dot-ELISA* (Hawkes *et al.*, 1982), *direct tissue blotting* (Lin *et al.*, 1990) y *squash-blot immunoassay* (Bravo Almonacid *et al.*, 1992). Las principales ventajas de estos métodos son su especificidad, rapidez, sensibilidad, economía, sencillez, estabilidad de los reactivos utilizados y la posibilidad de procesar un gran número de muestras.

En el futuro las técnicas inmunológicas se basarán sin duda en la obtención de nuevos anticuerpos, dirigidos contra epitopes cuidadosamente seleccionados, y que posean una alta afinidad por los mismos. Ello permitirá la diferenciación de distintas cepas de un mismo virus. La utilización de anticuerpos monoclonales se verá favorecida por esta necesidad. Por otra parte el conocimiento de la estructura y secuencia del genoma de los virus permitirá la predicción de los epitopes de interés por medio de programas de computación diseñados para tal fin (determinación de perfiles de hidropatía, de regiones de mayor movilidad, etc.).

El uso de péptidos sintéticos y la disponibilidad de una gran variedad de vectores de expresión, permitirá contar con cantidades ilimitadas de los antígenos de interés, lo que facilitará la producción de estos nuevos anticuerpos y permitirán obtener de manera sencilla, antisueros específicos para aquellos virus que son difíciles de purificar ppr ejemplo, PLRV.

METODOS BASADOS EN LA HIBRIDACION MOLECULAR

Se han desarrollado numerosos métodos basados en la hibridación molecular para la detección de diversos patógenos, que poseen una sensibilidad igual o mayor que la de los métodos serológicos y presentan la ventaja de detectar viroides (Owens *et al.*, 1984) y partículas virales defectivas (Harrison *et al.*, 1983), los que no poseen cubierta proteica. La especificidad de la detección está dada por la complementaridad de las secuencias nucleotídicas de la sonda y el genoma del patógeno. Esta puede modificarse, según las condiciones de hibridación y la elección de las secuencias de la sonda, permitiendo el diseño de metodologías destinadas a detectar un determinado virus o grupo viral. Así, se pueden diseñar sondas de "amplio espectro" destinadas al reconocimiento de varios virus relacionados (Maule *et al.*, 1983) o diseñar otras, mediante el uso de oligonucleótidos, capaces de reconocer específicamente distintas cepas de un mismo virus (Bar-Joseph *et al.*, 1985). La combinación de varias sondas en un mismo ensayo, capaces de detectar simultáneamente varios patógenos comunes a un determinado cultivo, sería de gran utilidad en la selección de material libre de virus, donde la identificación de un patógeno en particular no es importante ya que todas las plantas infectadas son eliminadas.

Si bien los métodos basados en la hibridación molecular son relativamente sencillos y se tiene la ventaja de contar con reactivos en cantidades ilimitadas y de calidad constante, su aplicación se ve aún restringida a laboratorios de mediana complejidad debido a los problemas relacionados con la preparación de la muestra y el uso de radioactividad. Los métodos no radioactivos de marcación de sondas han permitido resolver en parte estas limitaciones. Así, se han desarrollado ya varios métodos de diagnóstico no radioactivos, que poseen buena sensibilidad y especi-

ficidad cuando se utilizan sobre extractos parcialmente purificados (Hopp *et al.*, 1991), y se prevee que el uso de los mismos se extenderá considerablemente en el futuro.

TRANSFORMACION DE PLANTAS

El surgimiento y desarrollo de metodologías para transferir genes derivados de otros organismos a plantas, y el avance en las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, ha hecho posible la producción de plantas genéticamente modificadas (transgénicas), que transmiten a su descendencia los genes que les fueron introducidos. La íntima asociación que existe entre ciertos fitopatógenos y sus huéspedes ha permitido el diseño de metodologías para la introducción y expresión de nuevos caracteres en distintas especies vegetales. El sistema derivado de *Agrobacterium tumefaciens* es sin duda el que más ha evolucionado y ha sido utilizado para la transformación de varias dicotiledóneas, como tomate, tabaco, papa, petunia, zanahoria, etc. Existen especies que no son susceptibles a la infección y posterior transformación mediada por *Agrobacterium*. Según Potrikus la característica crítica para que una especie sea transformada por *Agrobacterium*, es el tipo de respuesta a heridas desarrollado por la planta (Potrykus I, 1991). Así, algunas monocotiledóneas, que responden a las heridas con proliferación y desdiferenciación de células en la región dañada, como *Asparagus*, pudieron ser transformadas con *Agrobacterium*. Inversamente dicotiledóneas que responden con muerte celular en la zona herida son refractarias a la transformación. Las dificultades para utilizar los sistemas derivados de *Agrobacterium* en la transformación de cereales condujo al desarrollo de técnicas de transformación basadas en la transferencia directa de genes.

Agrobacterium tumefaciens

A. tumefaciens es una bacteria del suelo, gram negativa, que puede infectar una amplia gama de dicotiledóneas y algunas monocotiledóneas (De Cleene, M. y De Ley, J., 1976). Es el agente causal de la enfermedad denominada tumor de corona (*crown gall*), enfermedad que se manifiesta por la formación de una masa tumoral originada en el crecimiento de tejido indiferenciado en la zona donde ocurrió la infección. Los tumores poseen dos propiedades: su crecimiento independiente del aporte exógeno de fitohormonas (Braun, A.C., 1958) y la capacidad de las células del tumor de producir una serie de compuestos nitrogenados que se denominan en forma genérica opinas, y que sirven como fuente de carbono y nitrógeno a las bacterias colonizantes (Tempe, J. y Petit, A., 1982). Estas características son el resultado de la expresión de un conjunto de genes que la bacteria transfiere a la planta, los cuales se integran de manera estable al genoma de las células vegetales (Chilton *et al.*, 1977). Este fragmento de DNA se conoce como T-DNA (*transferred DNA*).

El T-DNA se encuentra presente en la bacteria en un megaplásmido de aproximadamente 200 kilobases, denominado plásmido Ti (*tumor inducing*) (van Larebeke *et al.*, 1975). El T-DNA es un segmento de 23 kb flanqueado por secuencias repetidas directas de 25 bp, que contiene un grupo de genes denominados oncogénicos. Estos genes codifican enzimas necesarias para la síntesis de fitohormonas (auxinas y citocininas), las que son responsables del desbalance hormonal que conduce al fenotipo tumoral, y de enzimas responsables de la síntesis de opinas. Los genes bacterianos localizados en el T-DNA se encuentran bajo la dirección de las señales eucariotas de regulación, necesarias para su expresión en la planta (Barker *et al.*, 1983).

Además del T-DNA, en el plásmido Ti se encuentra una región de aproximadamente 35 kb que contiene un grupo de genes denominados genes de virulencia, responsables del procesamiento y trans-

ferencia del T-DNA. Para que ocurra la transferencia son necesarios, además de los productos de estos genes, otros correspondientes a los genes de virulencia cromosomal *chvA*, *chvB* y *ExoC*. Estos se expresan constitutivamente y están involucrados en la unión de las bacterias a las células vegetales (Douglas *et al.*, 1985).

Los productos de los genes *VirA* y *VirG* constituyen un sistema receptor-transductor que es activado por la presencia de determinados compuestos fenólicos, presentes en los exudados de las células vegetales (acetosiringona y hidroxiacetosiringona). Estos productos activados inducen finalmente la transcripción de los restantes genes *Vir* (Stachel *et al.*, 1986). El gen *VirD* codifica una endonucleasa que reconoce y corta específicamente entre los bordes repetidos (Yanofsky *et al.*, 1986). A partir de esos cortes se genera unidireccionalmente una hebra de DNA (hebra T), que es transportada a la célula vegetal mediante un mecanismo similar al de la conjugación bacteriana clásica. Esta hebra T se encuentra recubierta por proteínas que se unen a DNA de simple cadena, codificadas por el gen *VirE2* (Citovsky *et al.*, 1989). La hebra T lleva unida en su extremo 5' a la proteína *VirD2*, la que funcionaría como una proteína "piloto" para dirigir el complejo nucleoproteico hasta el núcleo de la célula vegetal (Herrera-Estrella *et al.*, 1990). Una vez allí, el T-DNA se integra covalentemente al genoma de la planta en una o más copias distribuidas al azar en los cromosomas de la célula receptora. Un esquema que representa los principales pasos de este proceso se muestra en la Figura 4.

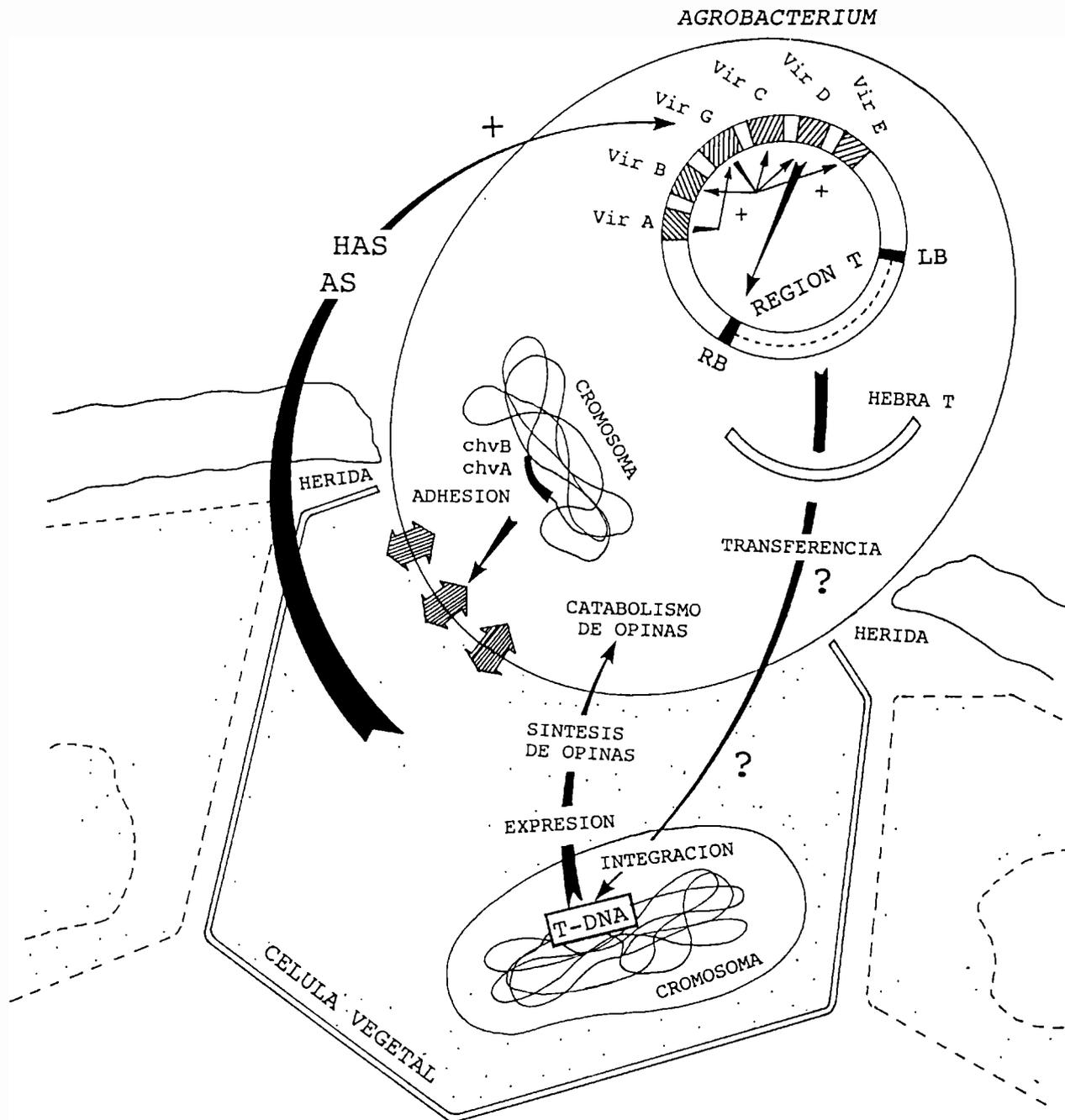


Figura 4. Eventos que tienen lugar durante el procesamiento y transferencia del T-DNA de *A. tumefaciens* a células vegetales. Ellos se inician con la adhesión de la bacteria a la célula vegetal y la activación, por compuestos fenólicos liberados por las células vegetales heridas, del sistema receptor-transductor VirA VirG. AS: acetosiringona; HAS: hidroxí-acetosiringona.

**Desarrollo de vectores para la transferencia de genes
mediada por *Agrobacterium***

Los estudios realizados sobre el plásmido Ti y los mecanismos de transferencia del T-DNA, condujeron al desarrollo de vectores plasmídicos utilizados para la transformación de plantas. Los primeros experimentos de transferencia de genes a células vegetales, se llevaron a cabo utilizando plásmidos Ti oncogénicos. Se obtuvieron así plantas transformadas que exhibían el fenotipo tumoral el cual no podía ser luego eliminado. Sin embargo, dos observaciones permitieron el diseño de vectores no oncogénicos o desarmados. Primero, la inserción de secuencias exógenas dentro de la región T del plásmido Ti, condujo a la cotransformación de la célula vegetal y a la transferencia de dichas secuencias al genoma de la planta (Hernalsteens *et al.*, 1980). Segundo, los genes contenidos en el T-DNA no son necesarios para la transferencia e integración en el genoma vegetal (Zambryski *et al.*, 1983). Sólo es necesaria la presencia de las secuencias repetidas de los bordes, en particular la correspondiente al borde derecho. Teniendo en cuenta las observaciones anteriores, se construyó un plásmido Ti desarmado (pGV3850), para lo cual se removieron del T-DNA los genes responsables del fenotipo tumoral y se los reemplazó por secuencias del plásmido pBR322. La inserción de secuencias de pBR322 provee una región de homología para la integración por recombinación homóloga (cointegración) de los vectores comúnmente utilizados en *E. coli*. Los plásmidos recombinantes, portando el gen de interés y el marcador de selección se construyen en *E. coli* y se introducen por conjugación o por transformación en una cepa de *A. tumefaciens* que contiene al plásmido Ti desarmado. Ya que los replicones del tipo Col E1 no son capaces de mantenerse en *Agrobacterium*, sólo se establecerán los que hayan recombinado con el plásmido Ti, los que pueden ser seleccionados mediante el uso de antibióticos adecuados. De

esta manera, la información que se desea transferir a la planta queda correctamente situada entre los bordes de la región T. La Figura 5.A. muestra un esquema del sistema de vectores de cointegración.

La observación de que la región del T-DNA no necesita estar ligada físicamente a la región *Vir* del plásmido Ti para ser eficientemente transferida a la planta (Hoekema *et al.*, 1983) permitió el desarrollo de un nuevo tipo de vectores, los denominados binarios. Estos sistemas constan de dos elementos: a) un plásmido Ti al que se le deletó toda la región T, incluyendo sus bordes, pero que conserva los genes *Vir*, los que actuarán en *trans* sobre el otro elemento y b) un plásmido de amplio rango de huésped (capaz de replicar en *E. coli* y *Agrobacterium*), el que contiene un marcador de selección para bacterias y, flanqueados por los bordes derecho e izquierdo del T-DNA, un marcador de selección para plantas y un adaptador con sitios únicos de clonado donde se introducen los genes que se desea transferir. Un esquema del sistema de vectores binarios se muestra en la Figura 5.B.

Transferencia directa de genes

El sistema de transformación basado en *A. tumefaciens* ha sido aplicado a un gran número de plantas dicotiledóneas. Sin embargo, los esfuerzos para transformar cereales y otras variedades agrícolas importantes han tenido poco éxito y dieron lugar a otros métodos de transformación en los que el DNA exógeno se introduce directamente en la célula vegetal. Generalmente se utilizan en este tipo de experimentos protoplastos (células desprovistas de pared), y la introducción del DNA se facilita mediante la utilización de agentes químicos (polietilenglicol) ó físicos (electroporación utilizando pulsos de corriente eléctrica) (Saul *et al.*, 1988; Shillito *et al.*, 1985).

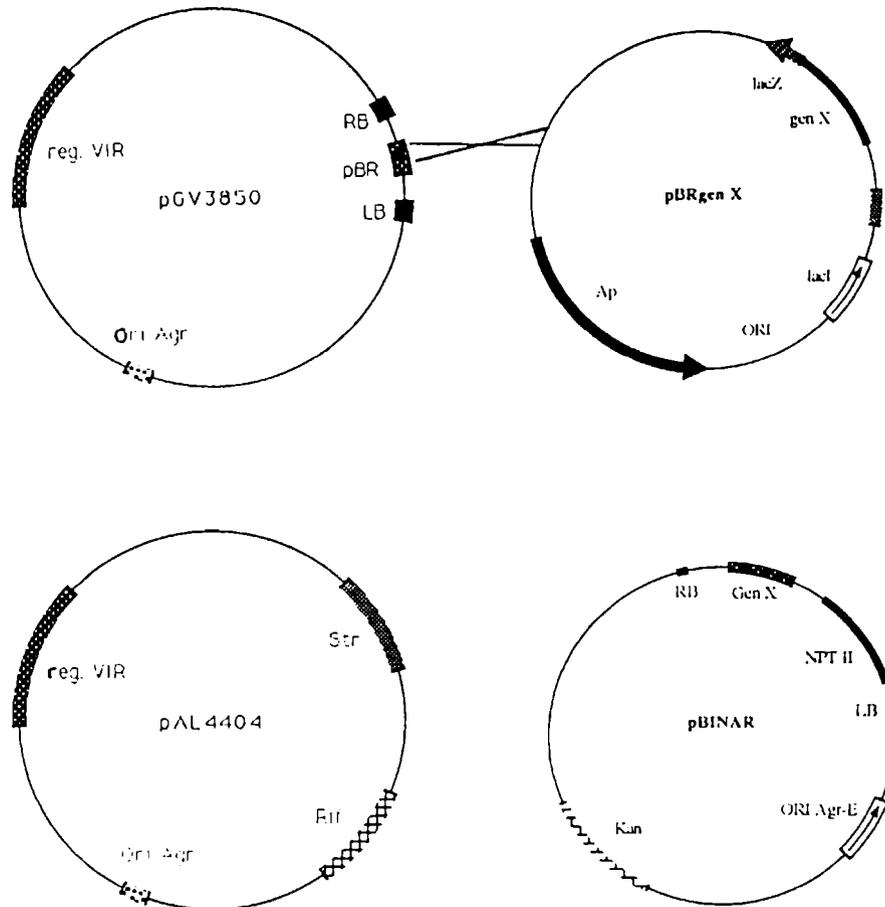


Figura 5. Sistemas de transformación basados en *A. tumefaciens*.
A: Sistema de cointegración.

El plásmido pGV3850 es un derivado del Ti al que se le eliminaron los genes responsables de la formación de tumores y fueron reemplazados por secuencias del plásmido pBR322. El DNA exógeno que se desea introducir, previamente clonado en un plásmido derivado de pBR322, se transfiere a un *Agrobacterium* que contiene a pGV3850. Luego, mediante recombinación homóloga, se forma el cointegrado en el que las secuencias contenidas en pBR322 quedarán ubicadas entre los bordes derecho e izquierdo del pGV3850.

B: Sistema binario.

Este sistema está compuesto de un plásmido que posee, un marcador de selección funcional en plantas y sitios únicos de clonado donde se introducirán las secuencias de interés. Estos se encuentran flanqueados por los bordes derecho e izquierdo del plásmido Ti. Posee además un origen de replicación de amplio rango de huésped que le permite replicarse tanto en *E. coli* como en *Agrobacterium* (pBINAR). Luego de introducir el gen de interés, el plásmido se transfiere a *Agrobacterium* y las funciones necesarias para la transferencia son aportadas en *trans*, por un plásmido Ti que contiene los genes de virulencia y carece de T-DNA (pAL4404).

Más recientemente, se desarrolló una técnica que permite la introducción de genes exógenos a virtualmente cualquier tipo de célula y tejido vegetal, denominado método biolístico o de bombardeo con microproyectiles (Klein *et al.*, 1988). En este procedimiento, el DNA es introducido a células intactas en cultivo o a tejidos organizados por medio de partículas micrométricas de oro o tungsteno recubiertas con el DNA que se desea introducir, las que son aceleradas a altas velocidades para atravesar la pared y la membrana celulares y alcanzar el núcleo de la célula blanco.

Utilizando estas técnicas se logró la transformación de plantas monocotiledóneas de importancia agrícola como maíz (Rhodes *et al.*, 1988a; Gordon-Kamm *et al.*, 1990) y arroz (Zhang y Wu, 1988) y de dicotiledóneas refractarias a la transformación por medio de *Agrobacterium*, como la soja (McCabe *et al.* 1988).

TRANSFORMACION DE PLANTAS Y MEJORAMIENTO VEGETAL

Las técnicas de transformación vegetal han evolucionado a un punto tal que en principio, es posible introducir cualquier secuencia exógena en una gran variedad de plantas; ello se convertirá sin duda en una herramienta importante en el mejoramiento agronómico. A diferencia del mejoramiento clásico, estas técnicas permiten la transferencia de material genético entre organismos pertenecientes a distintas especies. Si bien en principio sería posible introducir cualquier característica deseada en una planta, el mayor obstáculo será la identificación de caracteres de interés en asociación con segmentos discretos de DNA. Es sabido que ciertas características de interés en la agricultura están asociadas a patrones complejos de expresión génica, lo que limitará, por un cierto tiempo, el uso de la ingeniería genética en el mejoramiento vegetal. Sin embargo, otras características se encuentran codificadas en unos pocos genes, lo que facilitará su

introducción en plantas para dar lugar a nuevas variedades. Actualmente existen plantas transgénicas con una mayor resistencia al ataque de insectos, tolerantes a herbicidas y resistentes a distintos virus, las que se obtuvieron luego de introducir y expresar en la planta genes únicos que provenían de organismos pertenecientes a otras especies.

Resistencia a virus

Protección cruzada

Se denomina protección cruzada al fenómeno por el cual una planta que ha sido previamente infectada con una cepa de un determinado virus, presenta menor susceptibilidad a la infección posterior con otra cepa del mismo virus. La protección cruzada fue descrita por primera vez por Mc Kinney en 1929, quien mostró que la infección de plantas de tabaco con una cepa atenuada del virus TMV impedía la infección de las mismas con una cepa más severa del mismo. Desde su descubrimiento, se han propuesto varios modelos para explicar el mecanismo mediante el cual actúa. Algunos de ellos son: a) encapsidación del RNA viral de la cepa severa por la proteína de cápside de la cepa atenuada o bloqueo de la desencapsidación de la cepa severa, b) competencia entre las dos cepas por algún factor presente en la célula huésped (por ejemplo replicasa viral), c) hibridación de las hebras de RNA negativas y positivas de la cepa atenuada y de la cepa severa, para prevenir la traducción y replicación de la última. Ninguno de estos modelos ha sido demostrado fehacientemente y es probable que una explicación final involucre más de uno de los mecanismos propuestos.

La utilización de la protección cruzada para controlar las enfermedades producidas por virus no ha sido demasiado utilizada por las siguientes razones (Fulton, 1986):

- 1- La cepa atenuada en si misma es responsable de una pequeña pero significativa pérdida de rendimiento (5-10 %).
- 2- El cultivo infectado puede actuar como reservorio de la cepa atenuada, la que podría infectar otras plantas más sensibles.
- 3- La cepa atenuada podría mutar a una forma más severa.
- 4- Podrían originarse enfermedades serias debido a la coinfección sinérgica con otros virus no relacionados

Plantas transgénicas que expresan secuencias virales

Protección cruzada mediada por cápside

Para resolver algunos de los potenciales problemas de la protección cruzada, y definir posibles mecanismos para obtener resistencia a virus, se utilizaron técnicas de ingeniería genética y transformación vegetal para obtener plantas transgénicas que expresen secuencias de origen viral. Se demostró así que la expresión de la proteína de cubierta de varios virus, confiere a las plantas resistencia a los mismos y, en algunos casos, a virus relacionados. Estos experimentos dieron una interesante confirmación a la teoría de la "resistencia derivada del patógeno" (Sandford y Johnston, 1985), según la cual es posible interferir el ciclo de vida de un determinado patógeno logrando que el huésped sintetice un producto normalmente codificado por el patógeno, ya sea a destiempo, en cantidades no adecuadas, o modificado de forma tal que no sea funcional.

Las plantas de tabaco que expresan la proteína de cubierta de TMV, son resistentes a la infección con el virus, y se puede observar en las plantas un retardo en la aparición de los síntomas ó ausencia de síntomas con respecto a plantas controles no transgénicas (Powel-Abel *et al.*, 1986). Resultados similares se obtuvieron en plantas transgénicas de tabaco, alfalfa, papa y to-

mate que expresan las proteínas de cubierta del, *alfalfa mosaic virus* (AlMV) (Loesch-Fries *et al.*, 1987), *potato virus X* (PVX) (Hemenway *et al.*, 1988; Hoekema *et al.*, 1989), *cucumber mosaic virus* (CMV) (Cuozzo *et al.*, 1988), *tobacco rattle virus* (TRV) (van Dun y Bol, 1988) y *potato virus Y* (PVY) (Lawson *et al.*, 1990). Los virus mencionados pertenecen a distintos grupos, por lo que se considera que la protección mediada por cápside es una estrategia generalizable a otros virus y huéspedes. Ello significaría disponer de una herramienta poderosa en el mejoramiento vegetal.

Los mecanismos moleculares que intervienen en este tipo de protección no han sido completamente dilucidados aún. Los estudios que se han realizado, fundamentalmente con TMV, mostraron que:

1- la resistencia puede ser superada inoculando las plantas con RNA viral o con altas concentraciones de virus (Nelson *et al.*, 1987).

2- para que exista protección es necesaria la presencia de la proteína de cubierta más que la de su RNA (Powel *et al.*, 1990).

3- la resistencia puede ser superada utilizando como inóculo virus al que se le ha removido parcialmente la proteína de cubierta (Register y Beachy, 1988)

4- las plantas de tabaco que expresan la proteína de cubierta del TMV (CP+) y controles (CP-) presentan en las hojas inoculadas una cantidad similar de virus, pero la concentración viral es menor en las hojas no inoculadas de las plantas CP+.

5- si se injerta un trozo de tallo de una planta CP+ conectando tejidos de una planta CP-, el virus no es capaz de propagarse desde la región CP- infectada con RNA viral, a través del tejido CP+, hacia la zona CP- no infectada (Wisniewski *et al.*, 1990).

Todo esto sugiere que la protección mediada por cápside se originaría, en principio, en dos mecanismos distintos: a) inhibición de una etapa temprana de la infección, en la que el virus necesita desprenderse de su proteína de cubierta para comenzar su ciclo replicativo y b) bloqueo de la propagación sistémica viral.

Sin embargo, existen ciertas características particulares de determinados sistemas patógeno-hospedante que impiden la generalización de las explicaciones anteriores. Ellas son:

1- plantas que expresan la proteína de cubierta de PVX, resisten la infección con RNA viral (Hemenway *et al.*, 1988).

2- plantas que expresan la proteína de cubierta de CMV, resultaron resistentes independientemente de la concentración del inóculo viral utilizado (Cuozzo *et al.*, 1988).

3- plantas de tabaco que expresan un mRNA de la proteína de cubierta de TEV al que se introdujeron mutaciones puntuales para impedir su traducción, son más resistentes que aquellas que expresan la proteína de cubierta (Dougherty *et al.*, 1992).

Recientemente plantas transgénicas de papa que expresan la proteína de cubierta del PVX fueron sometidas a pruebas de campo exitosas, en las que se demostró también que las mismas retienen las características del cultivar original, para lo cual se analizaron una serie de parámetros relacionados con la morfología y el rendimiento de la producción de tubérculos (Jongedijk *et al.*, 1992).

Expresión de genes no estructurales

Se ha demostrado que la expresión en plantas de tabaco de la secuencia de una proteína no estructural de TMV, probablemente de un constituyente del complejo de replicación, confiere a la planta altos niveles de resistencia (Golemboski *et al.*, 1990). Más recientemente, se obtuvieron plantas resistentes al PVX utilizando una estrategia similar, (Braun *et al.*, 1992). Se están

Introducción

desarrollando además nuevas estrategias, basadas en la modificación de otras funciones virales, que podrían generar mecanismos adicionales de resistencia. Estas alternativas podrían emplearse, solas o combinadas, para obtener protección simultánea contra distintas infecciones virales en una misma planta.

Objetivos

Objetivos

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es la principal hortaliza cultivada en nuestro país con una superficie del orden de las 105.000 has, la que representa el 17,5% de la superficie total destinada a cultivos hortícolas. Los cultivares difundidos son: *Spunta*, de origen holandés, ocupa el 70% al 80% de la superficie total plantada; *Ballenera* y *Huinkul* cultivares argentinos, y *Kennebec* de origen canadiense. La presencia de estos tres últimos genotipos es limitada por varios factores, entre los que se cuentan: ciclo más largo que *Spunta*, que redundaría en menores rendimientos en plantaciones fuera de época y de ciclo corto como las locales; menor demanda del consumidor por tamaño más pequeño y peor apariencia que este último cultivar.

La papa es susceptible a enfermedades producidas por hongos, bacterias y virus que reducen la calidad y el rendimiento de la producción. Las enfermedades producidas por virus causan importantes pérdidas y sólo son controlables a través de la calidad de la semilla y la introducción de variedades resistentes. Las más comunes son las producidas por los virus PLRV (*potato leaf roll virus*), PVY (*potato virus Y*) y PVX (*potato virus X*). La propagación de la papa se realiza por medio de reproducción agámica (minitubérculos), lo que determina una particular incidencia de las virosis. Estas persisten a través del ciclo de producción y se mantienen luego en los stocks.

Las infecciones producidas por PVY, son importantes ya que el virus se disemina fácilmente y produce mermas en el rendimiento de hasta un 80% (Beemster *et al.*, 1987). Además, en las coinfecciones con PVX se puede observar un efecto sinérgico en la sintomatología, que se denomina mosaico rugoso (Delgado-Sánchez y Grogan, 1970).

La adopción de medidas de control de los vectores que transmiten los virus, el uso de material vegetal libre de virus y la introducción en ciertos cultivares de genes de resistencia mediante técnicas de mejoramiento vegetal, han permitido controlar en parte los efectos de estos patógenos.

Objetivos

El presente trabajo de tesis se propone utilizar las herramientas que provee la ingeniería genética para controlar las infecciones producidas por el virus PVY en plantas de papa, aportando nuevos métodos de diagnóstico para un mejor control de la calidad de la semilla, y en combinación con las técnicas de la transformación vegetal, modificar cultivares comerciales con el fin de lograr resistencia al virus mediante la estrategia de protección mediada por la cápside.

Con este fin se establecieron los siguientes objetivos:

- a) Realizar el clonado molecular del genoma del virus PVY.
- b) Utilizar clones de cDNA como sondas de hibridación molecular para el diagnóstico.
- c) Expresar la proteína de cubierta del virus en bacterias para ser utilizada como antígeno en la producción de anticuerpos policlonales.
- d) Diseñar nuevas técnicas de diagnóstico basadas en la utilización de anticuerpos.
- e) Construir genes quiméricos capaces de expresar en plantas la proteína de cubierta del PVY.
- f) Efectuar la transformación de plantas de papa con las construcciones quiméricas mencionadas en el punto anterior.
- d) Establecer la existencia de resistencia antiviral en las plantas de papa transgénicas.

Materiales y Métodos

1. CEPAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

1.1. *Escherichia coli*

Se utilizaron las siguientes cepas:

LE392:

F⁻ e14⁻(mcrA⁻) hsdR514 (r_l⁻, m_l⁻), supE44, supF58, lacY1 ó Δ(lacIZY)6, galK2, galT22, metB1, trpR55 (Murray *et al*, 1977).

JM101:

Δ(lac-proAB), supE, thi/F[']tcaD36, proAB, lacJ⁹, Z M13 (Messing *et al*, 1981)

Y1090:

F⁻ΔlacU169, proA⁺, Δlon, araD139, strA, supF, mcrA, trpC22::Tn10, (pMC9,Tetr^rAmp^r) (Young *et al*, 1983).

N4830-1:

F⁻, su⁻, his⁻, ilv⁻, GalK8, (chlD-pgl), λ, Bam,N⁺, cI857, H1, (Gottesman *et al*, 1980)

NM522:

F['] recA⁺, supE, thi, Δ(lac,proAB), hsd5, /F⁻, proAB/supE^{thi}, lacI⁹, Δ(lacZ)M15, (r_l⁻, m_l⁻), (Mead *et al*, 1985).

Todos los cultivos fueron hechos en medio LB (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l). En caso de medios sólidos se agregó agar hasta una concentración final de 1,5 %.

Algunos de los suplementos utilizados fueron los siguientes:

ampicilina: 100 µg/ml (presión de selección)

MgSO₄ 10 mM (estabilidad de bacteriófagos λ)

maltosa: concentración final 0,2 % (expresión del receptor del bacteriófago λ)

En el caso de las cepas NM522 y JM101, se partió siempre de una colonia crecida en medio mínimo M9 (Na₂HPO₄ 5 g/l; KH₂PO₄ 3 g/l; NaCl 0,5 g/l; NH₄Cl 1 g/l; MgSO₄ 2 mM; glucosa 0,2 %; CaCl₂ 0,1 mM), suplementado con tiamina 0,5 µg/ml.

Todos los crecimientos bacterianos fueron llevados a cabo en Erlenmeyers con un volumen de medio equivalente a aproximadamente 25 % de la capacidad total. La temperatura de crecimiento fue de 30 °C ó 37 °C, dependiendo de la cepa, y la agitación de alrededor de 200 rpm.

1.2. *Agrobacterium tumefaciens*

Se utilizó la cepa LBA4404 (Hoekema *et al*, 1983) que posee el plásmido pAL4404. La cepa es resistente a los antibióticos rifampicina y estreptomina. La temperatura de crecimiento fue de 26 °C.

1.3. Cepa Viral

La cepa de virus Y de la papa utilizada fue la ordinaria (PVY^o) aislada y caracterizada en el Centro Internacional de la Papa (Lima-Perú). La misma fue propagada en la EEA-INTA-Luján de Cuyo, Mendoza. El virus se inoculó mecánicamente en hojas de plantas jóvenes de *Nicotiana occidentalis*. Al cabo de 4-5 semanas, de acuerdo con los síntomas observados, se cosecharon las hojas infectadas.

2. PURIFICACION DE PVY

2.1. Método de Gugerli (Gugerli P., 1978)

Las preparaciones se hicieron a partir de una cantidad aproximada de 100 g de hojas infectadas. Durante todo el proceso se trabajó a temperaturas entre 0 y 4 °C, salvo que se indique lo contrario.

- Se homogenizaron 200 g de hojas infectadas en 400 ml de *buffer* de extracción: citrato de sodio 17 mM, Na_2HPO_4 167 mM, β -mercaptoetanol 0,2 %, EDTA 10 mM, urea 1 M, pH 7.
- Se agregó Triton X100 hasta concentración final de 1 % y se agitó durante 30 min a 4 °C
- El homogenato se filtró a través de cuatro capas de gasa y se clarificó por centrifugación durante 20 min a 4 °C y 6.000 xg.
- Las partículas virales se sedimentaron del sobrenadante por ultracentrifugación (120 min a 100.000 xg) a través de un colchón de sacarosa de 20 % (p/v) preparado en *buffer* de extracción (3 ml de solución de sacarosa en un tubo de centrifuga de 40 ml).
- El *pellet* se resuspendió en 50 ml de *buffer* de extracción y se extrajo con igual volumen de una mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (25:1).
- Luego de separar las fases por centrifugación durante 15 min a 6.000 xg, la fase acuosa se centrifugó a través de un colchón de sacarosa de 20 %, tal como se indicará más arriba.
- Se resuspendió en 4 ml de borato de sodio 100 mM, EDTA 10 mM, pH 8,2.
- Se centrifugó en un gradiente de sacarosa de 10-40 %.

- Se resuspendió en citrato de sodio 1,7 mM, Na_2HPO_4 17 mM, pH 7 y se centrifugó en gradiente preformado de CsCl.(30-40%)
- Finalmente se dializó contra Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.

2.2. Método de Murphy modificado

Se introdujeron distintas modificaciones al método de purificación descrito por Murphy (Murphy *et al.* 1990), con el fin de mejorar el rendimiento en la obtención del gRNA viral. El protocolo utilizado fue el siguiente:

- Se partió de 200 g de hojas de *Nicotiana occidentalis*, infectadas con PVY que se homogenizaron en Omnimixer (Sorvall) en *buffer* KH_2PO_4 0,5 M, pH 7.5, urea 1 M, ácido dietilditiocarbámico (DIECA) 0,01 M, ácido tioglicólico 0,5 %.
- Se agregó 1 ml de cloroformo por gramo de tejido y se emulsionó en Omnimixer.
- Se centrifugó a 4.000 xg por 15 min en rotor GS3 (Sorvall), y la fase acuosa se filtró por varias capas de gasa, se agregó PEG 6000 hasta una concentración final de 4 % y NaCl hasta 0,25 M.
- Se agitó en agitador magnético por 2 hs a 4 °C y se centrifugó en rotor GS3 a 4.000 xg por 15 min.
- Se agregaron al *pellet* 125 ml de, KH_2PO_4 0,1 M pH 7, urea 1 M, y Triton X-100 hasta una concentración final de 1 % (p/p). Se dejó en suspensión con la ayuda de un agitador magnético toda la noche a 4 °C.
- Se clarificó por centrifugación a 4.000 xg en rotor GSA (Sorvall).
- El sobrenadante se sembró sobre un colchón de 2,5 ml de sacarosa 20 %, preparado en Tris.HCl 20 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM en un tubo para rotor SW 28 y se centrifugó en ultracentrífuga a 27.000 rpm durante 2 hs.

- Se resuspendió el *pellet* en 2,5 ml de Tris.HCl 20 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, con la ayuda de un homogenizador de vidrio.

3. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ACIDOS NUCLEICOS

3.1. Purificación del gRNA a partir del virión de PVY.

Para evitar la acción de RNAsas, todas las soluciones fueron autoclavadas a 1,2 atm durante 30 min y el material de vidrio fue horneado durante 2 hs a 200 °C. En todo momento se utilizaron guantes.

Método 1:

- Se trataron 100 µl de suspensión viral con complejo de vanadil ribonucleósido, concentración final 1 mM y 50 unidades de inhibidor de ribonucleasa de placenta humana (RNAsin, Promega) durante 20 min a temperatura ambiente.
- Se extrajo la mezcla una vez con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v) a 65 °C y otra vez con un volumen de la misma mezcla a temperatura ambiente.
- La fase acuosa se extrajo dos veces con éter saturado en H₂O y se precipitó con 2 volúmenes de etanol y 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M, pH 5,8.
- Luego de la centrifugación, el *pellet* se lavó con etanol 80%, se resuspendió en agua bidestilada y se fraccionó en alícuotas de 10 µl, las que se conservaron a -70 °C.

Método 2:

- A 2,5 ml de suspensión viral en Tris.HCl 20 mM, pH 7.5 se agregaron NaCl hasta 0,25 M final, SDS hasta 1 % final y 50 µg de proteinasa K. Se incubó a 42 °C por 40 min.

- Se agregó luego un volumen de fenol equilibrado en Tris.HCl, pH 8. Se emulsionó a 65 °C durante 5 min y separaron las fases por centrifugación a 10.000 rpm.
- Se extrajo la fase acuosa con fenol-cloroformo (1:1 v/v) y luego con cloroformo. Se llevó la misma hasta una concentración 3 M de acetato de sodio, pH 5,8 partiendo de una solución madre de 4.5 M y se dejó toda la noche a -70 °C.
- Se centrifugó durante 30 min a 12.000 xg a 4 °C y el *pellet* se resuspendió en 800 µl de H₂O.
- Se agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M, pH 5,2, 2 volúmenes de etanol 100 % y se dejó precipitar durante toda la noche a -70 °C. Se centrifugó a 12.000 xg a 4 °C y se resuspendió en 100 µl de H₂O estéril.

3.2. Preparación de plásmidos

Se utilizó una modificación del método de Birnboim y Doly (1979).

- Se partió de 5 ml de cultivo crecido en LB/ampicilina, con agitación (200 rpm), durante toda la noche a 37 °C.
- Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 1.000 xg y resuspendidas en 100 µl de Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM y glucosa 50 mM.
- La suspensión de bacterias se incubó 5 min en hielo y posteriormente se agregaron 200 µl de una solución SDS 1 %-NaOH 0,2 N preparada en el momento. Se mezcló por inversión y se dejó 10 min en hielo. Se agregaron luego 150 µl de acetato de potasio 5 N, enfriado previamente, se mezcló por inversión y se dejó en hielo.
- Luego de 10 min de incubación, se centrifugó en microcentrífuga durante 5 min. Al sobrenadante obtenido (≈400 µl) se lo extrajo con 1 volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1).

Materiales y Métodos

- La fase acuosa obtenida fue precipitada con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M, pH 5,2, más el agregado de 2 volúmenes de etanol. Luego de 10 min a -70°C se centrifugó en microcentrífuga durante 5 min.
- El *pellet* se resuspendió en 200 μl de H_2O . Se agregaron luego 2 μl de RNasa A (10 mg/ml) libre de DNasa y se incubó 30 min a 37°C .
- Se precipitó 15 min a temperatura ambiente con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M, pH 5,2, más 300 μl de etanol.
- El plásmido se recuperó por centrifugación en microcentrífuga por 5 min y se resuspendió en 40 μl de H_2O . El rendimiento fue de aproximadamente 1 μg DNA por ml de cultivo.

3.3. Purificación del DNA de bacteriófagos λ recombinantes

(basado en el método de Yamamoto, 1970)

- Se inocularon 10 ml de medio LB/ Mg_2^{+} /maltosa contenidos en un tubo Falcon de 50 ml con 200 μl de un cultivo crecido toda la noche en LB/ Mg_2^{+} /Maltosa y un taquito de agar conteniendo una placa de lisis del fago correspondiente. La infección se realizó a 42°C , con agitación a 200 rpm por 5-6 hs. Se incluyó siempre un tubo conteniendo sólo células como control de lisis.
- Luego que la lisis fue evidente, se agregaron 200 μl de cloroformo y se incubó durante 5-10 min adicionales a 37°C para lisar las bacterias remanentes.
- Se centrifugó 5 min a 3.000 rpm, para eliminar los restos celulares, y una alícuota del sobrenadante se conservó a 4°C como solución stock de fagos (título aproximado 10^{10} - 10^{11} pfu/ml). Con el resto del sobrenadante se procedió a la purificación del DNA.

Materiales y Métodos

- Se tomaron 8 ml del sobrenadante, se mezclaron con 8 ml de *buffer* TM (Tris 50 mM, pH 7,4, SO₄Mg 10 mM) y el contenido total se pasó a un tubo Corex de 30 ml.
 - Se agregaron 320 µl de solución de DNAsa I/RNAsa A (1 mg/ml de cada enzima en *buffer* TM) y se incubó durante 15-30 min a temperatura ambiente.
 - Se concentraron luego los fagos por precipitación en polietilenglicol (PEG)-NaCl por agregado de 1,6 ml de NaCl 5 N, y 1,8 g de PEG-8000 o de PEG 6000 sólido.
 - Una vez disuelto el PEG, se incubó durante 15 min en hielo y se sedimentaron los fagos por centrifugación a 10.000 rpm por 10 min a 4 °C.
 - Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el *pellet* de fagos en 300 µl de *buffer* TM y se realizaron 2 extracciones con cloroformo para extraer el PEG residual.
 - A la fase acuosa final se agregaron 15 µl de EDTA 0,5 N, pH 8, 30 µl de NaCl 5 N y 360 µl de fenol equilibrado con *buffer* Tris-ClH, pH=8
 - Luego de efectuar la extracción fenólica, se realizaron 2 extracciones con cloroformo, se agregaron 875 µl de etanol a la fase acuosa y se sedimentó el DNA por centrifugación por 5 min en microcentrífuga. El *pellet* se resuspendió en 50 µl de H₂O y se guardó a -20 °C.
- El rendimiento fue de aproximadamente 3-5 µg.

3.4. Preparación de ssDNA de fagósmidos *Bluescript*

- A partir de una colonia de *E. coli* NM522 conteniendo el fagósmido recombinante crecido en medio selectivo, se inocularon 5 ml de medio LB con ampicilina y se incubó a 37 °C con agitación toda la noche.
- Se inocularon 10 ml de medio LB con 1 ml del cultivo saturado y se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica de $DO_{600}=0,3$
- Se agregó fago *helper*, a una multiplicidad de infección de 20:1 (fago a células) y se continuó el desarrollo del cultivo por 6-8 hs a 37 °C.
- Se centrifugó dos veces durante 15 min a 10.000 xg.
- Se precipitó el fago agregando 1/4 de volumen de una solución 3,5 M de acetato de amonio, pH 7,5, 20 % PEG 8000.
- Se mezcló por inversión y se dejó a temperatura ambiente por 20 min.
- Se centrifugó durante 10 min a 12.000 xg. Se retiró el sobrenadante y se volvió a centrifugar por 1 min para remover el resto de PEG, eliminando el sobrenadante por aspiración.
- Se resuspendió en H_2O y se extrajo con 1 volumen de fenol: cloroformo:isoamílico (25:24:1) y posteriormente con 1 volumen de cloroformo:isoamílico (24:1).
- Se precipitó con etanol y se resuspendió el *pellet* en 20 μ l de H_2O .
- Se analizó la eficiencia de la recuperación por electroforesis en geles de agarosa nativos 0,8 %.

4. MARCACION DE SONDAS

4.1. Marcación por *multipriming*

Se utilizó el método desarrollado por Feinberg y Vogelstein (7,8), el que emplea una mezcla de secuencias hexanucleotídicas obtenidas al azar como iniciadores de la síntesis, sobre un molde de DNA linearizado y desnaturalizado. La extensión de los iniciadores se realiza por acción del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E.coli*, en presencia de nucleótidos fríos y marcados. De esta forma se obtienen sondas marcadas en ambas hebras del DNA de muy alta actividad específica (hasta 10^7 cpm/ug).

- Se desnaturalizó la muestra de DNA (25-100 ng en un volumen de 10 μ l) por calentamiento a 100°C durante 2 min, y se colocó en hielo por 2 min.
- Se agregaron 4 μ l de *buffer* OLB 5x (PIPES 500 mM, pH 6,6; MgCl₂ 25 mM; DTT 50 mM; *random* hexanucleótidos 1,25 mg/ml; BSA 1 mg/ml), 2 μ l de solución NUC 10X (dGTP, dATP, dTTP 0,2 mM c/u), 2 μ l de ³²P dCTP y 2 μ l de Klenow (1u/ μ l).
- Se incubó durante 4 hs a 37 °C, o durante toda la noche a temperatura ambiente.
- La reacción se detuvo agregando 5 μ l de EDTA 0,5 M para quelar el Mg²⁺ presente e inhibir la actividad enzimática.

4.2. Marcación por *nick translation*

La técnica involucra la utilización de las actividades 5'-3' polimerasa y 5'-3' exonucleasa de la DNA polimerasa I de *E. coli* y la actividad endonucleasa de la DNAsa I (9). A baja concentración y en condiciones controladas de temperatura, la DNAsa I produce cortes puntuales en las cadenas de DNA dejando extremos

5'PO₄³⁻ y 3'OH libres. La DNA polimerasa I desplaza el corte a lo largo de la cadena de DNA (actividad exonucleasa) reemplazando nucleótidos fríos por nucleótidos radioactivos (actividad polimerasa). Se obtienen de esta manera sondas con una alta actividad específica (hasta 10⁶ cpm/μg). La técnica también fue utilizada para obtener sondas no radioactivas, mediante la utilización de biotina-14-dATP, (BRL).

- Se preparó la siguiente mezcla de reacción, manteniendo los componentes en hielo: 2,5 μl de dNTP 10X (dTTP, dCTP, dGTP 0,5 mM de c/u), 2,5 μl de *buffer* DNA polimerasa I 10x (Tris-ClH 0,5 M, pH 7,5; MgCl₂ 0,1 M; DTT 10 mM; BSA 0,5 mg/ml), 3 μl de [³²P]dATP 3.000 Ci/mmol (30 μCi), 1 μl de DNAsa I (dilución 1:10.000 de una solución stock de 1 mg/ml) y 1 μl de DNA polimerasa I (5 a 15 u)
- Se agregaron 0,25 μg de DNA en 15 μl de H₂O.
- Se incubó a 12 °C durante 30 min y finalmente se detuvo la reacción agregando 1 μl de EDTA 0,5 M.

4.3. Preparación de sondas sulfonadas

La sulfonación es un método para marcar sondas de DNA en forma no radioactiva. Posteriormente a la hibridación, estas sondas pueden ser visualizadas por métodos inmunoenzimáticos utilizando un anticuerpo monoclonal específico contra los grupos sulfonados. El DNA se marca mediante una reacción química en la cual los restos de citosinas se sulfonan en presencia de bisulfito de sodio y metoxiamina (12).

- Se desnaturalizaron 10 μl de DNA (0,5 μg/ml), a 100 °C durante 5 min y se enfrió luego rápidamente en hielo.

- Se agregaron 5 μ l de solución bisulfito de sodio 2 M, pH 6, y se agitó en Vortex.
- Se agregó 1,25 μ l de solución O-metilhidroxil-amina 2 M, pH 6, y se mezcló por agitación.
- La mezcla se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente.

4.4. Eliminación de nucleótidos no incorporados

El método que fue utilizado más a menudo se basa en la precipitación selectiva del DNA con acetato de amonio y etanol. Con este método se pueden precipitar fragmentos de DNA mayores que 20 bp. También se utilizó cromatografía de exclusión molecular a través de columnas de Sephadex G-50.

Precipitación selectiva:

- Se agregó H₂O a la mezcla de reacción hasta un volumen final de 100 μ l.
- Se agregaron 2 μ g de DNA de esperma de salmón como *carrier*, medio volumen de acetato de amonio 7,5 M, pH 7, y 2 volúmenes de etanol 100%.
- Se incubó a -70°C durante 20 min.
- Se dejó a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugó 15 min a 12.000 xg.
- Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 100 μ l de H₂O.
- Se precipitó nuevamente el DNA agregando 50 μ l de acetato de amonio y 300 μ l de etanol 100%, como en la precipitación anterior.
- Finalmente se resuspendió el *pellet* en 100 μ l de H₂O.

5. METODOS ELECTROFORETICOS

5.1. Electroforesis de DNA

5.1.1. Agarosa nativa

- Se utilizaron geles de agarosa entre 0,5-1,8 %.
- El *buffer* que se utilizó fue TBE que contenía Tris-borato 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM. Los geles contenían 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. El *buffer* de corrida no lleva bromuro de etidio. Las corridas se realizaron en general, a un campo de 5-10 V/cm y a temperatura ambiente.
- La composición del *buffer* de siembra utilizado fue glicerol 50 %, TBE 5X y azul de bromofenol 1%, (*buffer* 5X).
- Los geles fueron fotografiados a través de un transiluminador de luz ultravioleta de 300 nm, utilizando una cámara Polaroid MP-4 con filtro rojo (RPC4) y película Polaroid 667.
- El límite de detección, para una banda independiente, fue de aproximadamente 10 ng.

5.1.2. Agarosa alcalina

- Se preparó el gel fundiendo la agarosa en H₂O en un horno de microondas y luego de enfriar a aproximadamente 50 °C, se agregó *buffer* alcalino de corrida a partir de un *stock* 10X (NaOH 300 mM, EDTA 20 mM), para lograr una concentración final 1X
- El gel fue corrido en *buffer* alcalino de 1X, a 5 V/cm y a 4°C.
- Las muestras fueron resuspendidas en *buffer* de carga alcalino (NaOH 30 mM, EDTA 2 mM, Ficoll 400 3% y verde de bromocresol 0,3 mg/ml) y fueron calentadas a 100 °C durante 2 min antes de sembrarlas en el gel.

5.1.3. Aislamiento de fragmentos de DNA por electroelución

Se utilizó una modificación del método de Yang *et al* (1979).

- La banda de DNA a purificar fue resuelta en un gel nativo de agarosa conteniendo 0,5 µg/ml de bromuro de etidio, utilizando las condiciones previamente descritas.
- Finalizada la corrida, se extrajo un taco de agarosa conteniendo la banda a purificar y se la depositó sobre un pocillo (hecho en otro gel sin bromuro de etidio), previamente tapizado con una membrana de diálisis. Las membranas fueron pretratadas a 100 °C durante 5-10 min en una solución de HNaCO_3 2 %, EDTA 10 mM y luego lavadas con H_2O deionizada.
- El nivel del *buffer* de corrida (TBE 1X) se mantuvo en el mínimo necesario para lograr un correcto contacto entre los electrodos.
- La electroelución se llevó a cabo a 5 V/cm durante aproximadamente 30-90 min, dependiendo del tamaño de la banda. El proceso fue controlado por iluminación con una lámpara UV de mano.
- Confirmada la transferencia a la membrana de diálisis, se procedió a la purificación del DNA. Para ello, sin cortar la corriente, se extrajo la membrana y se la lavó 3 veces con 150 µl H_2O , se juntaron los lavados y se extrajeron con 1 volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), se precipitó luego el DNA con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol. Las muestras fueron resuspendidas en H_2O y mantenidas a -20 °C hasta su uso.
- El rendimiento de las electroeluciones fue de aproximadamente 60-80 %, de la masa aplicada al gel.

- El DNA aislado, fue lo suficientemente puro como para ser usado en reacciones de restricción, de ligación y de marcación de sondas.

Una alternativa a la utilización de membranas de diálisis fue el uso de membranas de DEAE-Celulosa (Schleicher and Schuell). En este caso se siguió el protocolo provisto por el fabricante.

5.1.4. Geles desnaturalizantes

- Se prepararon a partir de una solución *stock* de acrilamida 38% y bisacrilamida 2 %.
- Se disolvieron 21 g urea en 50 ml de acrilamida/*buffer* TBE.
- La polimerización se llevó a cabo por agregado de 500 μ l de persulfato de amonio 10 % y 50 μ l de TEMED.
- Se usaron geles verticales de 40x35 cm, y la corrida se realizó a 60 W de potencia constante.
- Los geles fueron fijados durante 15-20 min en metanol 10% acético 10 % y luego se secaron bajo línea de vacío a 80°C, durante 1,5-2 hs.
- Como *buffer* de siembra se usó: formamida 80 %, TBE 1X, BPB 0.2 %, xilen cianol 0,2 %. Las muestras fueron calentadas a 80 °C durante 2 min antes de ser sembradas.

5.2. Electroforesis de RNA en geles de agarosa

- Se prepararon geles de agarosa-formaldehído, según el método descrito por Lehrach *et al* (1977).
- Se fundió la agarosa en un volumen adecuado de H₂O deionizada, se dejó enfriar a 55-60 °C y se agregó formaldehído hasta una concentración de 6% y *buffer* MAE hasta alcanzar una concentración final de 1X (MAE 10X: MOPS 0,2 M, acetato de sodio 50 mM y EDTA 10 mM, pH 7,0).
 - La muestra a sembrar se resuspendió en 50 % de formamida conteniendo 6 % de formaldehído y *buffer* MOPS 0,02 M. Se calentó a 65 °C durante 10-15 min, se enfrió 2 min en hielo, se agregaron 1,5 µl bromuro de etidio 0,1 % y 2 µl *buffer* de siembra (BPB) y se corrió a 200 V, con recircularización del *buffer*.
 - Al finalizar la corrida, se lavó el gel durante 30 min en *buffer* fosfato 25 mM, pH 6,5, y se transfirió por capilaridad según el esquema diseñado por *Southern*.
 - Se utilizaron membranas de nylon (GeneScreen) previamente equilibradas en *buffer* fosfato 25 mM, pH 6,5. Luego de 12-16 hs de transferencia, las membranas se calentaron durante 2 hs a 80 °C para eliminar el formaldehído.
 - Las membranas se guardaron entre dos papeles Whatmann 3MM hasta su uso en la hibridación.

5.3. Electroforesis de proteínas

- Se utilizaron geles planos de poliacrilamida-SDS (Laemmli, 1970), de 10x10 cm y 0,75 mm de espesor.
- El gel separador contenía acrilamida-bisacrilamida (30:1) 12,5 %, *buffer* Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8 y SDS 0,1 %.

- El gel concentrador contenía acrilamida-bisacrilamida (30:1) 5%, *buffer* Tris-HCl 0,13 M, pH 6,8 y SDS 0,1%.
- La corrida se realizó en *buffer* Tris 25 mM, glicina 190 mM, pH 8,8 y SDS 0,1 %.
- El gel fue corrido a una intensidad constante de 20 mA, durante aproximadamente 2 hs.
- Como patrones de peso molecular se utilizó un *kit* comercial conteniendo triosa-fosfatoisomerasa (26,6 Kd), láctico deshidrogenasa (36,5 Kd), fumarasa (48,5 Kd), piruvato quinasa (58 Kd), fructosa-6P quinasa (84 Kd), β -galactosidasa (116 Kd) y α 2-macroglobulina (180 Kd).
- Los geles se tiñeron con una solución conteniendo Coomassie Brilliant Blue R250 0,05 %, metanol 40 %, TCA 10 %, durante 3 hs a temperatura ambiente y se lavaron luego durante varias horas en una solución de metanol 45 % y ácido acético 10 % para eliminar la tinción no específica.

5.3.1. Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa.

Luego de efectuar la corrida electroforética, los geles se sumergieron en el *buffer* de transferencia (fosfato 25 mM, pH 6,5). Se cortó un trozo de nitrocelulosa del tamaño del gel, y se hizo un "emparedado" agregando: una esponja tipo "Scotch Brite", tres trozos del tamaño del gel de papel de filtro Whatmann 3MM, la nitrocelulosa, el gel, tres trozos de papel 3MM y otra esponja como la antes mencionada. El "emparedado" se ensambló en el cartucho de transferencia y éste se colocó dentro de la cuba de electrotransferencia (Bio Rad), la que se llenó luego de *buffer*. Las transferencias se efectuaron durante la noche a 100 mA corriente constante, o en 2-3 hs a 400 mA.

5.3.2. Transferencia por peso

Se hizo un ensamble similar al descrito en el protocolo anterior, con la diferencia que se utilizaron dos membranas de nitrocelulosa una de cada lado del gel, lo que permitió obtener duplicados para su posterior análisis. El conjunto se colocó dentro de un recipiente que contenía *buffer* (fosfato 25 mM, pH 6,5), sobre el emparedado se colocó un vidrio y encima de este un peso de aproximadamente 2 Kg. La transferencia se realizó a temperatura ambiente y durante toda la noche.

6. CONSTRUCCION DE BIBLIOTECAS DE cDNA DEL VIRUS PVY

6.1. CONSTRUCCION DE UNA BIBLIOTECA DE cDNA EN EL FAGO VECTOR

λ gt11

Se construyó siguiendo el procedimiento descrito por Huynh *et al* (1985); la síntesis del cDNA se realizó por el método ideado por Gubler & Hoffman (1983).

6.1.1. Síntesis de cDNA por el método de Gubler & Hoffman.

Síntesis de la primer cadena

La primer cadena del cDNA se sintetizó por la acción de la enzima transcriptasa reversa del virus de la amieloblastosis aviaria (AMV), utilizando oligodeoxitimidina como secuencia iniciadora específica de mensajeros poliadenilados y en presencia de una baja concentración de deoxinucleótidos marcados con P^{32} para monitorear la síntesis de cDNA.

Materiales y Métodos

- Se trataron 5 µg de gRNA viral con 1 volumen de hidróxido de metil mercurio, y se dejó reposar la solución durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación se agregó 1 µl de β-mercaptoetanol y se enfrió en hielo.
- La solución de síntesis de la primer cadena de cDNA contenía, además del RNA desnaturalizado, los siguientes componentes:

RNAsin (Promega) 25 u/µl	4 µl
10X FSB	5 µl
dNTP 25 mM/de cada deoxinucleótido	8 µl
Oligo dT ₁₂₋₁₈ 1 µg/µl	1,5 µl
5'-[α ³² P]P dCTP 10 µCi/µl	2 µl
Transcriptasa reversa AMV 17 u/µl	3 µl
H ₂ O csp 50 µl	

1xFSB = Tris-ClH 100 mM, pH 8,3, MgCl₂ 10 mM, KCl 140 mM

La mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a 42 °C. El híbrido RNA-cDNA fue extraído una vez con fenol y tres veces con éter, y se precipitó en 0,3 M NaCl por el agregado de 2,5 volumen de etanol.

Síntesis de la segunda cadena

El híbrido RNA-DNA obtenido en la etapa anterior se trató con RNasa H en presencia de DNA polimerasa I (Kornberg) de *E. coli* y DNA ligasa del fago T₄. El *pellet* obtenido en la etapa anterior se resuspendió en 42 µl de H₂O y se le agregó:

Materiales y Métodos

10X SSB	4 μ l
dNTP 10 mM/de cada deoxinucleótido	1 μ l
5'-[α 32]P dCTP 10 μ Ci/ μ l	1 μ l
RNasa H (Boehringer) (10 u/ μ l)	1 μ l
DNA Polimerasa I (Boehringer) (5u/ μ l)	2 μ l
T ₄ DNA ligasa (1u/ μ l)	1 μ l

1XSSB = Tris-CLH 20 mM, pH 7,5, MgCl₂ 4 mM, KCl 80 mM, NAD 150 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, BSA 2,5 μ g/ μ l

La mezcla se incubó 1 hora a 15 °C (actividad de RNasa H) y 1 hora a 37 °C (actividad de DNA polimerasa I y ligasa). Los nucleótidos no incorporados se separaron por pasaje de la mezcla de reacción a través de una columna de Sephadex G-50. A las fracciones que contenían el cDNA se las extrajo una vez con fenol y tres con éter, y se las precipitó en 0,3 M NaCl por el agregado de 2,5 volúmenes de etanol. El cDNA precipitado se resuspendió en 10 μ l de H₂O.

6.1.2. Metilación de los sitios *EcoRI* del cDNA

La metilación de los sitios *EcoRI* se llevó a cabo por la acción de la *EcoRI* metilasa de *E.coli* utilizando S-adenosil-metionina como sustrato (SAM).

- A los 10 μ l provenientes de la síntesis de cDNA se agregaron 40 μ l de *buffer* metilasa 10X (Tris-CLH 1 M, pH 8, EDTA 100 mM), 3 μ l de BSA libre de RNAsas, 1 μ l de SAM y 1 μ l de *EcoRI* metilasa, siendo el volumen final de la reacción de 400 μ l.
- Se incubó durante 1 h a 37 °C y se inactivó la enzima calentando durante 20 min a 65 °C.

6.1.3. Rellenado por *fill-in* de los extremos 3' recesivos

- Al producto de la reacción anterior se le agregó 10 μ l de *buffer* Core 10X, 4 μ l de dNTPs 10 mM y 66 μ l de H₂O, y se incubó 15 min a temperatura ambiente.
- Se hicieron dos extracciones con fenol y tres con éter, se precipitó en 0,3 M NaCl por agregado de 2,5 volúmenes de etanol y se resuspendió en 5 μ l de H₂O.

6.1.4. Ligación de *linkers* *Eco*RI

La mezcla de ligación contenía los 5 μ l de cDNA obtenido en el paso anterior más los siguientes componentes:

<i>Eco</i> RI <i>linkers</i> 1 μ g/ μ l	1 μ l
Ligasa T ₄	1 μ l
<i>Buffer</i> ligasa 10X	1,5 μ l
ATP 10 mM	1,5 μ l
DTT 10 mM	1,5 μ l
H ₂ O csp 15 μ l	

Se incubó durante 16 hs a 15-16 °C y la ligasa se inactivó calentando por 10 min a 70 °C.

6.1.5. Digestión con la enzima *EcoRI* para generar extremos cohesivos

- A los 15 μ l de la mezcla de ligación se agregó 1 μ l de *buffer EcoRI*, 1 μ l de enzima (100 u/ μ l) y H₂O hasta un volumen final de 100 μ l.
- Se incubó por 4 hs a 37°C y se agregó EDTA para detener la reacción.

6.1.6. Separación del exceso de *linkers* y fraccionamiento por tamaño de los cDNAs

Se utilizó una columna de Sepharose CL-4B (Pharmacia) equilibrada en 0,1 M Tris-ClH, pH 7,5, 1 M NaCl, 10 mM EDTA. (*buffer SB*)

- Se lavó la columna cuatro veces en el *buffer SB*
- Se sedimentó la columna y se lavó durante 48 hs con 50 ml de *buffer SB* (flujo: 1 ml/h)
- Se agregaron 3 μ l de *buffer* de siembra 6X a la muestra (19 μ l) y se sembró en la columna. El flujo se ajustó a 0,5-0,6 ml/h.
- Se colectaron fracciones de 3 gotas (50-60 μ l) y se midió la radioactividad en un contador de centelleo.
- Se corrieron alícuotas de 3 μ l de las muestras radioactivas en un gel de agarosa de 1 %.
- Finalizada la corrida, se puso a exponer con película X-Omat (Kodak) a -70 °C con pantalla amplificadora.

6.1.7. Clonado del cDNA viral en el vector λ gt11

Determinación de la relación óptima inserto/brazos del vector en la mezcla de ligación

Una vez reunidas las fracciones de interés se procedió a ligarlas en distintas proporciones con los brazos de λ gt11, para determinar la relación óptima, es decir, aquella con la que se obtiene mayor rendimiento de fagos recombinantes luego del empaquetamiento.

- Se precipitó conjuntamente 1 μ l de brazos de λ gt11 (1 μ g/ μ l) con 1/6 y 3/6 del volumen total de cDNA colectado, mediante el agregado de NaCl hasta concentración final de 0,3 M más 2,5 volúmenes de EtOH. La mezcla se incubó a -70°C durante 20 min.
- Como control de la reacción, se precipitó 1 μ l de los brazos de λ gt11 con 1 μ l de un inserto control.
- Para efectuar la ligación el DNA *pellet* se resuspendió en la siguiente mezcla:

<i>buffer</i> ligasa	1 μ l
H ₂ O	6 μ l
ATP 1 μ l	10 mM
DTT 1 μ l	10 mM
Ligasa T ₄ 1 u/ μ l	1 μ l

Se incubó durante toda la noche a 15-16 $^{\circ}\text{C}$.

Empaquetamiento *in vitro* del DNA ligado

Se utilizaron los extractos Packagene (Promega Biotec) siguiendo las instrucciones del fabricante:

- 2 μ l de cada mezcla de ligación (incluyendo en este paso DNA de λ gt11 como control), se mezclaron con 10 μ l de extractos de empaquetamiento inmediatamente después de descongelarlos y se incubaron durante 2 hs a 22 °C.
- A continuación se agregó a cada tubo 0,3 ml de SM (NaCl 100 mM; MgSO₄ 10 mM; Tris-HCl 50 mM pH, 7,5, gelatina 0,1 %) y 10 μ l de cloroformo.

Obtención de bacterias RY1090 competentes

Una colonia crecida en medio LB-ampicilina se inoculó en 100 ml de LB conteniendo 100 μ g/ml ampicilina y 0,2 % maltosa, y se incubó durante una noche a 37 °C con agitación. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 2.000 xg durante 6 min a 4 °C, y se resuspendieron en 0,4 volumen de una solución estéril de MgSO₄ 10 mM. Las bacterias competentes se pueden guardar hasta 15 días a 4 °C.

Plaqueo de la biblioteca de λ gt11 en bacterias RY1090

Aproximadamente $2 \cdot 10^4$ ufp en 100 μ l de SM se mezclaron con 100 μ l de bacterias competentes (ver paso anterior) y se incubaron durante 20 min a 37 °C. A continuación se mezclaron con 3,5 ml de LB-0.7 % de agar, fundido a 50 °C, se homogeneizaron y se vertieron en cajas de Petri conteniendo LB-agar-ampicilina

previamente calentadas a 42 °C. Se dejó secar cerca de un mechero durante 10 min y se incubó a 42 °C hasta que las placas de lisis fueron claramente visibles (alrededor de 3 hs).

Titulación de los fagos recombinantes

Se titularon 1 y 10 µl, de cada mezcla de empaquetamiento, utilizando bacterias RY1090, en placas de Petri conteniendo 40 µl de X-gal 20 % y 20 µl de IPTG 100 mM. Las placas se incubaron durante 3 hs a 42 °C y se contaron las placas LacZ⁻ (blancas, recombinantes) y las LacZ⁺ (azules, no recombinantes).

El resto de la mezcla de ligación con la que se obtuvo la mayor eficiencia, se empaquetó y tituló de manera similar a la descripta.

6.1.8. Amplificación de la biblioteca en λgt11

Se siguió el procedimiento descrito por Maniatis *et al* (1982). Los productos de los empaquetamientos se plaquearon en cajas de 15 mm (aproximadamente 2.10⁴ fagos por caja), utilizando bacterias RY1090.

- Las cajas se incubaron a 42 °C durante 3-4 hs hasta que se obtuvieron placas de lisis.
- A continuación se agregaron 8 ml de *buffer* SM a cada caja, y se incubaron a 4 °C durante la noche.
- Al día siguiente se colectó el *buffer* y cada caja se lavó con 2 ml adicionales de SM que se reunieron con el resto. Se centrifugó a 7.000 xg y se descartó el *pellet* (restos bacterianos). Se agregaron al sobrenadante 30 µl/ml de cloroformo y la biblioteca así amplificada se guardó a 4 °C.

6.2. CONSTRUCCION DE UNA BIBLIOTECA DE cDNA EN EL PLASMIDO VECTOR pUC13

El virus fue purificado según el método de Murphy modificado y el gRNA se obtuvo tratando al virus purificado con proteinasa K y fenol (Método 2).

Para la síntesis del cDNA se utilizó un kit comercial (Amersham), y como iniciador se utilizó el oligonucleótido, cuya secuencia es: 5'GGATCCTGATGTCTAACTTC3', que hibrida a los nucleótidos 3641 a 3655 de la secuencia de PVYn.

Al cDNA se le ligaron adaptadores *EcoRI*, se fraccionó por tamaño en un gel de agarosa al 1% y se electroeluyeron los fragmentos mayores de 1.000 bp. Luego de fosforilar los extremos de los adaptadores con la enzima polinucleótido quinasa del fago T4, se ligó el cDNA al vector pUC13 que había sido previamente digerido con la enzima *EcoRI* y tratado con fosfatasa alcalina. Finalmente se transformaron células *E. coli* NM522.

7. SUBCLONADO DE FRAGMENTOS DE DNA EN PLASMIDOS

7.1. Preparación de vectores e insertos

Se utilizaron los siguientes vectores: pBSSK (Bluescript-Stratagene), pUC18 y pUC13 (Yanisch Perron *et al*, 1985), pGEM4Z (Promega-Biotech), pRIT2T (Pharmacia), y pBI121 (Jefferson *et al*, 1987).

- Para su utilización en reacciones de ligación, se digirió 1 µg del plásmido con las enzimas adecuadas en el *buffer* correspondiente.
- En el caso de digestiones simples, el vector fue defosforilado en su extremo 5' para evitar la reacción de religado. Para ello se utilizó fosfatasa alcalina (CIP) a una concentración de 10 mU/pmol de extremos 5'.

- En caso de digestiones dobles, la forma lineal del plásmido fue purificada mediante electroelución de geles de agarosa.
- Para su utilización los vectores se resuspendieron en H₂O a una concentración aproximada de 50 ng/μl.
- Los insertos fueron, en general, purificados en geles de agarosa, en algunos casos fueron liberados del clon original por digestión con las enzimas de restricción adecuadas y luego de inactivar a éstas por calor se utilizaron directamente en las reacciones de ligación

7.2. Reacciones de ligación de DNA

- Para las reacciones de ligación se utilizaron entre 20 y 100 ng vector (20 ng para vectores con corte simple y defosforilado y 100 ng para vectores con corte doble).
- Los volúmenes de reacción fueron entre 10 y 20 μl, utilizando 0,5 μl (ligación de extremos cohesivos), ó 1 μl (ligación de extremos romos) de DNA ligasa del fago T₄ (1 u/μl).
- Las temperaturas y los tiempos de reacción dependieron del tipo de extremos utilizados en cada caso:
- las ligaciones con extremos romos se realizaron durante 12 hs a temperatura ambiente.
- Las ligaciones con extremos cohesivos se realizaron durante 2-3 hs a 14-16 °C.
- Se incluyó siempre un control conteniendo vector sin inserto, para estimar el aporte del vector no cortado o religado al número total de colonias obtenidas luego de la transformación.
- La relación vector:inserto utilizada fue de aproximadamente 1:2 a 1:5, se realizaron varias reacciones, manteniendo constante la masa de vector y variando la cantidad de inserto.

- Por lo general luego de la reacción de ligación se procedió inmediatamente a la transformación. En algunos casos las reacciones se mantuvieron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

7.3. Preparación de bacterias *E. coli* competentes (Método de Hanahan 1985)

- Se partió de una colonia aislada en una placa de medio mínimo (o del medio selectivo adecuado para la cepa de *E. coli* a utilizar), con la que se realizó una estria en una placa de medio SOB (triptona 2 %; extracto de levadura 0,5 %; NaCl 10mM; KCl 2,5 mM; MgCl_2 10 mM; MgSO_4 10 mM). La misma se incubó durante toda la noche.
- Se tomaron con un ansa varias colonias de aproximadamente 2-3 mm de diámetro (una colonia cada 10 ml de medio a utilizar), se colocaron en un tubo Eppendorf conteniendo 1 ml de medio SOB, se dispersaron por agitación y se utilizaron para inocular medio SOB contenido en un Erlenmeyer.
- Se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación hasta $\text{OD}_{550}=0,7$ y luego se enfrió el cultivo colocándolo en hielo durante 15 min.
- Se cosecharon las bacterias por centrifugación a $1.500\text{ } \times g$ por 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, en tubos Falcon.
- Se descartó el sobrenadante y se secaron brevemente los tubos por inversión sobre papel absorbente.
- Las células se resuspendieron en solución TFB (KCl 7,4 g/l; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 8,9 g/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,5 g/l; $\text{Co}(\text{NH}_2)_4\text{Cl}_3$ 0,8 g/l; KMES 20 ml/l de una solución 0,5 M, pH 6,3) utilizando 1/3 del volumen del medio original.
- Se dejó en hielo durante 15 min y se cosecharon las bacterias por centrifugación a 3.000 rpm durante 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Se resuspendieron las bacterias en solución TFB (1/12,5 del volumen del medio original).

- Se agregó 7 μ l de DMSO-DTT (DTT 0,153 g/ml; DMSO 0,9 ml/ml; acetato de potasio 10 mM, pH 7,5), por cada 200 μ l de suspensión de bacterias. Se agitó unos segundos y se dejó en hielo durante 10 min.
- Se agregó una segunda alícuota de solución DMSO-DTT, se procedió como en el paso anterior y se incubó en hielo durante 20 min.
- Finalmente se fraccionaron las células en alícuotas de 200 μ l en tubos Eppendorf.

7.4. Transformación

- Se agregó el DNA (en un volumen menor que 10 μ l), a un tubo conteniendo 200 μ l de células competentes. Se agitó y se incubó en hielo durante 40 min.
- Se colocó el tubo en un baño a 42 °C durante 90 seg y luego en hielo durante 2 min.
- Se agregaron 800 μ l de medio SOC (SOB más glucosa hasta 20mM final) y se incubó a 37 °C por 45 min con agitación moderada.
- Se centrifugó durante 5 seg en microcentrífuga y se descartaron 800 μ l del sobrenadante.
- Luego de resuspender las células en los 200 μ l restantes del sobrenadante, se sembró sobre una caja de Petri conteniendo medio selectivo. En aquellos casos en que el plásmido poseía el sistema de selección por α -complementación de β -galactosidasa, se agregaron 40 μ l de IPTG 100 mM, 40 μ l de X-Gal 2 % en dimetilformamida. Se incubó durante toda la noche a 37 °C.

7.5. Preparación de bacterias competentes, *A. tumefaciens*

- Se crecieron bacterias LBA4404 en medio LB (200 ml) conteniendo rifampicina y estreptomina (100 µg/ml de cada uno de los antibióticos), con agitación a 26 °C hasta $DO_{600}=0,5$.
- Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 1.100 xg durante 15 min a 4 °C.
- Se lavaron con 200 ml de H₂O estéril a 4 °C y se volvieron a cosechar como en el paso anterior.
- Finalmente las bacterias se resuspendieron en 1 ml de glicerol 10 % estéril y se utilizaron en la transformación o se congelaron en N₂ líquido y se conservaron a -70°C.

7.6. Transformación

- Se mezclaron 50 µl de bacterias con 1 µg de plásmido y 50 µl de medio LB, se congelaron en N₂ líquido durante 5 min y se descongelaron en un baño a 37 °C durante 20 min.
- El paso de congelación-descongelación se repitió dos veces más. Se agregaron luego 15 ml de medio LB y se incubó durante 16 hs a 26 °C
- Se cosecharon las bacterias por centrifugación, se resuspendieron en 100 µl de medio LB y se sembraron en medio selectivo (LB-agar conteniendo 100 µg/ml de rifampicina, estreptomina y kanamicina.)

8. IDENTIFICACION DE SECUENCIAS POR HIBRIDACION

8.1. Identificación de colonias recombinantes (Grunstein-Hogness, 1975)

- En algunos casos de subclonado en plásmidos, se utilizó la hibridación para constatar la identidad de las posibles colonias positivas
- Se cultivaron bacterias en cajas de Petri hasta obtener colonias de 1-2 mm de diámetro. Los cultivos se mantuvieron durante 30 min a 4 °C antes de procesarlos.
- Se utilizaron como soporte de transferencia discos de nitrocelulosa previamente rotulados.
- Los filtros se apoyaron suavemente sobre las colonias durante 3 min a temperatura ambiente.
- Transcurrido ese tiempo, los filtros se levantaron con cuidado y con las colonias hacia arriba se colocaron, sucesivamente durante 5 min sobre papeles de filtro embebidos en SDS 10%, NaOH 0,5 N - NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 N pH 8 - NaCl 1,5 N.
- Finalmente, los filtros se lavaron en SSC 2X durante 5 min y se secaron a temperatura ambiente, quedando listos para proceder a la hibridación.
- Las placas de Petri conteniendo las colonias originales se incubaron luego durante 2 hs a 37 °C, para permitir el desarrollo de las mismas, y se guardaron a 4°C.

8.2. Identificación de secuencias de DNA (Southern blot)

(Southern, 1975)

- Cuando se analizó DNA genómico se corrieron muestras de 10 µg en geles de agarosa de 0.8 %. Los geles se tiñieron luego durante 20 min con bromuro de etidio y se lavaron con H₂O durante 5 min. Los geles fueron fotografiados antes de ser transferidos.
- Cuando se analizaron DNAs clonados (10 ng/banda), los geles fueron corridos en presencia de bromuro de etidio.
- Luego de la corrida electroforética, los geles se incubaron en HCl 0,25 N durante 15 min a temperatura ambiente, con el fin de depurar parcialmente el DNA. En el caso de los DNAs clonados se omitió este paso.
- Luego del tratamiento con ácido se desnaturalizó el DNA con NaOH 0,2 N, NaCl 0,6 N durante 30 min a temperatura ambiente.
- Se neutralizó luego en *buffer* fosfato 25 mM, pH 6,5, con varios lavados durante aproximadamente 1 h. Durante los últimos 20 min de la neutralización, se pretrató la membrana (GeneScreen, Dupont) equilibrándola durante este tiempo en *buffer* fosfato 25 mM, pH 6,5. Luego se procedió a la transferencia del DNA por capilaridad durante aproximadamente 12-16 hs.
- Los puntos de siembra de la muestra se marcaron con tinta. Se lavó la membrana en *buffer* fosfato para eliminar restos de agarosa y luego se calentó la membrana 2 hs a 80°C.
- La membrana se guardó a temperatura ambiente hasta la hibridación.

8.3. Identificación de secuencias de RNA (Northern blot)

- Los RNAs fueron separados electroforéticamente en geles conteniendo formaldehído, tal como se describió previamente.
- Una vez terminada la separación, se lavó y equilibró el gel en *buffer* fosfato 25 mM, pH 6,5, durante 30 min.
- El gel fue luego transferido por capilaridad en el mismo *buffer* fosfato a una membrana de nylon (GeneScreen, Dupont) equilibrada en el mismo *buffer*.
- Luego de la transferencia por 12-16 hs, la membrana se lavó, se secó a temperatura ambiente y se horneó a 80 °C durante 2 hs.
- La membrana se guardó a temperatura ambiente hasta su uso en la hibridación.

8.4. Condiciones de hibridación

- Se utilizaron aproximadamente 50-100 μ l de solución de hibridación, por cada cm^2 de membrana (en general, entre 5-10 ml). La prehibridación e hibridación se realizaron en bolsas de polietileno.
- La solución de prehibridación e hibridación contenía SSPE 2X, SDS 1 %, pirofosfato de sodio 0,001 %, ácido polianetolensulfónico 0,001 mg/ml
- En general se prehibridó alrededor de 1 h en baño de H_2O con agitación y a la temperatura adecuada
- Luego de la prehibridación, se desnaturalizó la sonda por calor a 100 °C durante 3 min y se inyectó en la bolsa utilizando una jeringa de tuberculina.
- Todas las hibridaciones fueron hechas con 10^8 cpm/ml de solución de hibridación, salvo para hibridación en colonias y segundo *screening*, en que se usó $3-5 \times 10^8$ cpm/ml.

- Se incubó con agitación durante 12-16 hs, a la temperatura adecuada, luego de lo cual se lavó una vez con 1X SSC (o SSPE), 0,1 % SDS durante 15 minutos a temperatura ambiente, dos veces con 0,1X SSC (o SSPE), 0,1 % SDS durante 15 minutos a 65 °C y una vez con 0,1X SSC (o SSPE) 5 minutos a temperatura ambiente.
- Las membranas fueron expuestas con película radiográfica (X-O-Mat, Kodak) y pantalla intensificadora a -70 °C por periodos de tiempo que variaron entre 12 y 48 hs.

9. TOMA DE MUESTRAS PARA DIAGNOSTICO.

9.1 *Squash-blot*

El muestreo por *squash blot* fue introducido originalmente por Navot *et al* (1989) como un procedimiento de toma de muestra sencillo y rápido para el diagnóstico con sondas radioactivas. Este procedimiento de muestreo puede utilizarse también para el diagnóstico con anticuerpos.

- Se colocó la membrana (nitrocelulosa o nylon) sobre una superficie dura y se fijó a la misma con cinta adhesiva.
- Sobre la membrana se colocó un molde de celuloide con perforaciones de 0,7 cm de diámetro y se fijó sobre la superficie de trabajo con cinta adhesiva.
- Se tomó con una pinza un trozo de hoja de aproximadamente 6-7 mm de diámetro.
- El trozo de hoja se colocó en el orificio correspondiente del molde de celuloide. Sobre ella se colocó, una laminilla de polietileno. El tejido vegetal fue presionado fuertemente sobre la laminilla con el extremo posterior de la pinza. Se descartaron los restos de tejido.

- Una vez aplicadas las muestras, se dejó secar al aire durante 10 min.
- La membrana fue horneada, entre dos papeles de filtro envueltos en papel de aluminio durante 2 horas a 80 °C. Este paso normalmente no se realizó con aquellas membranas que posteriormente se sometieron a análisis inmunológico.

9.2. Preparación de muestras para *dot-blot*

El objetivo del procedimiento fue obtener una preparación semipurificada de ácidos nucleicos en forma rápida para evitar la posible degradación del RNA viral por RNAsas presentes en el extracto vegetal.

- Se homogeneizaron 0,2 g de tejido en presencia de *buffer* de homogeneización (isotiocianato de guanidina 4 M; β -mercaptoetanol 50 mM; SDS 0,1 %; Tris-ClH 50 mM, pH 7,5; acetato de potasio 0,1 M), en una relación de 2 ml de *buffer* por cada gramo de tejido. El material se introdujo dentro de una bolsita de polietileno y se homogeneizó con la ayuda de un pilón.
- Se transvasó el líquido a un tubo Eppendorf y se calentó a 65°C durante 10 min.
- Se agregó un volumen de fenol:Cl₃CH:alcohol isoamílico (25:24: 1) y se centrifugó en microcentrífuga a 12.000 g durante 5 min.
- Se recuperó la fase acuosa, se agregaron 0,7 volúmenes de etanol absoluto y se incubó a -70 °C durante 30 min.
- Los ácidos nucleicos se recuperaron por centrifugación a 12.000 g durante 30 min a 4 °C, y se descartó el sobrenadante.

Materiales y Métodos

- El *pellet* se resuspendió en 500 μ l de *buffer* de siembra compuesto por 0,6 volúmenes de 20x SSC y 0,4 volúmenes de formaldehído 37 %, se incubó a 60 °C durante 15 min y se aplicó luego sobre la membrana.

Procedimiento utilizando columnas de intercambio aniónico

- Se homogeneizaron 0,2 g de hojas en un tubo Eppendorf de 1,5 ml conteniendo 0,5 ml de *buffer* de extracción (isotiocianato de guanidina 4 M, NaCl 0,4 M, β -mercaptoetanol 50 mM, MOPS 50 mM, pH 7, dietilpirocarbonato 0,5 %, etanol 15 %).
- Se centrifugó el homogenato en microcentrífuga por 1 min y el sobrenadante se pasó a otro tubo Eppendorf.
- Se equilibró una microcolumna (Quiagen-tip 5, Diagen) con 300 μ l de *buffer* NaCl 0,4 M, MOPS 50 mM, pH 7, etanol 15 %.
- Los ácidos nucleicos se unieron a la matriz haciendo pasar repetidas veces 150 μ l del homogenato clarificado por la microcolumna acoplada a una pipeta automática.
- Los contaminantes residuales se eliminaron lavando con 2 ml de NaCl 0,5 M, MOPS 50 mM, pH 7, etanol 15 %. Se utilizó en este caso una jeringa descartable de plástico acoplada a la microcolumna.
- Se eluyó el RNA de la resina con 3 lavados de 200 μ l de NaCl 1,05 M, urea 2 M, MOPS 50 mM, pH 7, etanol 15 %, formaldehído 7 %. Este procedimiento rinde rutinariamente 1-2 μ g de RNA total.

10. SECUENCIACION DE DNA

Se realizó por el método de terminación de cadena por dideoxinucleótidos (Sanger, 1977). Para ello se utilizó el kit de secuenciación Sequenase, (U.S.B.). Se utilizaron para las reacciones 5 μ Ci de [α - 32 S]dATP (1250 Ci/mmol).

10.1. Secuenciación de DNA de cadena simple:

- Se disolvieron 600 ng de DNA de cadena simple y 5 ng de iniciador en 10 μ l de H₂O. Se calentó a 65 °C por 2 min y se dejó enfriar lentamente hasta llegar a temperatura ambiente.
- Se procedió luego según el protocolo del kit de Sequenase

10.2. Secuenciación de DNA plasmídico de cadena doble:

- 2 μ g de DNA plasmídico purificado por centrifugación en un gradiente de densidad de CsCl se resuspendieron en 8 μ l de H₂O, se agregaron 2 μ l de NaOH 2 N y se dejaron 5 min a temperatura ambiente.
- Se agregó 1 μ l de iniciador (5 ng/ μ l) y 9 μ l de acetato de sodio 1 M, pH 5. Se mezcló, se agregaron 75 μ l de etanol y se colocó a -70 °C durante 20 min.
- Luego de centrifugar se lavó dos veces el *pellet* con etanol 80 % y se resuspendió en 10 μ l de *buffer* Sequenase (U.S.B.) 1X.
- A continuación se procedió según el protocolo del kit de Sequenase.

11. TECNICAS INMUNOLOGICAS

11.1. *Screening* serológico de la biblioteca construida en λ gt11

11.1.1. Soluciones y buffers

TBS: Tris-ClH 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM

TBS-T: TBS, Tween 20 0,05 %

TBS-G-L (Solución de bloqueo e incubación con anticuerpos):

TBS, leche descremada en polvo 3 %, glicina 2 %, PMSF 1 mM, azida 0,01 %.

11.1.2. Anticuerpos Utilizados

Se utilizaron anticuerpos policlonales que reconocen la cápside de PVY, cedidos gentilmente por el Dr. P.Gugerli (Station Fédérale de Recherches Agronomiques de Changins, Switzerland). Los mismos se utilizaron a una dilución de 1/1000.

11.1.3. Transferencia a nitrocelulosa de las proteínas producidas por los faos recombinantes e inducción con IPTG

- Ayudándose con dos pinzas de puntas planas, se colocó sobre las playas de lisis, un disco de nitrocelulosa (Schleicher and Schuell BA85), embebido en IPTG 10 mM y secado sobre papel de filtro.
- La posición del filtro se marcó pinchando el filtro y el agar con una aguja embebida en tinta china. Las cajas de Petri con las membranas se incubaron invertidas durante 2 hs a 37°C.

- Se retiraron los discos de nitrocelulosa cuidando de no desprender el agar y se los lavó durante 10 min con TBS. En el caso de requerirse una réplica adicional, se colocó un nuevo filtro y se incubó durante otras 3 hs a 37 °C.

11.1.4. Detección inmunológica de las proteínas recombinantes

- Para bloquear los sitios de unión inespecíficos y degradar el DNA que podría reaccionar con las inmunoglobulinas, se incubaron los filtros durante 30 min con TBS-G-L, conteniendo 30 unidades de DNAsa por placa.
- A continuación, se incubaron los filtros con la dilución del anticuerpo en una solución conteniendo TBS-G-L, 5% de lisado de *E. coli* RY1089 lisogénica para λ gt11 WT, Tween 20 0,05 %, PMSF 1mM y azida 0,01 %. La incubación se realizó durante 3 hs a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C, con agitación.
- Se lavó cuatro veces durante 10 min con TBS-T.
- Se incubó con suero de cabra anti-Ig de conejo biotinilado diluido 1/500 en TBS-G-L, Tween 20 0,05 % .
- Se lavó cuatro veces durante 10 min con TBS-T. Durante estos lavados se preparó una solución de avidina-biotina peroxidasa (Vectastain, Vector)
- Se homogenizó y se dejó a temperatura ambiente por lo menos 30 min antes de usar.
- Se incubó con la solución de avidina-biotina peroxidasa durante 1 h a temperatura ambiente.
- Se realizaron 3 lavados de 5 min con TBS (sin Tween 20 ni azida sódica)

Materiales y Métodos

- Se mezcló en el momento una solución conteniendo 60 mg de 4-cloro 1-naftol en 20 ml de metanol helado con 100 ml de TBS, imidazol 0,01 M. Se homogenizó y se agregaron a la mezcla 60 μ l de H₂O₂ 30% (100 vol). Se reveló dejando evolucionar la reacción de color al resguardo de la luz hasta que la relación señal-ruido de fondo fue la apropiada. En ese momento se detuvo la misma lavando con agua y secando sobre papel de filtro.

11.1.5. Aislamiento de un clon positivo

Para purificar los fagos positivos, se realizaron *screenings* sucesivos con menor cantidad de ufp por caja de Petri, hasta que todos los fagos dieron una señal positiva.

- Siguiendo las marcas del filtro, se ubicaron las zonas correspondientes a las placas de lisis que presentaban señales positivas y se aspiraron los fragmentos de agar conteniendo las mismas, con una pipeta
- Los trozos de agar se resuspendieron en 1 ml de SM conteniendo 30 μ l de cloroformo, y se dejó eluir por lo menos una noche antes de efectuar el *screening* siguiente.
- Se repitió el procedimiento hasta que todos los fagos resultaron positivos.

11.2 Detección por *squash-blot immunoassay* (SBIA)

La técnica permite detectar antígenos que han sido transferidos a un soporte sólido mediante el uso de anticuerpos. Los anticuerpos utilizados fueron cedidos por la Dra. Maria Luisa Mayoral del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Las

Materiales y Métodos

muestras se tomaron de la manera descrita previamente (muestreo por *squash-blot*). Luego de realizado el muestreo se procedió de la siguiente manera:

- Las membranas se incubaron en solución de bloqueo: Tris-ClH 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM (TBS), Tween 20 0,05 %, leche en polvo descremada 3 %, glicina 2 %, durante 60 min a temperatura ambiente.
- Las membranas se lavaron con TBS más Tween 20 0,05 % (TBST), 2 veces durante 2-3 min.
- Se incubó con anticuerpos anti-PVX o anti-PVY a la dilución adecuada (generalmente 1/1000), en solución de bloqueo, durante 60 min a temperatura ambiente con agitación.
- Se lavó 3 veces durante 10-15 min cada vez con TBST.
- Se incubó con el suero de cabra anti-Ig de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (dilución 1/1.500) en solución de bloqueo.
- Se lavó 3 veces con TBS a temperatura ambiente, durante 10 min cada vez.
- Se lavó una vez con *buffer* fosfatasa (Tris-ClH 100 mM, pH 9,5; NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM), durante 10 min a temperatura ambiente.
- Se reveló utilizando los siguientes sustratos: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP) 60 mg/ml en dimetilformamida 100 % y Nitro Blue Tetrazolium (NBT) 50 mg/ml en dimetilformamida 70 %. Se mezclaron 66 µl de NBT y 33 µl de BCIP en 10 ml de *buffer* fosfatasa. Se dejó evolucionar la reacción de color al resguardo de la luz, hasta que la relación señal-ruido de fondo fue la apropiada. En ese momento se detuvo la misma lavando los filtros con H₂O.
- Finalmente los filtros se lavaron con una dilución de hipoclorito de sodio al 1,5 %, durante aproximadamente 15 min, para eliminar la coloración de fondo debido a los pigmentos de la planta.

11.3. *Western-blot*

Luego de realizada la corrida electroforética y la transferencia, las membranas fueron procesadas como se indicó en el protocolo anterior (detección por *squash-blot immunoassay*).

11.4. *Dot-ELISA*

Se homogeneizaron hojas en *buffer* TBS, a razón de 1 mg de hojas por cada ml de *buffer* y se aplicaron sobre membranas de nitrocelulosa utilizando un equipo de filtración Minifold (Schleicher & Schull). Luego, las membranas fueron tratadas de la misma manera que para la detección por la técnica de *squash-blot immunoassay*

11.5 *Enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA)

- Se agregaron 0,2 ml de una dilución del anticuerpo en *buffer* Na_2CO_3 - NaHCO_3 10 mM, pH 9,6, en cada pocillo de la placa. Se cubrió la placa y se incubó 2 hs a 37 °C.
- Se removió la dilución del anticuerpo y se lavó 3 veces con *buffer* de lavado (PBS 1X, Tween 20 0,05 %, pH 7,4). Se eliminó completamente el *buffer* de lavado.
- Las muestras de tejido vegetal se homogenizaron en *buffer* PBS 1 X, Tween 20 0,05%, albúmina sérica bovina 4 %, pH 7,4, a razón de 100 mg de tejido por ml de *buffer*. Se colocaron 0,2 ml de muestra en cada pocillo y se incubó durante toda la noche a 4 °C.

- Se removió la solución de los pocillos y se lavó 3 veces con *buffer* de lavado. Se eliminó completamente el *buffer* de lavado.
- Se agregaron a cada pocillo 0,2 ml de dilución del anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina en *buffer* Na_2CO_3 - NaHCO_3 10 mM, polyvinilpirrolidona 20 g/l PM 40.000, albúmina sérica bovina 1 g/l, pH 9,6. Se cubrió la placa y se incubó 4 horas a 37°C.
- Luego de remover la dilución del anticuerpo conjugado, se lavó 3 veces con *buffer* de lavado y se eliminó completamente el mismo.
- A cada pocillo se agregaron 0,2 ml de una solución de p-nitrofenil fosfato 1 mg/ml en dietanolamine 10 %, pH 9,8 y se incubó durante 30-60 min a temperatura ambiente.
- Se midió la absorbancia a 405 nm.

11.6 Protocolo de inmunización y purificación de anticuerpos.

Se inyectó un lote de tres conejos, en forma intradérmica, con 400 µg de proteína de fusión resuspendidas en adyuvante completo de Freund's, los días 1 y 14. El día 21 se inyectaron 100 µg de proteína resuspendidas en PBS. El día 28 se extrajo sangre de los animales y se precipitaron las inmunoglobulinas del suero mediante el agregado de sulfato de amonio hasta una concentración final del 33 % y se resuspendió luego en *buffer* PBS. Finalmente, las inmunoglobulinas se purificaron por cromatografía de afinidad a través de una columna de proteína-A-Sepharose (Pharmacia).

12 TRANSFORMACION DE TUBERCULOS DE PAPA MEDIANTE *A. TUMEFACIENS*. (Hoekema *et al*, 1989)

12.1 Desinfección del material:

Se utilizaron minitubérculos de papa de la variedad Spunta, obtenidos del Laboratorio de Diagnósticos Vegetales (Mar del Plata) en estado de dormición. Los mismos se lavaron con H₂O de canilla, se pelaron y colocaron en H₂O con detergente comercial al 0,1 % durante aproximadamente 10 min. Luego se sumergieron sucesivamente en alcohol 70 % durante 2 min y en una solución de NaClO al 2 % durante 20 min. A partir de este momento se trabajó en flujo laminar en condiciones de esterilidad. Los minitubérculos se enjuagaron con abundante H₂O estéril y se dejaron sumergidos en la misma durante por lo menos 2 hs.

12.2 Obtención de los discos.

Se prepararon cajas de Petri con 20 ml de medio MS30 (Murashige-Skoog, 1962). Se cortaron las papas con bisturí en discos de 1 cm² y aproximadamente 1 mm de espesor y se colocaron en las cajas. La parte externa del minitubérculo se descartó, de manera tal que el material utilizado provenía de la zona central del minitubérculo, no dañado durante la desinfección.

12.3 Cocultivo.

Se agregaron 20 µl de un cultivo saturado de la cepa LBA4404 salvaje, ó transformada con el plásmido adecuado (pBI-121 ó pBI-PVY) a cada una de las placas. Se homogeneizó y se incubó durante 2 min. Los discos se transfirieron luego a un papel de filtro es-

téril y una vez secos se colocaron en cajas de cultivo conteniendo MS30 sólido suplementado con las hormonas, ácido indolacético (IAA) y zeatina ribósido (ZR) ambas a una concentración final de 5 μ M, las vitaminas myo-inositol (100 mg/l), ácido nicotínico (0.5 mg/l), clorhidrato de piridoxina (0.5 mg/l), clorhidrato de tiamina (0.1 mg/l) y glicina (2.0 mg/l).

Los discos de la placa control se transfirieron a las cajas sin agregado de bacterias, ya que son los destinados a los controles de regeneración y eficacia del agente selectivo.

Las cajas se incubaron a 22 °C , con un fotoperíodo de 16 hs de luz, 8 de oscuridad, durante 48 hs.

12.4 Transferencia a medio selectivo:

Los discos cocultivados con LBA4404(pBI-121), LBA4404(pBI-PVY) y la mitad de las de la placa control (eficacia del agente selectivo) fueron repicados a nuevas cajas conteniendo MS30 sólido suplementado con hormonas y vitaminas, más el agregado de kanamicina (50 mg/l) y Cefotaxime (200 mg/l).

Los discos cocultivados con LBA4404 se incubaron en cajas conteniendo MS30 sólido, hormonas y vitaminas con cefotaxime, sin kanamicina (control del efecto de la cepa y cefotaxime sobre la regeneración).

La otra mitad de los discos control se incubó en cajas conteniendo MS30 sólido suplementado con las hormonas y vitaminas sin kanamicina ni cefotaxime (control de regeneración).

El material se repicó a medio fresco cada tres semanas.

12.5 Repique de los brotes:

Se obtuvieron brotes al cabo de aproximadamente 6 semanas, cuando los mismos alcanzaron una longitud de alrededor de 10 a 20 mm se repicaron a medio MS30 sólido sin hormonas suplementado, con kanamicina 50 mg/l y cefotaxime 200 mg/l. Los brotes enraizaron en este medio y, luego de 2 ó 3 repiques sucesivos en el mismo, las microplantas que continuaron enraizando fueron pasadas a tierra.

12.6 Rusticación:

Las microplantas enraizadas y con por lo menos 3 entrenudos se transfirieron a macetas conteniendo una mezcla de tierra y turba previamente autoclavada y se cultivaron en invernáculo a 24°C con una humedad de 70 % y un fotoperíodo de 16 hs de luz 8 de oscuridad.

13 DETECCION DE MARCADORES

13.1 Ensayo de actividad β -glucuronidasa

(Jefferson *et al* 1987)

La β -glucuronidasa es una hidrolasa que cataliza el clivaje de una gran variedad de β -glucurónidos. Existen sustratos artificiales como el ácido 5-bromo-4-cloro 3-indolil- β -D-glucurónido (X-Glu) que, al ser hidrolisados por la enzima, originan un producto coloreado.

- Se tomó un trozo de tejido de la planta a analizar y se lo colocó en un pocillo de una microplaca de ELISA. Se agregaron 200 μ l de una solución de X-Glu 0,5 mg/ml en $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}_2$ 50 mM, EDTA 10 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, Triton X 100 0,1 %, Sarkosil 0,1 %, pH 7.
- Se incubó luego a 37 °C durante 6-12 hs y se observó la presencia o ausencia de precipitado color azul sobre el tejido. El tiempo de incubación dependió de la permeabilidad del tejido al sustrato. Para aumentar el contraste y para preservar el material se lavó con alcohol 70 %.

13.2 Ensayo de actividad de npt II:

(Mc. Donnell *et al.*, 1987)

La neomicina fosfotransferasa-II es una enzima de origen bacteriano que cataliza la o-fosforilación de antibióticos aminoglicósidos (neomicina, kanamicina y G418). La reacción catalizada por esta enzima involucra la transferencia del grupo fosfato del ATP al antibiótico. La molécula así fosforilada es incapaz de unirse al ribosoma e interferir con la síntesis de proteínas. Utilizando $\text{ATP}[\text{P}^{32}]$ es posible detectar la actividad de la enzima por la incorporación de radioactividad al antibiótico.

- Se trató una membrana de fosfocelulosa (PB1 Wahtmann) con una solución de ATP 30 mM y pirofosfato de sodio 50 mM, durante 10 min con agitación y luego se la dejó secar a temperatura ambiente.
- Se homogenizaron aproximadamente 50 mg de hojas en presencia de 50 μ l de *buffer* de extracción (glicerol 20 %, Tris-HCl 125 mM pH 6,8, β -mercaptoetanol 10%, SDS 0,2 %), utilizando un tubo Eppendorf y un vástago de plástico descartable.

Materiales y Métodos

- Se centrifugó durante 10 min a 10.000 xg y 4 °C , se tomaron 15 µl del sobrenadante y se agregaron a 15 µl de una solución conteniendo Tris-HCl 65 mM, MgCl₂ 40 mM, NH₄Cl 0,4 M (titulado a pH 7.1 con ácido maleico 1M), ATP 0,05 mM, [³²P] ATP 100 µCi/ml, Neomicina 175 µg/ml y NaF 50 mM.
- Se incubó durante 1 h a 37 °C y se centrifugó durante 5 min a 12.000 xg. Se sembraron 20 µl del sobrenadante sobre la membrana de fosfocelulosa.
- Luego de secar las muestras la membrana se lavó con *buffer* fosfato 10 mM, pH 7,4, previamente calentado a 80 °C, durante 10 min con agitación suave a temperatura ambiente. Este lavado se repitió 4 veces.
- Finalmente se realizaron autorradiografías en placas Kodak X-OMAT por exposición durante 24 hs.

Resultados y Discusión

1 CLONADO MOLECULAR DEL GENOMA DEL PVY

Purificación de partículas virales de PVY

El virus fue inoculado en plantas jóvenes de *Nicotiana occidentalis*. Al cabo de 3 a 5 semanas se cosecharon las hojas infectadas que se utilizaron como fuente de virus. Estas hojas se sometieron al proceso de purificación descrito por Gugerli (1978), el cual se detalla en Materiales y Métodos. Este proceso fue controlado por microscopía electrónica para verificar el rendimiento y estimar el grado de purificación de las partículas virales obtenidas. Durante la purificación se produjeron pérdidas en los pasos de resuspensión del virus, probablemente por agregación de las partículas. A pesar de éstas pérdidas, la cantidad obtenida (5 µg de gRNA a partir de 100 g de hojas) fue suficiente para construir una genoteca de cDNA. En la Figura 1.1. se observa la microscopía electrónica de las partículas virales obtenidas luego del último paso de purificación. Las mismas presentan la morfología típica de los potyvirus (bastones flexuosos) y se encuentran libres de contaminaciones por organelas o fracciones subcelulares de la planta.

Purificación del gRNA viral

El virus fue tratado con complejo de vanadilo ribonucleósido y el gRNA se obtuvo por desnaturalización de las partículas virales purificadas con fenol caliente y precipitación con acetato de sodio y etanol. En la Figura 1.2. se observa una electroforesis en gel desnaturalizante (agarosa-formaldehído), del gRNA obtenido. Como referencia de peso molecular se utilizó gRNA de PVX cuyo genoma consta de 6.432 bases.

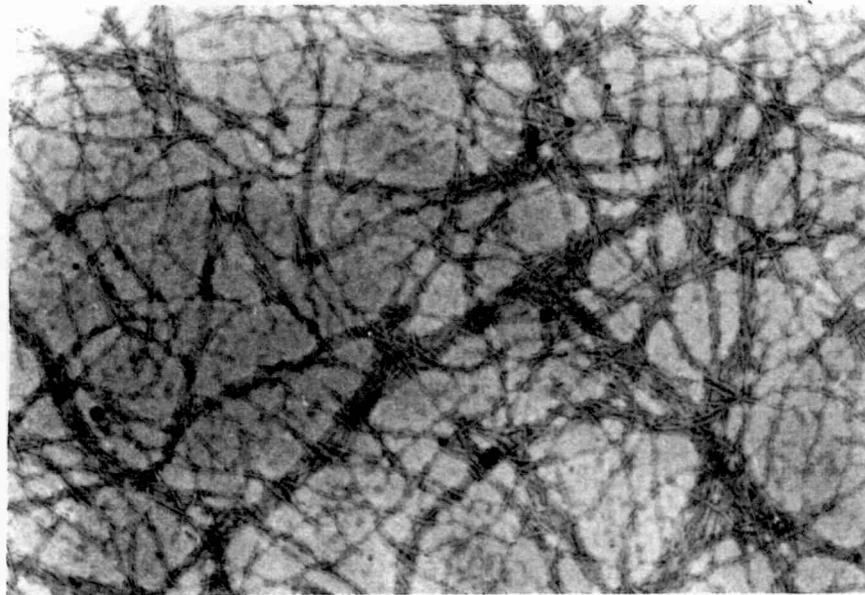


Figura 1.1. Microscopía electrónica de partículas de PVY obtenidas luego del último paso del protocolo de purificación.

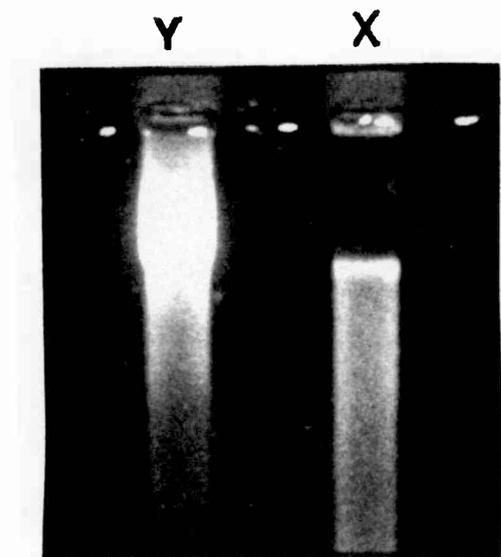


Figura 1.2. Análisis del gRNA obtenido.
Electroforesis en gel desnaturizante (agarosa-formaldehído, 1%) del RNA purificado a partir de los viriones. Como control se utilizó RNA de PVX.

Síntesis de cDNA viral

El cDNA viral se obtuvo de acuerdo con el método de Gubler y Hoffman (1983) utilizando la transcriptasa reversa del virus de la amieloblastosis aviaria y oligodeoxitimidina como iniciador de la síntesis de la primera cadena. Una alícuota de la mezcla de reacción fue analizada en un gel alcalino de agarosa. Luego de realizar la electroforesis y de secar el gel, se obtuvo la autoradiografía que se muestra en la Figura 1.3. En el mismo gel se analizó una alícuota de la reacción control, en la que se utilizó mRNA de globina como molde. El híbrido RNA-DNA obtenido fue digerido parcialmente por acción de ribonucleasa H y la segunda cadena se sintetizó utilizando la DNA polimerasa I. Las discontinuidades en la hebra de DNA se ligaron por acción de la DNA ligasa del fago T4.

Clonado de los cDNAs en el vector λ gt11

El cDNA fue metilado para evitar la acción de la enzima *EcoRI* sobre los sitios presentes en el cDNA. A continuación, se ligaron a sus extremos *linkers EcoRI*, se digirió con *EcoRI*, se fraccionó por tamaño utilizando una columna de Sepharose CL4B y se reunieron las fracciones que contenían fragmentos mayores que 500 pb (Figura 1.4. A y B). Estas fracciones se ligaron a los brazos del vector λ gt11, previamente digeridos con *EcoRI*. Luego del empaquetamiento *in vitro*, se obtuvo una biblioteca de $2 \cdot 10^4$ fagos de los cuales aproximadamente $1,8 \cdot 10^4$ resultaron recombinantes. La biblioteca fue amplificada y el título final de la misma fue de $3 \cdot 10^7$ u.f.p.

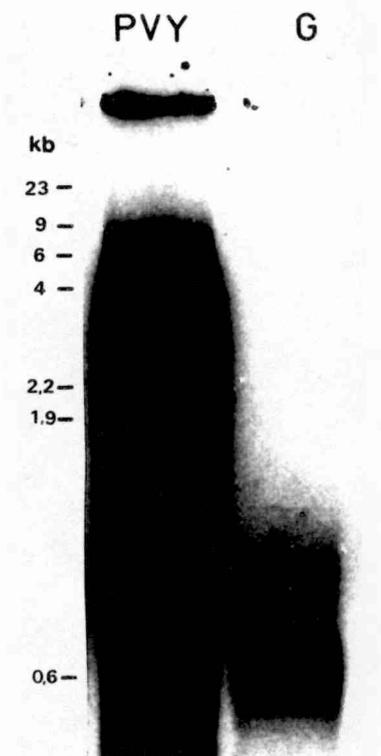
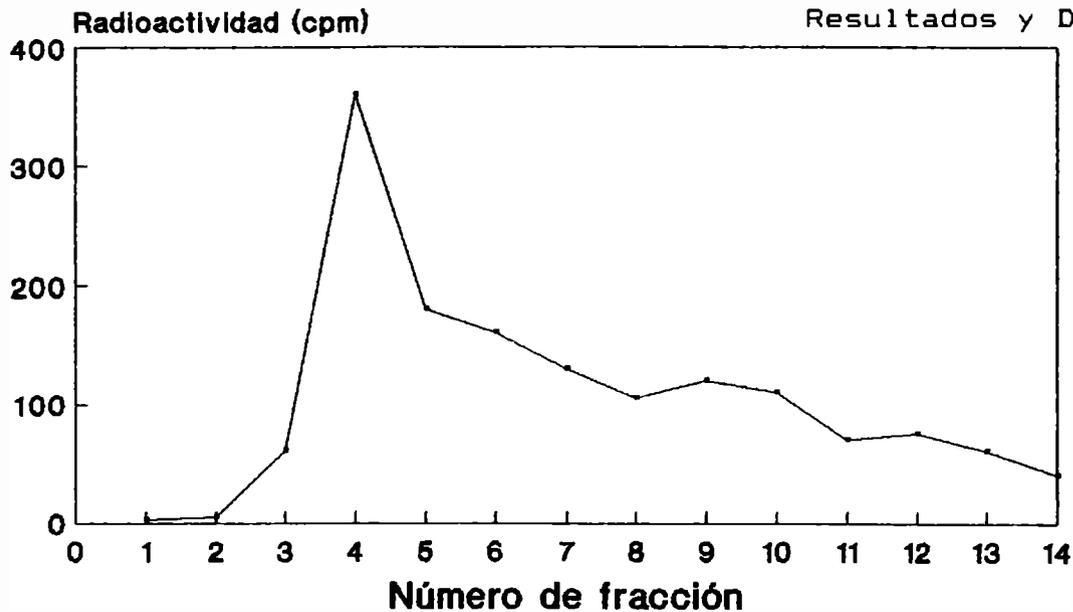


Figura 1.3. Autorradiograma de la primera cadena de cDNA. Luego de la reacción de síntesis de la primera cadena se tomó una alícuota y se analizó en un gel de agarosa, 1 % en *buffer* alcalino. En el mismo gel se analizó una alícuota de la reacción control, en la que se utilizó mRNA de globina como molde (G). Marcador de peso molecular: DNA de fago λ digerido con la enzima *Hind*III.



4 6 8

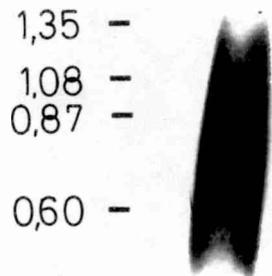


Figura 1.4. Fraccionamiento del cDNA por tamaño.

A: Perfil de elución del fraccionamiento de los cDNAs utilizando una columna de *Sepharose* CL4B.

B: Análisis de algunas de las fracciones obtenidas en un gel de agarosa 1 %. Como marcador de peso molecular se utilizó DNA del fago ϕ X174 cortado con la enzima *Hae*III.

Rastreo inmunológico de la biblioteca

Utilizando anticuerpos policlonales anti-PVY se rastreó la biblioteca y se detectaron tres fagos que dieron una clara señal positiva (gY8, gY9 y gY10). Los mismos fueron purificados a través de tres rastreos inmunológicos sucesivos. En la Figura 1.5.A. se muestra el resultado del primer rastreo inmunológico, donde se detectaron los fagos gY8 y gY9, y en la Figura 1.5.B., el del tercer rastreo, realizado para purificar el clon gY8, en el que todos los fagos dieron una clara señal positiva. El hecho de utilizar anticuerpos para el rastreo de la genoteca permitió obtener directamente los clones de interés, es decir aquellos que contenían secuencias de la proteína de cubierta.

Caracterización de los clones conteniendo secuencias de la proteína de cubierta

Para determinar el tamaño de los insertos contenidos en los fagos gY8, gY9, y gY10, se realizaron minipreparaciones de DNA de los mismos y se digirieron alícuotas de cada una de ellas con endonucleasa *EcoRI*. Los productos de las digestiones se analizaron en geles de agarosa de 0,8 %. Como estándar de peso molecular se utilizó DNA de fago λ digerido con la enzima *BstEII*. En la Figura 1.6.A. se muestra el resultado de este análisis. Los tamaños de los insertos obtenidos fueron de aproximadamente 1200, 1000 y 700 pb respectivamente. Por ese entonces, el laboratorio tuvo acceso a un clon de la cepa "n" de PVY, cedido por el laboratorio de Biología Molecular del INRA-Versailles (Francia), conteniendo parte de las secuencias que codifican la replicasa viral y la proteína de la cápside. Utilizando este clon como sonda radioactiva se confirmó la identidad de los clones aislados mediante la técnica de Southern. La Figura 1.6.B. muestra el resultado de la hibridación, donde se puede observar que los tres clones dieron una clara señal positiva.

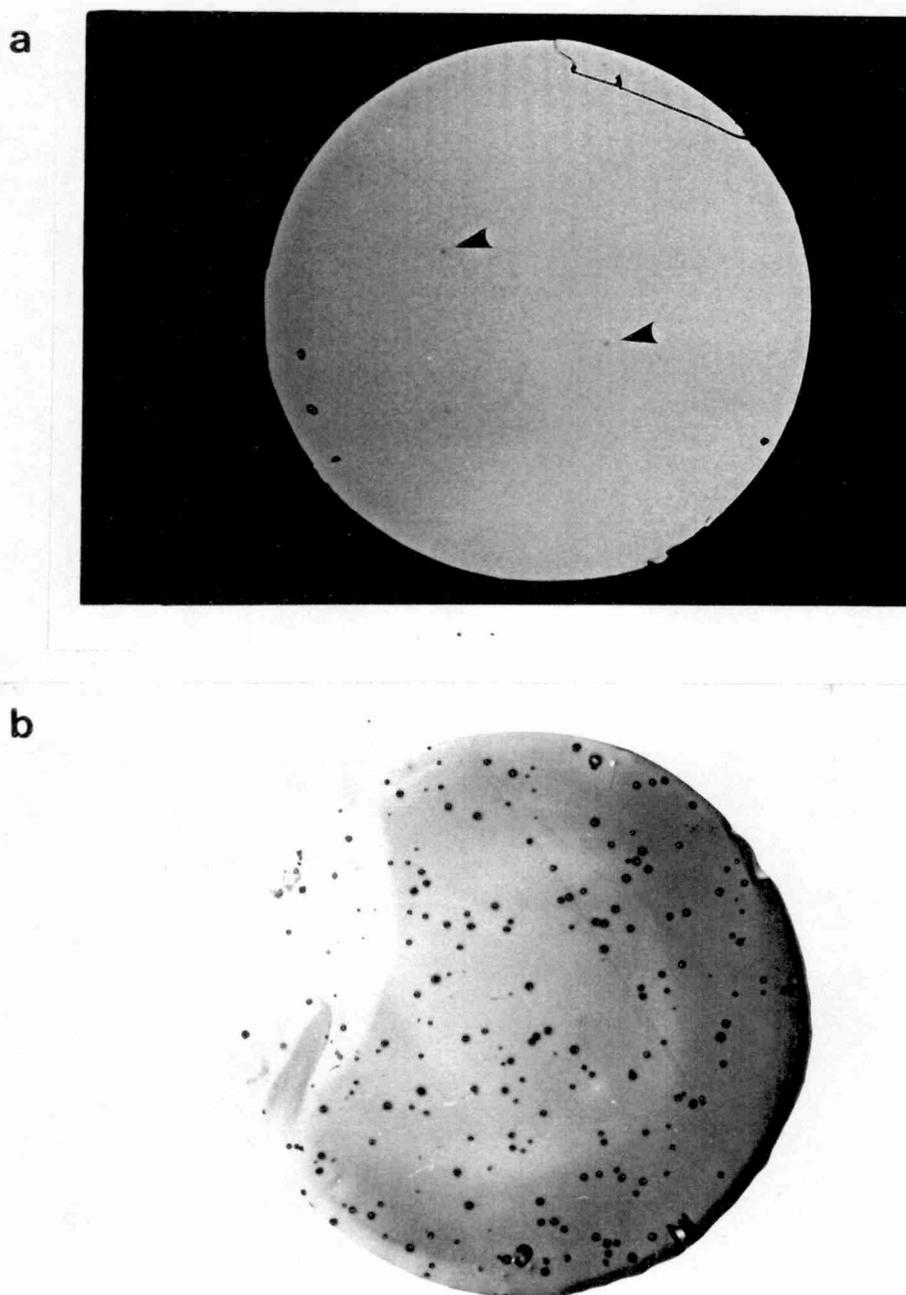


Figura 1.5. Rastreo inmunológico de la biblioteca.

A: primer rastreo inmunológico, donde se detectaron los fagos gY8 y gY9, los que se señalan con flechas.

B: tercer rastreo realizado para purificar el clon gY8.

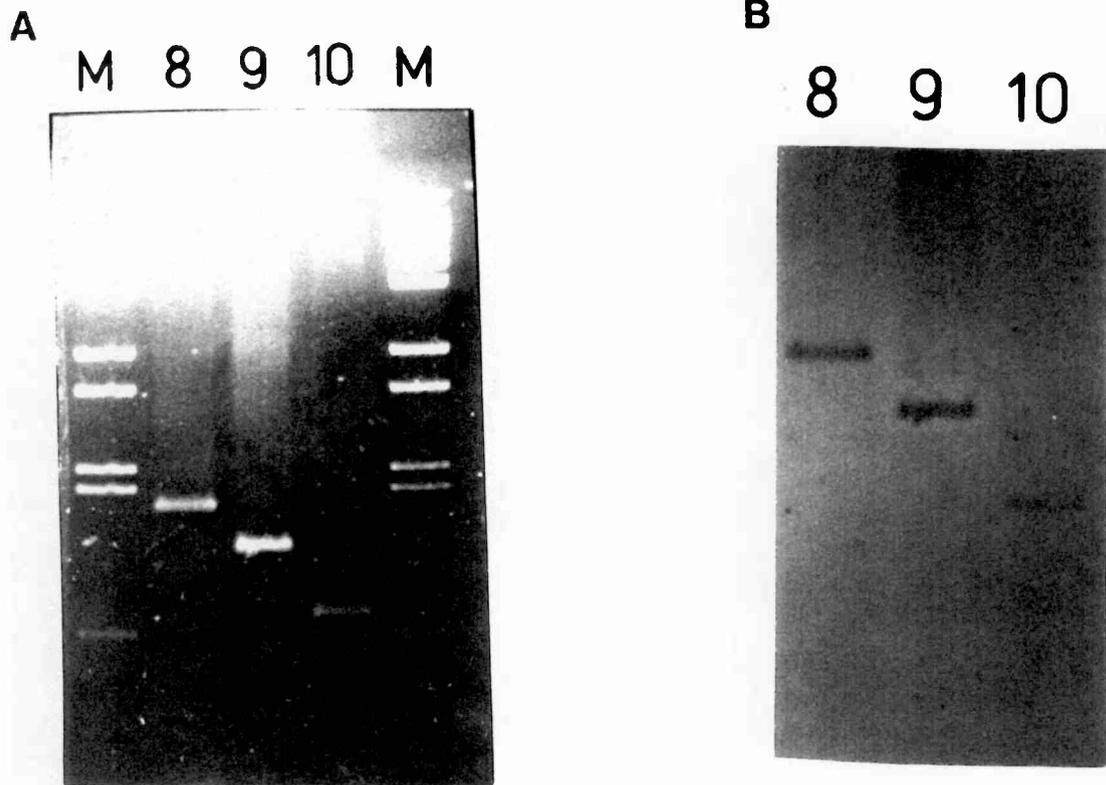


Figura 1.6. Análisis de los clones obtenidos.

A: Determinación del tamaño de los insertos clonados. Se digirió DNA de los clones con la enzima *EcoRI* y el producto de la reacción se analizó en un gel de agarosa 1 %. M: DNA de fago λ digerido con la enzima *BstEII*.

B: Análisis de Southern-blot realizado sobre el gel anterior.

Determinación de la secuencia nucleotídica de los clones recombinantes

Con el fin de determinar las secuencias nucleotídicas de los clones, se procedió a subclonar los insertos correspondientes en el sitio *EcoRI* del fagósmido Bluescript (pBSSK+). Se obtuvieron así los clones pBSY8, pBSY9 y pBSY10, los que fueron secuenciados por la técnica de Sanger sobre DNA de cadena simple. La secuencia parcial de los clones pBSY8 y pBSY10 mostró que ambos contenían el tracto de poliadenosinas correspondiente al RNA genómico viral. Con este dato, y conociendo el tamaño del clon pBSY8, se dedujo que el mismo contendría el gen completo de la proteína de cubierta y el extremo 3' no codificante del genoma. Con el objeto de secuenciar completamente el clon pBSY8, se procedió a realizar deleciones unidireccionales parcialmente superpuestas, utilizando una combinación de exonucleasa III y nucleasa S1. Para ello, el plásmido, purificado a través de un gradiente de $CsCl_2$, se digirió con las enzimas *KpnI* y *HindIII*, las que reconocen sitios en el "*polylinker*" del vector pBSSK+. La primera genera un extremo 3' protruyente sobre el que la exonucleasa III no puede actuar, mientras que el corte con la segunda genera un extremo 5' protruyente que es susceptible a la acción de exonucleasa III. Con el fin de lograr deleciones de distinto grado, el tratamiento con la exonucleasa se efectuó por distintos períodos de tiempo (3, 6 y 9 min). La reacción se detuvo tomando alícuotas de la mezcla de reacción a los tiempos indicados y desnaturalizando la enzima por calor. Las regiones de simple cadena remanentes que resultaron del tratamiento anterior se degradaron por acción de la nucleasa S1. En la Figura 1.7. se muestran las deleciones obtenidas, analizadas en un gel de agarosa de 1%. Las tres mezclas de reacción fueron tratadas con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I, con el fin de rellenar los extremos y permitir la recircularización de los DNA plasmídicos por la DNA ligasa del fago T4. Este DNA se utilizó para transformar células NM522.

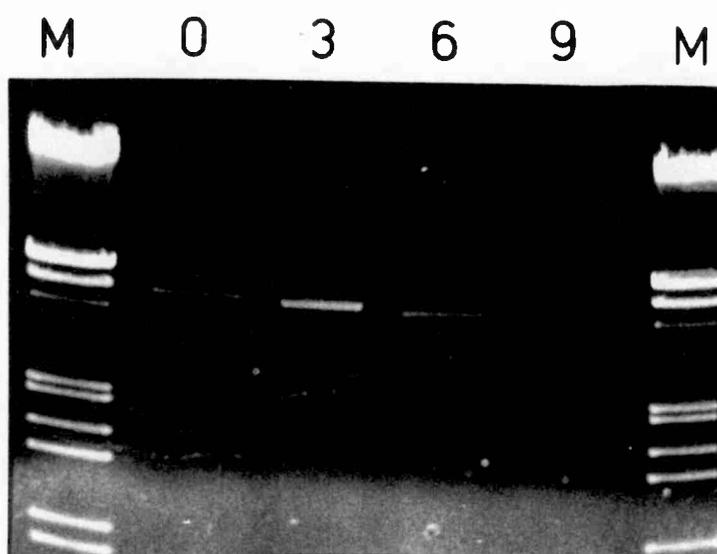


Figura 1.7. Análisis de las deleciones obtenidas.
Deleciones obtenidas a partir del clon pBSY8 analizadas en un gel de agarosa 1%. M: DNA de fago λ digerido con la enzima *Bst*EII. 0, 3, 6 y 9 indican los minutos de incubación con la exonucleasa III.

Resultados y Discusión

Luego de analizar los subclones por mapeo de restricción, se eligieron los de tamaño más adecuado para la preparación de DNA de simple cadena y se determinó su secuencia nucleotídica por la técnica de Sanger. Los datos obtenidos se confirmaron por secuenciación parcial del clon pBSY10, de la cadena complementaria en la región 5' de pBSY8 y por secuenciación total de pBSY9 utilizando una estrategia de obtención de subclones similar a la descrita anteriormente. En la Figura 1.8. se muestra un esquema de la estrategia de secuenciación y de los clones y subclones utilizados.

La secuencia obtenida se muestra en la Figura 1.9. La misma comprende 1182 nucleótidos río arriba del extremo poliadenilado del genoma de PVY y contiene parte de la replicasa viral, la proteína de cubierta completa, la región 3' no codificante y una secuencia de poliadenosinas de 13 bases. La comparación de las secuencias nucleotídicas de PVYⁿ con las correspondientes a PVYⁿ reveló una homología del 92 % y, al comparar las secuencias aminoácídicas deducidas de las correspondientes secuencias nucleotídicas, se encontró una homología de 94 %, lo que está dentro del nivel de homología hallado por Shukla (Shukla y Ward, 1988) entre distintas cepas de un mismo potyvirus. En la Figura 1.10. se muestra una comparación con las secuencias aminoácídicas correspondientes a PVYⁿ, PeSMV, TEV y TVMV. Se pueden observar varias secuencias fuertemente conservadas, en particular el motivo DAG, entre los aminoácidos 6-8, el que está presente en los potyvirus transmisibles por áfidos (PVY y TVMV) y ausente en los no transmisibles (PeMV y TEV). También se destacan los motivos WCIENGTSP, entre los aminoácidos 120-128, y RAREAXXQMKA, entre 214-224, los que se encuentran en la región "core" de todos los potyvirus secuenciados hasta aquí. Las variaciones entre las secuencias se concentran en la región amino terminal de las proteínas de cubierta, la que, según Shukla, estaría orientada hacia el exterior.

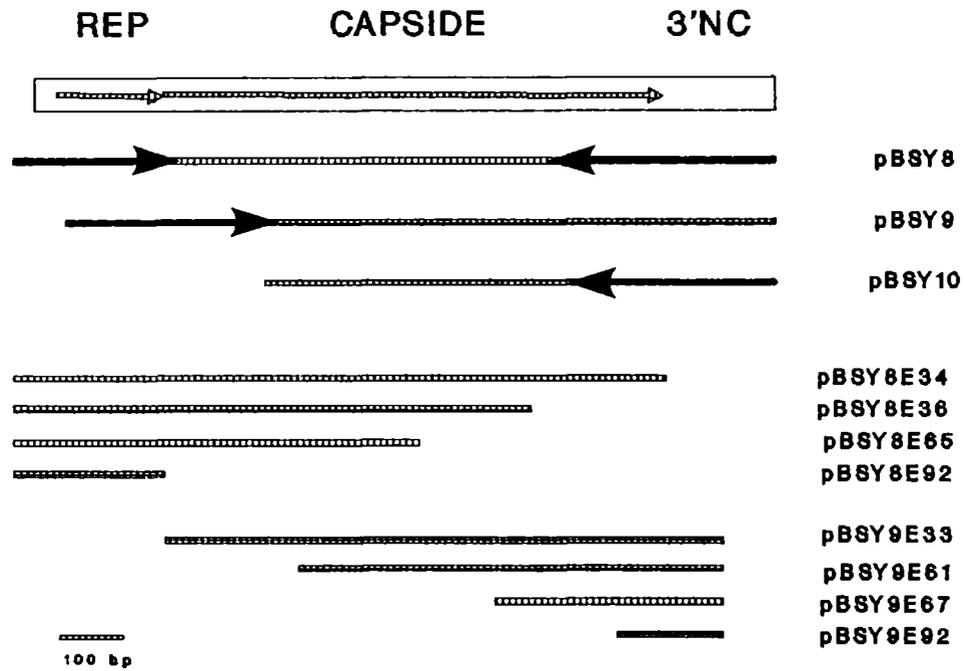


Figura 1.8. Estrategia de secuenciación.
 Representación esquemática de la región 3' de PVY. Las flechas sobre los clones indican el sentido y el alcance de la secuencia determinada sobre cada uno de ellos. Las series pBSY8E y pBSY9E representan los subclones obtenidos mediante delección.

Resultados y Discusión

GTCGCATTAGATGATGAGTTTGGAGTTCGACTCTTATGAGGTGCACCATCAAGCAAATGAT	60
V A L D D E F E F D S Y <u>E V Q H E / A</u> N D	
ACAATTGATGCAGGAGGAAACAACAAGAAAGATGCAAAACCAGAGCAAAGCAGCATACAG	120
T I D A G G N N K K D A K P E Q S S I Q	
TCAAACCTGAGTAAGGGAAAAGATAAAGATGTGAATGTTGGCACATCTGGGACACATACT	180
S N L S K G K D K D V N V G T S G T H T	
GTGCCGAGAATCAAGGCTATCACGTCCAAATGAGAATGCCAGAAGCAAGGGAGTAGCC	240
V P R I K A I T S K M R M P R S K G V A	
GCGCTCAACTTAGAACACTTGCTCGAGTATGCTCCACAACAAATTGACATCTCAAATACT	300
A L N L E H L L E Y A P Q Q I D I S N T	
CGGGCAACTCAATCACAGTTTGATACGTGGTATGAGGCGGTGCGGATGGCATAACGACATA	360
R A T Q S Q F D T W Y E A V R M A Y D I	
GGACAACTGAGATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGA	420
G Q T E M P T V M N G L M V W C I E N G	
ACCTCGCCAAATATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGAATGAACAAGTTGAATAC	480
T S P N I N G V W V M M D G N E Q V E Y	
CCGTTGAAACCAATTGTTGAGAATGCAAAACCAACCCTTAGGCAAATCATGGCACATTTTC	540
P L K P I V E N A K P T L R Q I M A H F	
TCAGATGTTGCAGAAGCGTACATAGAAATGCGCAACAAGGAAGGAAACCATATATGCCACGA	600
S D V A E A Y I E M R N K K E P Y M P R	
TATGGTTTAATTGAAATCTGCGGGATATAAGTCTAGCGCGCTATGCCTTTGACTTTTAT	660
Y G L I R N L R D I S L A R Y A F D F Y	
GAAGTCACATCACGAACACCGGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATCCAATGAAGGCCGCA	720
E V T S R T P V R A R E A H I Q M K A A	
GCATTGAAATCAGCTCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGATGGTGGCATCAGTACACAAGAG	780
A L K S A Q P R L F G L D G G I S T Q E	
GAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTTTCTCCAAGTATGCATACTCTGCTTGGAA	840
E N T E R H T T E D V S P S M H T L L G	
GGCAAAAACATG <u>TGAT</u> GATGATGTCTCTCCGGACGATATATAAGTATTTACGTATGCAGTAA	900
G K N M	
GATTTTGGCTTTTCTGTACTACTTTTATCATAATTAATAATCAGTTTGAATATTACTAA	960
TAGATAGAGGTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTACTCTATCTGTTAATCCGCATTA	1020
TTAAGTTTTAGGTAATAATGGCGGGTTGTCGTTGTTGGATGATTCATCGATTAGGTGATG	1080
CTGCGATTTTCGTCGTAGCAGTGACTATGTCTGGATCTATCTGCTTGGGTGATGTTGTGATT	1140
TCGTCATAACAGTGACTGTATACTTTCTAATCAGGAGATAC	1182

Figura 1.9. Secuencia nucleotídica de la región 3' de PVYo.

La traducción en aminoácidos se muestra debajo de la secuencia nucleotídica. La secuencia aminoácídica que reconoce la proteasa N1a, ha sido subrayada y el sitio de clivaje se muestra con una barra. El motivo DAG, necesario para la transmisión por áfidos, se ha resaltado y el codón de terminación de la poliproteína se muestra subrayado.

Resultados y Discusión

PVY ^o	ANDTIDAGGNKKDAKPEQSSIQSNLSKG--KDKDVNVGTS [↓] SGTHTVPRIKAITSKMRMPR	60
PVY ⁿ	ANDTIDAGGSNKKDAKPEQSSIQPNPNKG--KDKDVNAGTS [↓] SGTHTVPRIKAITSKMRMPR	
PeSMV	ADTTVDAEKEKEKASSGKLLKVEGSSSDVKATDKDVNAGTIGTHTIPRIKAITGKMRLPK	
TVMV	S [↓] DTVDAGKDKARDQKLADKPTLAIDRT---KDKDVNTGTS [↓] SGTFSIPRLKKAAMNMKLPK	
TEV	GGTVDASAD-VGKKKDKQKDDKVAEQAS---KDRDVNAGTS [↓] SGTFSVPRINAMATKLQYPR	
PVY ^o	SKGVAALNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVRMAYDIGQTEMPTVMNGLMVW	120
PVY ⁿ	SKGATVLNLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVRMAYDIGETEMPTVMNGLMVW	
PeSMV	SKGKTALNLDHLLLEYEPQQIDISNTRATQSQFDTWFKAVQTAYDITEDEMPTVMNGLMVW	
TVMV	VGGSSVVNLDHLLTYKPAQEFVVNTRATHSQFKAWHTNVMAELELN [↓] EEQMKIVLNGFMIW	
TEV	MKGEVVVNLNHL [↓] LGYPQQIDLSNARATHEQFAAWHQAVMTAYGVNEEQMKILLNGFMVW	
PVY ^o	CIENGTSPNINGVWVMMDGNEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKE	180
PVY ⁿ	CIENGTSPNVNGVWVMMDGNEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKE	
PeSMV	CIENGTSPNINGVWVMMDGEEQIEYPLKPIVENAKPTFRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKE	
TVMV	CIENGTSPNISGVWTMMDGDEQVEYPIEPMVKHANPSLRQIMKHFSNLAEAYIRMRNSEQ	
TEV	<u>CIENGTSPNLNGTWVMMDGEEQVSYP</u> LKPMIENAGPTLRQIMTHFSDLAEAYIEMRN [↓] RER	
PVY ^o	PYMPRYGLIRNLRDISLARYAFDFYEVTSRTPVRAREAHIQMKAALKSAQPRLFGLDGG	240
PVY ⁿ	PYMPRYGLIRNLRDMGLARYAFDFYEVTSRTPVRAREAHIQMKAALKSAQPRLFGLDGG	
PeSMV	PYMPRYGLIRNLRDVSLARYAFDFYEITSRTPSRAREAHIQMKAALKSVQTRMFGLDGG	
TVMV	VYIPRYGLQRGLVDRNLAPFAFDFFEVNGATPVRAREAHAQMKA [↓] GRTPQFAAMFCLDGS	
TEV	PYMPRYGLQRNITDMSLSRYAFDFYELTSKTPVRAREAHMQMKA [↓] AAVRNSGTRLFGLDGN	
PVY ^o	ISTQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGGK [↓] NM	269
PVY ⁿ	ISTQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVK [↓] NM	
PeSMV	ISTQEENTERHTTEDVSPHMHTLLGVR [↓] NT	
TVMV	VSGQEENTERHTVDDVNAQMHHLLGVK [↓] GV	
TEV	VGTA [↓] EEDTERHTAHDVNRNMHTLLGVR [↓] Q	

Figura 1.10. Comparación de las secuencias aminoacídicas correspondientes a las cápsides de PVY^o, PVYⁿ, PeSMV, TEV y TVMV. Los aminoácidos conservados en los cinco virus han sido subrayados. Las secuencias contenidas entre las flechas corresponden a la región central de las proteínas que resulta de la acción de tripsina en condiciones controladas.

2 DESARROLLO DE UN METODO DE DIAGNOSTICO POR HIBRIDACION MOLECULAR PARA EL VIRUS PVY

La hibridación molecular es un área del diagnóstico relativamente reciente. La misma ha permitido el diseño de procedimientos para la detección de virus vegetales, en los que la especificidad está dada por la complementaridad entre las secuencias del genoma del patógeno y de la sonda utilizada. Una limitación en la extensión de ésta técnica a la práctica de rutina es el uso de radioactividad. Con el propósito de remontar esta dificultad se desarrollaron dos estrategias de diagnóstico, en las que se utilizaron sondas marcadas en forma no radioactiva:

En la primera, basada en la hibridación molecular clásica (hibridación directa), se utilizó el clon pBSY8 marcado con análogos de bases biotinilados o por incorporación de grupos sulfónicos al DNA por modificación química.

En la otra (hibridación indirecta) el DNA de simple cadena obtenido de pBSY8 no marcado, se utilizó en una primera etapa de hibridación, y el DNA de doble cadena del plásmido Bluescript (pBSSK-), marcado con biotina mediante la técnica de *nick-translation*, fue utilizado en una segunda etapa de hibridación.

Estos resultados fueron parte de un trabajo realizado en colaboración con el Instituto de Biología Molecular del INTA-Castelar, mediante el cual se desarrolló un sistema de diagnóstico para la detección simultánea de cuatro patógenos comunes en plantas de papa (Hopp *et al.*, 1988 y 1991)

Como estándares positivos se utilizaron partículas virales purificadas o extractos de plantas infectadas con PVY. Como controles negativos se utilizaron extractos obtenidos a partir de plantas sanas e infectadas con virus pertenecientes a otros grupos.



Preparación de las muestras

Con el fin de desarrollar un protocolo sencillo que permitiese procesar rápidamente un gran número de muestras y mantener la integridad del RNA durante el ensayo de detección, se probaron diferentes métodos, la mayoría basados en la extracción con solventes orgánicos y en una precipitación posterior de los ácidos nucleicos.

Finalmente, se adoptó el siguiente esquema: una pequeña cantidad de tejido vegetal (0,2 g) se homogeneizó en tubos Eppendorf en presencia de un *buffer* que contenía una alta concentración de isotiocianato de guanidina, el que actuó como agente desnaturalizante e inhibidor de las ribonucleasas presentes en la muestra. El RNA total se purificó mediante dos métodos alternativos: a) cromatografía de intercambio aniónico utilizando microcolumnas comerciales de intercambio (Quiagen) o, b) extracción fenólica y precipitación de los ácidos nucleicos presentes en el extracto.

Especificidad de la sonda molecular.

Para estudiar la especificidad de la sonda, se realizaron experimentos utilizando extractos de plantas sanas e infectadas con diferentes virus (PVX, PVY, PLRV). Los resultados, que se muestran en la Figura 2.1. A y B, permiten concluir que, independientemente de la técnica utilizada (directa o indirecta), la sonda es capaz de detectar específicamente al virus en plantas infectadas con PVY, y no reacciona con extractos controles obtenidos a partir de hojas sanas o infectadas con virus pertenecientes a otros grupos. La sonda es específica para este virus, pero no es específica de cepa, ya que tanto PVY^o como PVYⁿ son reconocidos por la misma (Figura 2.1.B). Este resultado era esperable

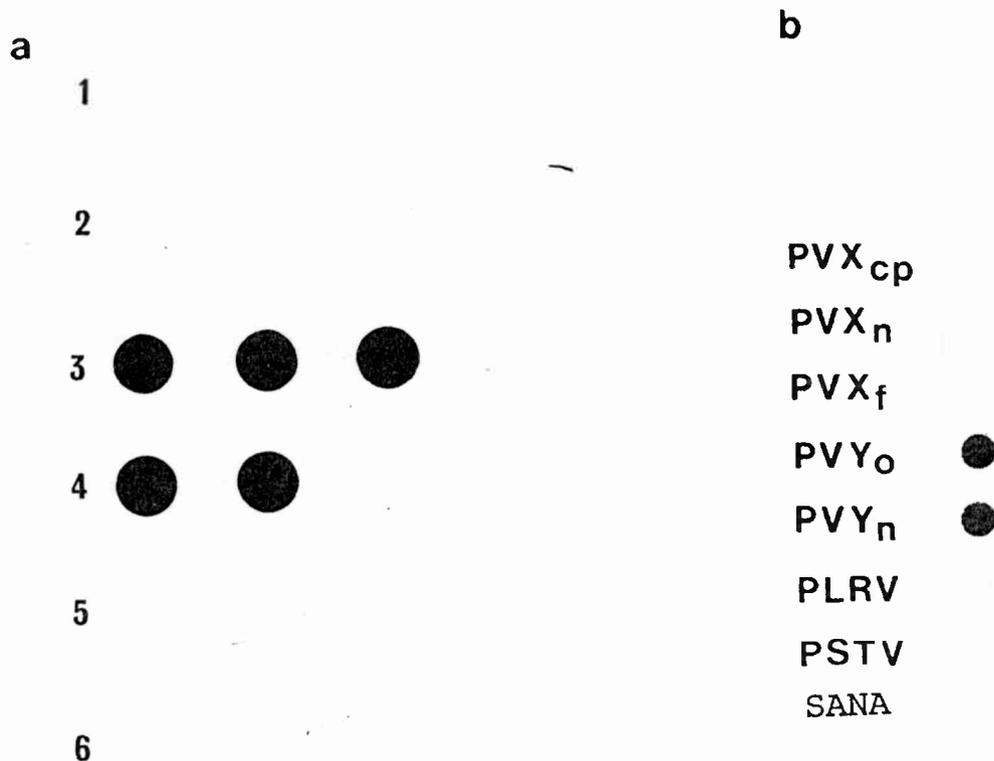


Figura 2.1. Especificidad de la sonda.

A: Hibridación directa.

Diluciones seriadas (1/5) de extractos de plantas sanas e infectadas con PVX, PVY y PLRV se aplicaron sobre una membrana de nitrocelulosa. La presencia del PVY se detectó utilizando la sonda marcada con biotina.

1) Extracto de tubérculo de papa sano. 2) Extracto de hojas de tabaco infectadas con PVX. 3) Extracto de hojas de tabaco infectada con PVY. 4) Extracto de tubérculo de papa infectado con PVX y PVY 5) Extracto de hojas infectadas con PLRV. 6) Extracto de hojas de tabaco sanas.

B: Hibridación indirecta.

Extractos de RNA de plantas sanas e infectadas con PVX ("cp", "normal" y "fuerte"), PVY ("n" y "o"), PLRV y PSTV se aplicaron sobre una membrana de nylon. En el primer paso de hibridación se utilizó DNA de simple cadena de pBSY8 no marcado, y en el segundo DNA de doble cadena del plásmido Bluescript (pBSSK-), marcado con biotina mediante la técnica de *nick-translation*.

debido a la alta homología (92%), existente entre las secuencias nucleótídicas de ambas cepas .

Sensibilidad de la detección: hibridación directa

La sensibilidad de la detección mediante hibridación directa se analizó utilizando diluciones seriadas de RNA de PVY y la sonda pBSY8 marcada con biotina o mediante incorporación de grupos sulfónicos. Las muestras fueron aplicadas en *dot-blots* por medio de un equipo de filtración múltiple. En la Figura 2.2. se puede observar que ambas sondas tienen una sensibilidad similar, pudiendo detectarse hasta aproximadamente 300 pg de RNA lo que corresponde a 5 ng de virus.

Sensibilidad de la detección: hibridación indirecta

La sensibilidad de la hibridación indirecta se ensayó sobre diluciones seriadas de RNA de PVY que se aplicaron a la membrana de nitrocelulosa empleando un equipo de filtración del tipo *slot-blot*. En el primer paso de hibridación se utilizó una mezcla de sondas no marcadas capaces de detectar los virus PVX, PVY, PSTV y PLRV (DNA de cadena simple) y en el segundo paso de hibridación DNA de cadena doble del plásmido pBSSK(-) marcado con biotina-14-dATP. En la Figura 2.3. se observa que la técnica indirecta permite detectar alrededor de 3 pg de RNA, lo que correspondería a 0.05 ng de proteína de cubierta. Esta sensibilidad es dos órdenes de magnitud mayor que la obtenida con la hibridación directa y con la técnica clásica de ELISA (5 ng).

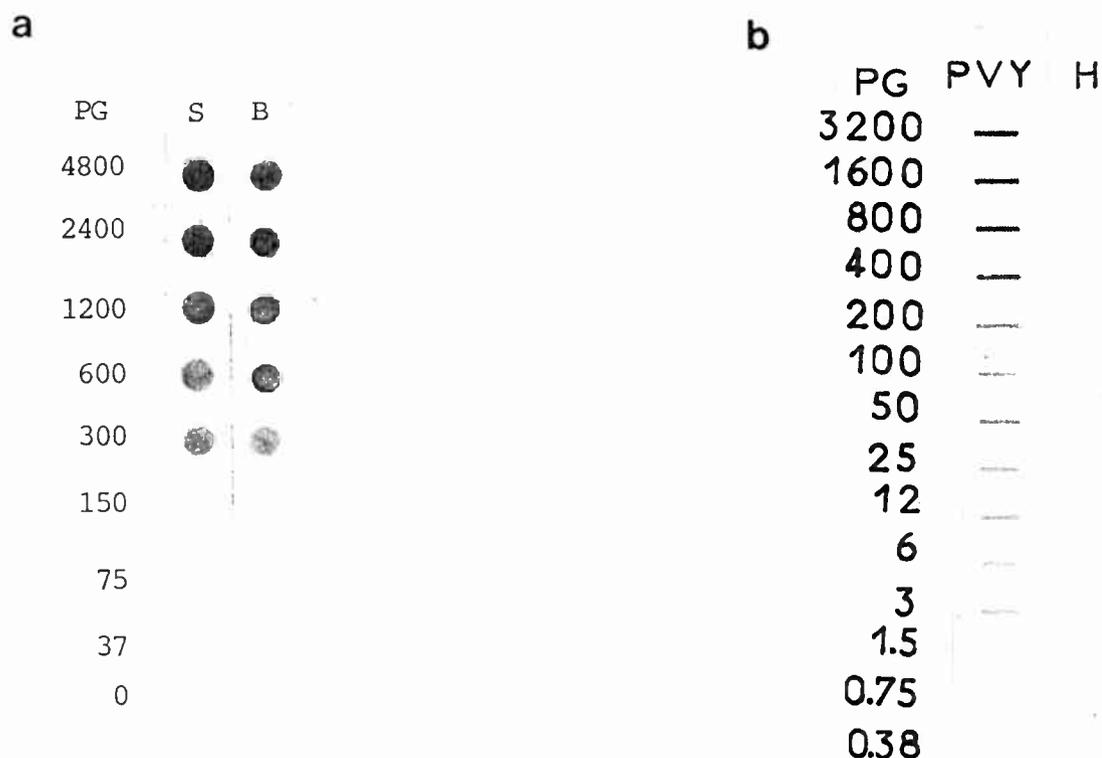


Figura 2.2. Sensibilidad de la sonda

A: hibridación directa.

Diluciones seriadas de RNA de PVY se aplicaron a una membrana de nitrocelulosa. En la hibridación se utilizó la sonda pBSY8 marcada con biotina o mediante incorporación de grupos sulfónicos. B: sonda biotinilada. S: sonda sulfonada. Los números indican cantidad de RNA en pg.

B: hibridación indirecta.

La sensibilidad de la hibridación indirecta se ensayó sobre diluciones seriadas de RNA de PVY, aplicadas a una membrana de nitrocelulosa. En la hibridación se utilizó una mezcla de sondas no marcadas capaces de detectar los virus PVX, PVY, PSTV y PLRV (DNA de cadena simple) y en el segundo DNA de doble cadena del plásmido Bluescript (pBSSK-), marcado con biotina mediante la técnica de *nick-translation*.

Detección de PVY en muestras de papa provenientes del campo

El ensayo se realizó sobre muestras de tubérculos de papa obtenidos del Mercado Central de la ciudad de Buenos Aires. Se tomaron muestras de los cultivares más utilizados en el país (Ballenera, Spunta, Huinkul MAG, Serrana INTA y Kennebec). Luego de inducir la brotación, se detectó la presencia de PVY mediante hibridación indirecta, como se indicó antes. Las mismas muestras fueron analizadas mediante la técnica de ELISA. En la Figura 2.3. se muestra el análisis de 60 muestras individuales mediante un ensayo de hibridación en *dot-blot*. La comparación de estos resultados con los obtenidos utilizando la técnica de ELISA mostró un 93 % de concordancia.

Discusión

Para su utilización en diagnóstico de rutina es importante que una sonda específica para un determinado virus sea capaz de detectar distintas cepas del mismo. La utilización de un clon de cápside del virus PVY como sonda permitió detectar indistintamente las cepas "n" y "o", no observándose hibridación cruzada con otros virus comunes en cultivos de papa de nuestro país. Es necesario también contar con un método de preparación de las muestras, que sea rápido y preserve la integridad de la misma hasta su posterior análisis. La disponibilidad de resinas de intercambio aniónico adecuadas permitió purificar ácidos nucleicos en presencia de agentes caotrópicos protegiéndolos de la acción de las nucleasas presentes en la muestra. Ello permitió el desarrollo de un protocolo de preparación de muestras que, si bien introduce algunos pasos adicionales respecto de la aplicación directa de homogenato sobre la membrana (Hopp *et al.*, 1988), elimina los componentes del huésped que reducen la sensibilidad y el efecto de *background* debido a los pigmentos de la planta.

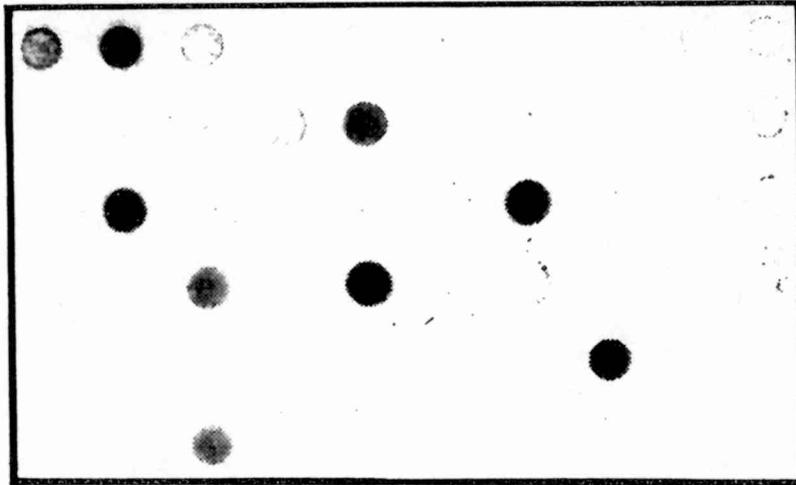


Figura 2.3. Detección de PVY en muestras de papa provenientes del campo.

Extractos obtenidos de brotes de tubérculos, de las variedades Spunta, Huinkul MAG, Ballenera, Serrana INTA y Kennebec, fueron aplicados a una membrana de nylon. La presencia de PVY se detectó utilizando la técnica indirecta como en la Fig. 2.1.B.

Resultados y Discusión

El uso de fagósmidos permite obtener grandes cantidades de DNA recombinante de cadena simple de manera sencilla y económica. La hibridación en *sandwich*, que utiliza una sonda patógeno-específica no marcada y, en un paso posterior, una sonda universal marcada, si bien es relativamente más compleja que la hibridación directa, ofrece ventajas operativas y una mayor sensibilidad. La hibridación con la sonda patógeno-específica puede realizarse en un tiempo más corto ya que es posible aumentar la concentración de la misma. La sonda marcada utilizada en el segundo paso de hibridación puede ser marcada en gran escala mediante técnicas no radioactivas, y remitirse en esta forma a laboratorios de baja complejidad.

El método descrito fue probado con muestras provenientes del campo y los resultados, al ser comparados con la técnica de ELISA, mostraron una concordancia del 93 %. En un trabajo en el que se utilizaron sondas diferentes para los virus PVX, PVY, PLRV y para el viroide PSTV, se demostró que la utilización conjunta de las mismas no modifica la especificidad ni la sensibilidad de la detección de las sondas individuales. Esto permitiría desarrollar métodos de diagnóstico basados en la utilización de polisondas, lo que sería de gran utilidad en la selección de material libre de virus (Hopp et al. 1991).

3 OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI-PVY UTILIZANDO COMO ANTIGENO UNA PROTEINA RECOMBINANTE PRODUCIDA EN *E. COLI*

Construcción del plásmido pRIT2T-Y

Un fragmento de cDNA del clon pBSY8, que contiene las secuencias que codifican 17 aminoácidos de la replicasa, la totalidad de la proteína de cápside y la región 3' no codificante del virus, se obtuvo por digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *Sau3A* y se ligó al vector de expresión pRIT2T, previamente digerido con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*. De esta manera, se construyó un gen quimérico que comprende, en dirección 5'-3', al gen de la proteína A de *S. aureus*, parte de la replicasa viral, la secuencia completa de la cápside y la región 3' no codificante. La construcción se encuentra bajo el control del promotor lambda Pr, lo que permite su expresión inducida por temperatura. La Figura 3.1. muestra un esquema de la construcción del plásmido quimérico, pRIT2T-Y.

Producción y caracterización de la proteína de fusión.

Un cultivo de *E. coli* N4830-1, conteniendo el plásmido pRIT2T-Y se dejó desarrollar a 30°C hasta fase estacionaria temprana ($DO_{400} = 0,6$) en medio LB suplementado con ampicilina. La expresión de la proteína de fusión se indujo por choque térmico a 42°C y se mantuvo el crecimiento bacteriano a esta temperatura durante 90 min. Luego de cosechar las bacterias por centrifugación a 4°C, las mismas se lisaron en un *buffer* conteniendo lisozima y por tratamiento con ultrasonido. Finalmente el homogenato se clarificó por centrifugación. Cuando el extracto de proteínas totales se analizó en un gel de poliacrilamida-SDS, se pudo ob-

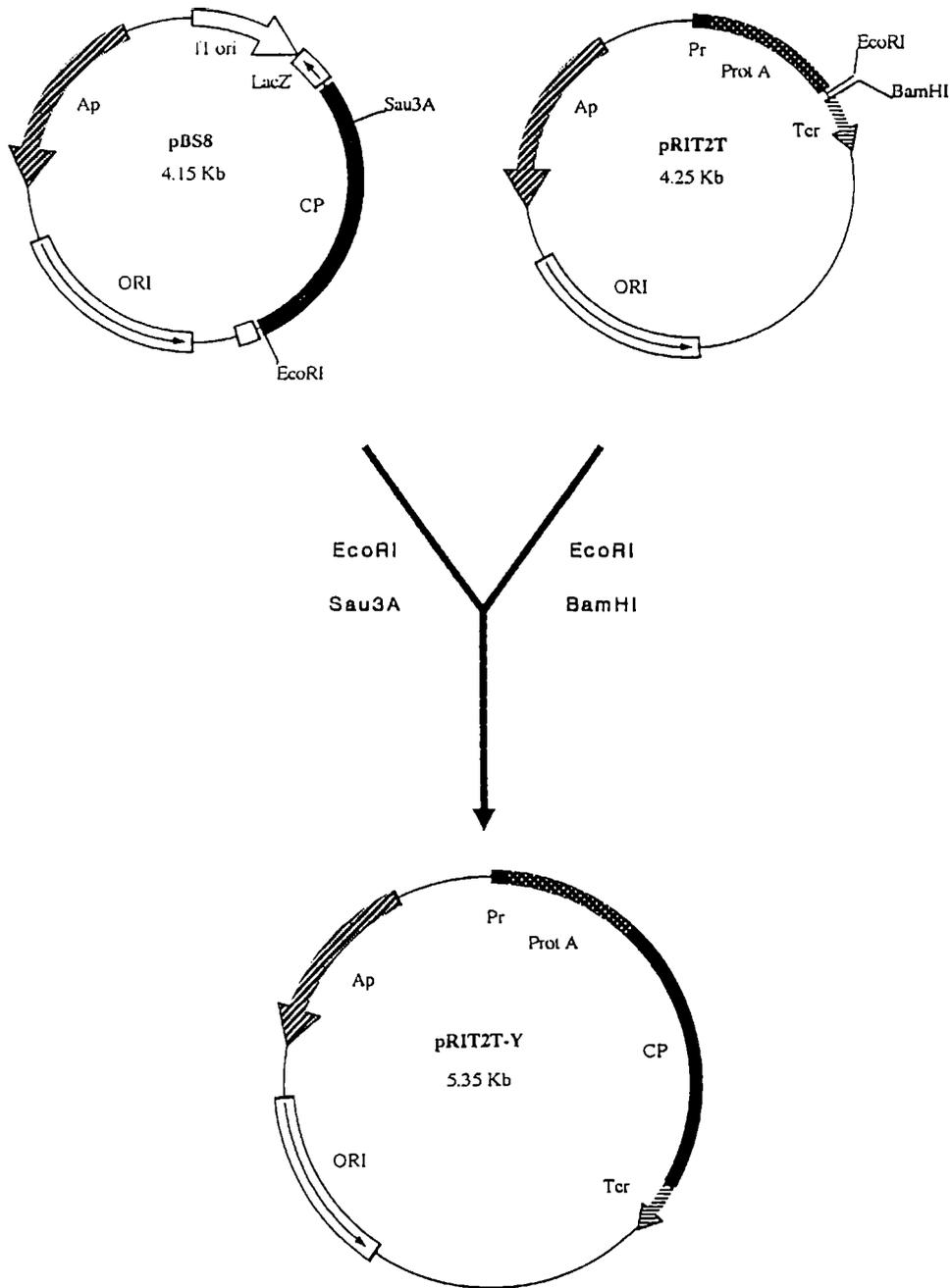


Figura 3.1. Esquema de la construcción del plásmido pRIT2T-Y. Pr: promotor del brazo derecho del fago λ . CP: proteína de cubierta. Prot A: proteína A de *S.aureus*. ter: terminador.

Resultados y Discusión

servar una nueva banda de 60 KD con respecto de los extractos control (Figura 3.2.A). Los extractos anteriores se analizaron mediante la técnica de *Western-blot*, utilizando un anticuerpo de cabra anticonejo conjugado a fosfatasa alcalina. Se observó una fuerte señal correspondiente a la banda de 60 KD, la que posee el tamaño esperado para la proteína de fusión en todos los clones analizados. En el control se observó una señal que corresponde a la banda de 30 KD de la proteína A de *S. aureus*. (Figura 3.2.B).

Purificación de la proteína de fusión.

La proteína de fusión se purificó a partir del homogenato obtenido en el punto anterior por cromatografía de afinidad mediante una columna de IgG Sepharose. Los distintos pasos de la purificación se siguieron mediante geles de poliacrilamida-SDS. La proteína obtenida se liofilizó y finalmente se resuspendió en PBS para ser utilizada luego en la inmunización de conejos. El análisis mediante la técnica de *Western blot*, que se muestra en la Figura 3.3., puso en evidencia la presencia, en la fracción que contiene la proteína de fusión, de una cantidad minoritaria de productos de degradación.

Producción y análisis de los anticuerpos obtenidos contra la proteína de fusión.

Se obtuvieron anticuerpos de conejo contra la proteína recombinante, siguiendo el protocolo que se detalla en Materiales y Métodos. Para determinar su especificidad, los mismos se ensayaron mediante la técnica de dot-ELISA sobre extractos de plantas sanas e infectadas con los virus PVX, PVY y PSMV. Como control se utilizaron anticuerpos obtenidos usando como antígeno virus puri-

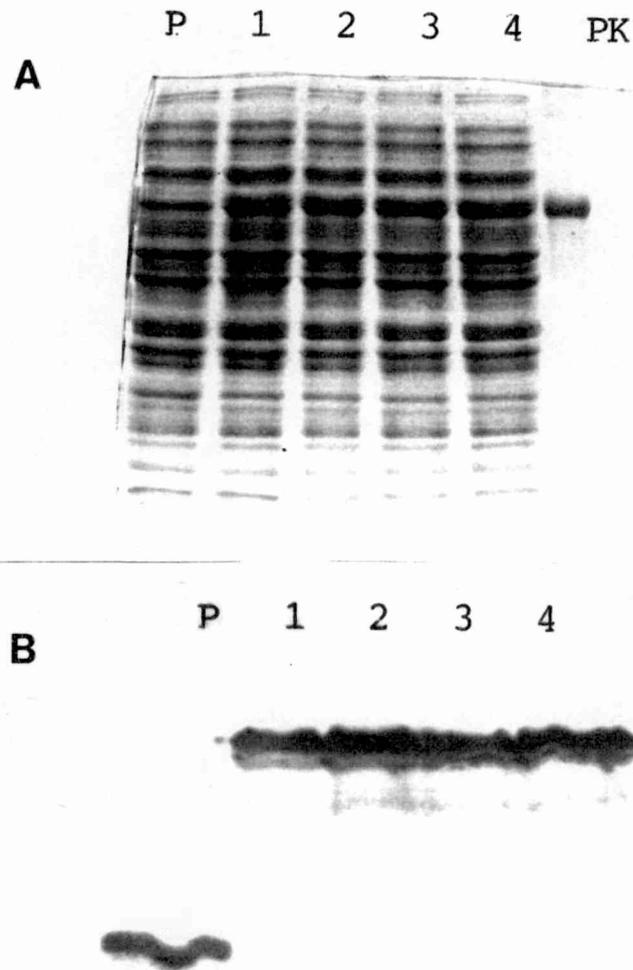


Figura 3.2. Caracterización de la proteína de fusión.

A: Extracto de proteínas totales analizadas en un gel de poli-acrilamida-SDS. A la altura de la banda de piruvato quinasa (57 KD), utilizada como marcador, se puede observar una banda presente en los extractos de bacterias transformadas con pRIT2T-Y (1, 2, 3 y 4) y ausente en extractos de bacterias transformadas con pRIT2T (P) utilizados como control. PK: piruvato quinasa

B: Análisis de un gel idéntico al anterior mediante la técnica de *Western-blot*. En todos los clones se observó una fuerte señal correspondiente a la banda de 60 KD, la que posee el tamaño esperado para la proteína de fusión. En el control se observa una señal que corresponde a la banda de 30 KD de proteína A de *S. aureus*.

Resultados y Discusión

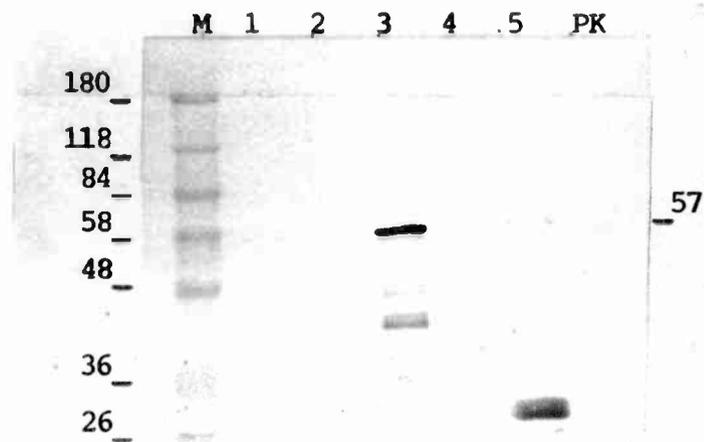


Figura 3.3. Purificación de la proteína de fusión.

Fracciones de los diferentes pasos de la purificación fueron analizadas mediante la técnica de *Western-blot*.

Carriles 1, 2, y 3: extractos de *E.coli* (pRIT2T-Y). Carriles 4, y 5: extractos de *E.coli* (pRIT2T). Carriles 1 y 4 percolado de la columna; carril 2: lavado de la columna con acetato de amonio 5 mM pH 4,8; carriles 3 y 5: elución de las proteínas unidas específicamente utilizando ácido acético 0,5 M pH 3,4. M y PK: marcadores de peso molecular.

Resultados y Discusión

ficado. Como se puede observar en la Figura 3.4., los anticuerpos no reaccionan con extractos de plantas sanas ni infectadas con PVX, pero si lo hacen con los extractos de hojas infectadas con PVY y, en menor medida, con PeSMV. Este resultado era de esperar ya que la homología entre las proteínas de cubierta de ambos virus es de un 80,9 % y, cuando la comparación se realiza en la región central de las proteínas (aminoácidos 30-250), la homología resulta ser del 88,4 % (Rabinowicz *et al.*, en prensa). Por otra parte se sabe que los miembros de la familia potyvirus comparten epitopes comunes.

Discusión

La obtención de antígenos virales para la producción de anticuerpos de utilidad en diagnóstico, presupone contar con preparaciones purificadas del patógeno en cuestión. Estos procesos obligan a propagar el virus, en forma permanente en plantas hospedantes en las que el virus alcanza altas concentraciones. Los factores ambientales como intensidad de la luz, temperatura, humedad, disponibilidad de nutrientes y edad de la planta, tienen una repercusión significativa en el rendimiento, siendo entonces necesario utilizar invernáculos, de alto costo de mantenimiento. Finalmente, los procesos de purificación deben permitir la obtención de preparaciones virales libres de proteínas contaminantes de la planta huésped. Para ello se utilizan esquemas de purificación como los descritos en esta tesis, los que generalmente involucran la utilización de equipos de alto costo.

La expresión de genes clonados en *E.coli* se ha visto facilitada recientemente por la disponibilidad de una gran variedad de vectores de expresión que permiten la producción controlada de proteínas extrañas, en forma eficiente y económica. La producción de proteínas de cápsides virales recombinantes permitiría reem-

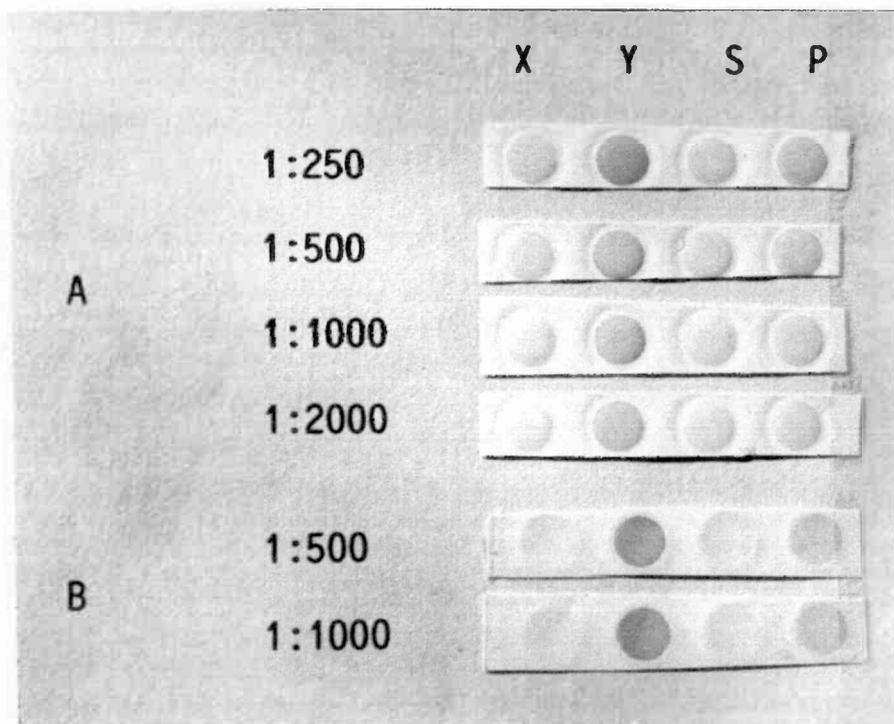


Figura 3.4. Caracterización de los anticuerpos obtenidos mediante la técnica de dot-ELISA.

Se homogeizaron hojas de tabaco sanas e infectadas con los virus PVX, PVY y PeSMV, en *buffer* TBS, a razón de 1 mg de hojas por ml de *buffer*, y se aplicaron sobre una membrana de nitrocelulosa.

A: *dot*-ELISA revelado utilizando distintas diluciones del anticuerpo obtenido contra la proteína de fusión. **B:** *dot*-ELISA revelado utilizando distintas diluciones de un anticuerpo obtenido contra viriones purificados utilizados como control.

S: extracto de hojas sanas. X, Y y P: corresponden a extractos de hojas infectadas con los virus PVX, PVY y PeSMV, respectivamente. Se indican las diluciones de anticuerpos utilizadas.

Resultados y Discusión

plazar los procesos mencionados anteriormente para la obtención de antígenos virales.

El sistema elegido (pRITT2T) tiene algunas características ventajosas para su utilización con los fines mencionados arriba. La proteína A tiene una estructura de α -hélice sin residuos de cisteínas internas, por lo que adopta una conformación que interfiere mínimamente con la secuencia aminoacídica exógena. Por otra parte, a diferencia de las fusiones a β -galactosidasa, los productos obtenidos son generalmente solubles, lo que facilita los procesos posteriores de purificación. Además, al ser la proteína A significativamente menor que β -galactosidasa, se ve favorecida en la fusión la relación de masa respecto de la proteína exógena. Finalmente, el proceso de purificación de la proteína recombinante se simplifica debido a la alta afinidad de la proteína A por la región constante de las inmunoglobulinas.

Utilizando este sistema de expresión hemos producido y purificado, una proteína de fusión que, al ser utilizada como antígeno, nos permitió obtener anticuerpos que resultaron específicos para PVY y se comportaron de manera similar a los anticuerpos utilizados como control.

El sistema utilizado podría ser generalizado a otros virus, en particular, a aquellos que son difíciles de purificar. También sería posible expresar determinadas regiones de una proteína, lo que permitiría contar con anticuerpos más específicos. En el caso de los potyvirus esta región sería sin duda la amino terminal.

4 DESARROLLO DE LA TECNICA DE *SQUASH-BLOT IMMUNOASSAY* (SBIA)

Especificidad del método

Hojas enteras de plantas sanas e infectadas con los virus PVX y PVY se transfirieron por presión a membranas de nylon o nitrocelulosa, tal como se indica en Materiales y Métodos (muestreo por *squash-blot*). La presencia de los virus en las muestras se detectó utilizando anticuerpos virus-específicos, obtenidos en conejos, y anticuerpos hechos en cabra contra inmunoglobulinas de conejo, conjugados a fosfatasa alcalina. Como sustratos cromogénicos se utilizaron NBT y BCIP. Finalmente, las membranas fueron tratadas con una solución de hipoclorito de sodio al 1,5 % para eliminar la coloración debida a los pigmentos de la planta. Como se muestra en la Figura 4.1, los anticuerpos reaccionaron específicamente con los respectivos virus y no con las plantas sanas utilizadas como control. Si bien todas las membranas probadas (Nytran y BAB5 de Schleicher & Schuell, y Nitroplus 2.000 de M.S. I.), dieron resultados satisfactorios, se obtuvieron señales mejor contrastadas utilizando Nitroplus 2000 (Micron Separations Inc.).

Sensibilidad del SBIA

Para estimar la sensibilidad del método se prepararon mezclas de hojas sanas con hojas infectadas con los virus PVX y PVY. Para ello, se mezclaron trozos de hojas sanas e infectadas en distintas proporciones y 20 mg de las diferentes mezclas se transfirieron a una membrana de nylon con la ayuda de un molde realizado en material plástico que poseía orificios de 0.7 cm de

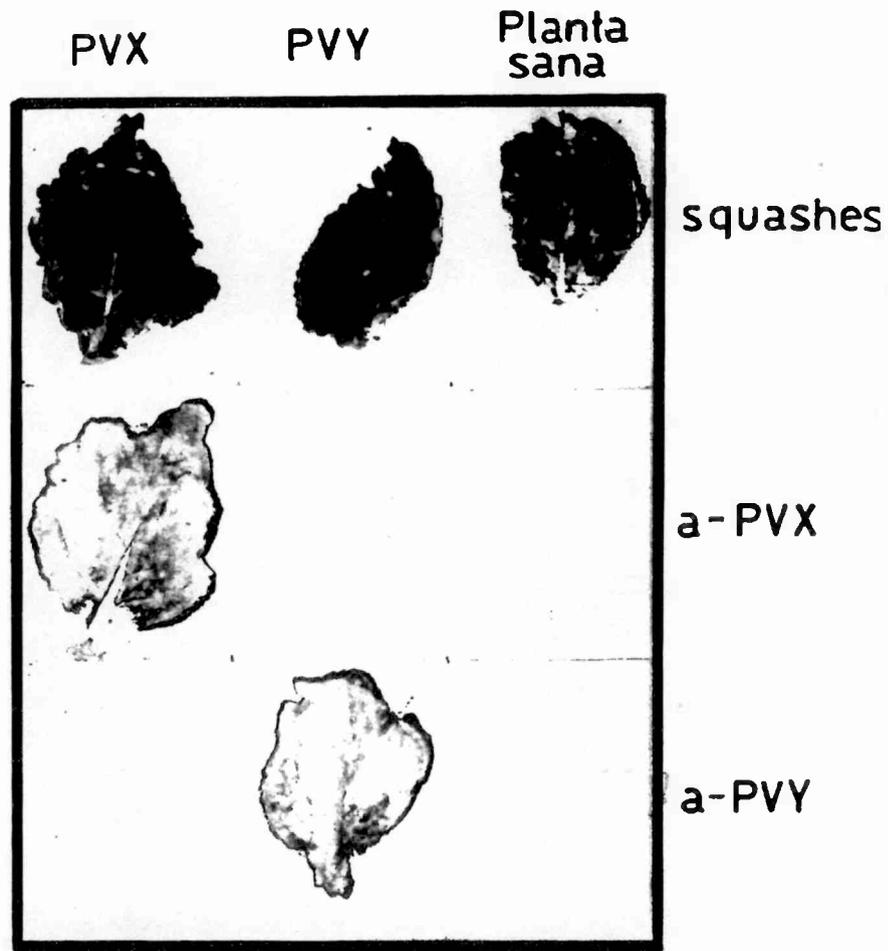


Figura 4.1. Especificidad del SBIA en la detección de los virus PVX y PVY en hojas infectadas.

Línea superior: *squash-blot* de hojas sanas e infectadas con los virus PVX y PVY. Las muestras no fueron tratadas con hipoclorito. Línea media: SBIA de hojas sanas e infectadas utilizando anticuerpos anti-PVX. Línea inferior: SBIA de hojas sanas e infectadas utilizando anticuerpos anti-PVY. Las membranas fueron procesadas como se indica en Materiales y Métodos.

Resultados y Discusión

diámetro. Como control se depositaron sobre la misma membrana diluciones de los virus purificados conteniendo cantidades conocidas de los mismos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.2. Para estimar la cantidad de virus detectable por masa de tejido infectado, se igualó el límite de detección para cada virus control (aproximadamente 0,1 ng) con el límite de detección en las mezclas de tejidos sano e infectado. Se obtuvo señales positivas hasta diluciones que contenían 4 mg de tejido infectado. A partir de este dato se concluyó que es posible detectar 0,5 ng de virus por cada 20 mg de tejido infectado. La sensibilidad del ensayo de ELISA comunmente utilizado en nuestro laboratorio es de 5 ng de virus purificado.

Detección de PVY y PVX en muestras provenientes del campo

Se analizó la presencia de PVY y PVX en 640 muestras de papas provenientes de distintos productores de papa semilla de la provincia de Buenos Aires, las que incluyeron muestras de los cultivares más utilizados en el país (Russet Burbank, Huinkul MAG, Kennebec y Spunta). Las mismas fueron sembradas en una parcela dentro de un campo, situado en La Plata, destinado a la producción de papa para consumo. A los dos meses, se tomaron muestras de hojas por duplicado y se analizó la presencia de PVX y PVY en las mismas, mediante SBIA y ELISA. Un resultado representativo obtenido con una muestra de 100 plantas diferentes, utilizando el SBIA se puede observar en la Figura 4.3.

La Tabla 4.I. resume los resultados obtenidos con cada una de las técnicas utilizadas, expresados como porcentaje de plantas infectadas con PVX y PVY.

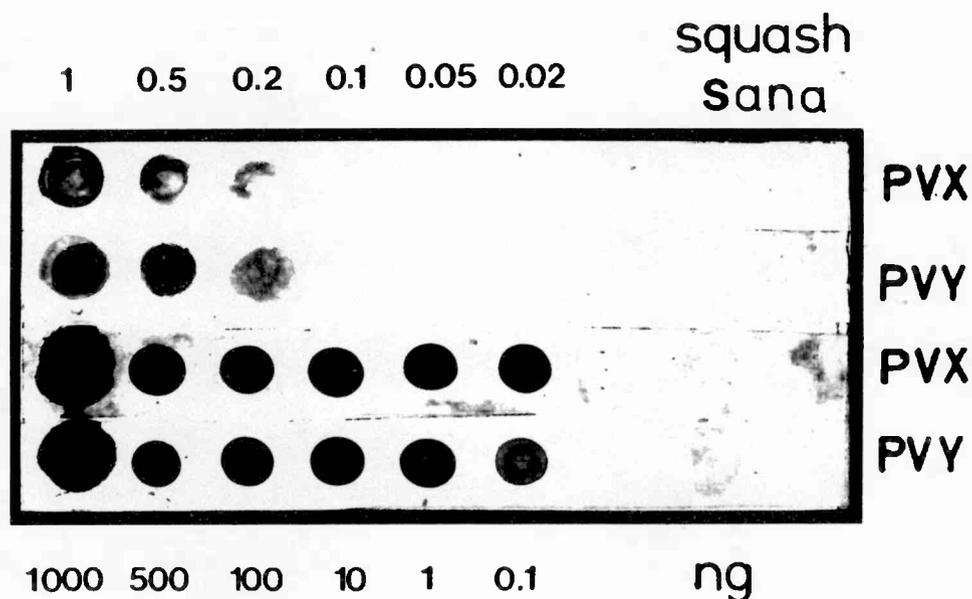


Figura 4.2. Estimación de la sensibilidad del SBIA en la detección de PVX y PVY en hojas infectadas.

Trozos de hojas infectadas con PVX (primera línea) o PVY (segunda línea) se mezclaron con trozos de hojas sanas y se transfirieron a la membrana por la técnica de *squash*. Las proporciones de tejido infectado en la mezcla se indican en la parte superior de la figura. Cantidades conocidas de virus PVX y PVY (tercera y cuarta línea), que se indican en la parte inferior de la figura, se utilizaron como estándares. El límite de detección para cada estándar resultó ser de 0,1 ng. Los controles negativos no mostraron coloración alguna.

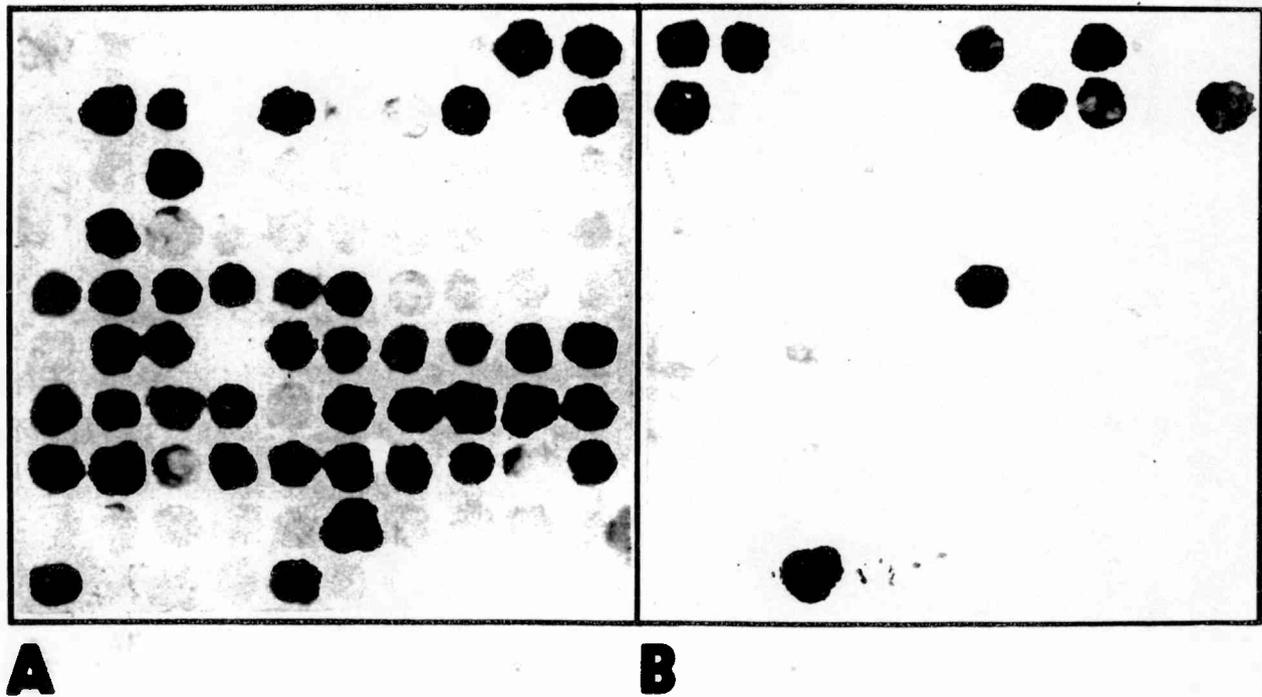


Figura 4.3. Detección de PVX y PVY, utilizando el SBIA, en hojas de plantas de papa, de un muestreo proveniente de campo. Muestras individuales de hojas de 100 plantas diferentes de la variedad Spunta se tomaron por duplicado sobre membranas de nitrocelulosa (Nitroplus 2000) con la ayuda de un molde de plástico, y se procesaron como se indica en Métodos. **A:** Detección utilizando anticuerpos anti-PVX **B:** Detección utilizando anticuerpos anti-PVY.

Tabla 4.I. Resultados obtenidos al comparar las técnicas de SBIA y ELISA, sobre las 640 muestras analizadas.

Cultivar	# de plantas	PVX (%)		PVY (%)	
		ELISA	SBIA	ELISA	SBIA
Russet Burbank	160	57,7	55	1,25	1,25
Huinkul MAG	160	17	16	0	1
Kennebec	160	3	1,25	1,25	0,62
Spunta	160	0	0	1,87	1,87

Con el objeto de comparar los resultados obtenidos con esta técnica con los de otros métodos ampliamente utilizados, se analizaron 181 muestras individuales de hojas de la variedad Spunta en ensayos triplicados mediante las técnicas de ELISA, SBIA y SBMH (*squah-blot molecular hybridization*). En la Figura 4.4. se muestran los resultados obtenidos por la técnica de SBMH al analizar las 100 plantas utilizadas en el ensayo de SBIA de la Figura 4.3. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 4.II., e indican un porcentaje de concordancia entre los tres métodos del 95 % para PVX y del 97 % para PVY. En un ensayo similar, realizado sobre dos lotes de tubérculos del cultivar Russet Burbank (95 muestras analizadas para PVX y 80 para PVY), utilizando las técnicas de SBIA y ELISA los porcentajes de concordancia fueron de 95,8 % para PVX y 100 % para PVY. Los resultados correspondientes se presentan en la Tabla 4.III.

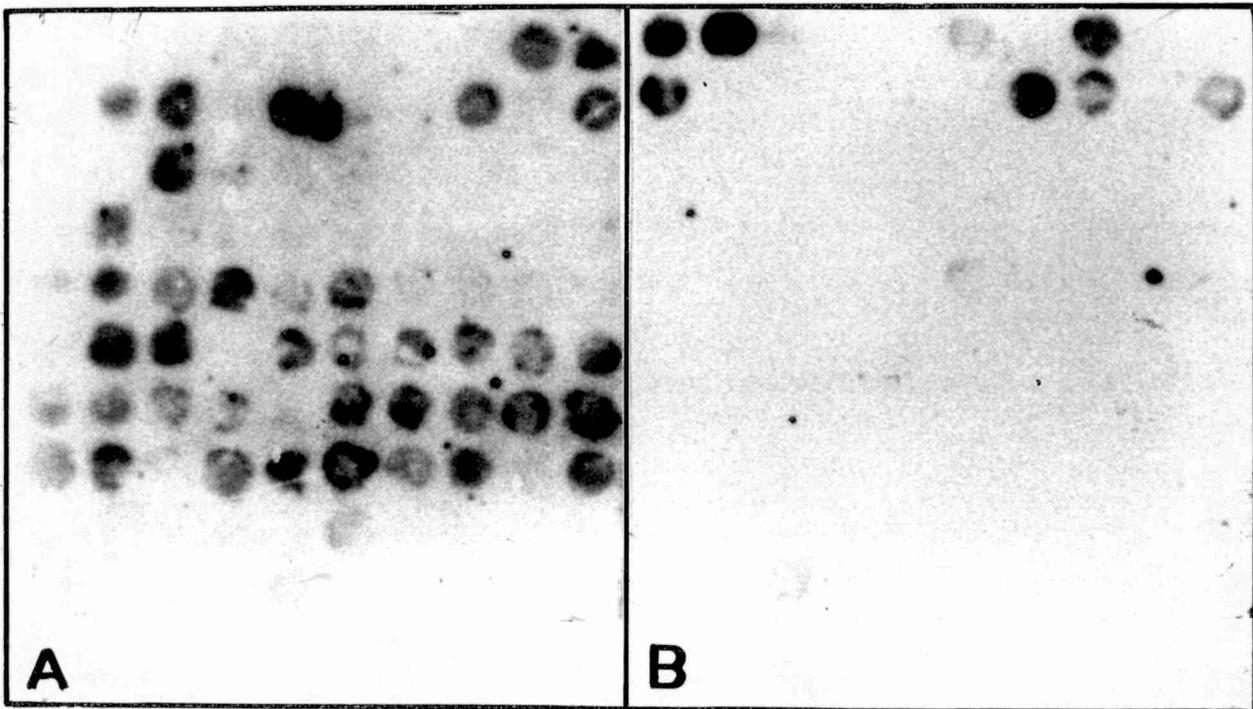


Figura 4.4. Detección de PVX y PVY mediante la técnica de *squash-blot molecular hybridization* (SBMH).

Se detectó la presencia de los virus PVX y PVY en muestras de las plantas analizadas en la Fig. 4.3., utilizando sondas de cDNA marcadas con radioactividad. **A:** Detección utilizando un clon de PVX como sonda. **B:** Detección utilizando un clon de PVY como sonda.

Tabla 4.II. Resultados obtenidos al comparar las técnicas de SBIA, ELISA y SBMH al analizar muestras de hojas.

	Número de muestras							
	SBIA + ELISA + SQBMH +	SBIA - ELISA - SQBMH -	SBIA + ELISA + SQBMH -	SBIA + ELISA - SQBMH -	SBIA - ELISA + SQBMH -	SBIA - ELISA - SQBMH +	SBIA + ELISA - SQBMH +	SBIA - ELISA + SQBMH +
PVY	26	150	5	0	0	0	0	0
PVX	102	69	1	0	9	0	0	0

Se analizó la presencia de PVX y PVY, en muestras de hojas de una misma planta de la variedad Spunta, que fueron procesadas por las tres técnicas. Los resultados se agruparon en 8 categorías.
+ = positivo, - = negativo.

Tabla 4.III. Resultados obtenidos al comparar las técnicas de SBIA y ELISA al analizar muestras de tubérculos.

	Número de muestras			
	SBIA + ELISA +	SBIA - ELISA -	SBIA - ELISA +	SBIA + ELISA -
PVX	78	13	4	0
PVY	1	79	0	0

Se analizó la presencia de PVX y PVY, en brotes de tubérculos de papa de la variedad Spunta, los que fueron procesados por ambas técnicas. Los resultados se agruparon en 4 categorías.
+ = positivo, - = negativo.

Se realizaron experimentos control para analizar la posibilidad de reutilizar los anticuerpos virus-específicos y el conjugado a fosfatasa alcalina y para constatar el efecto del horneado de las muestras sobre el nivel de detección. Los resultados expuestos en la Figura 4.5. muestran que la reactividad de los anticuerpos no disminuye luego de ser reutilizados hasta cinco veces consecutivas y que el tratamiento de la membrana con calor no afecta al resultado final del ensayo.

Detección de PVY y PVX en distintos tejidos de papa y en tubérculos en distintos estadios de brotación

Se analizaron improntas de hojas, tallos, raíces, tubérculos y brotes de plantas de papa infectadas para determinar la presencia de PVX y PVY en los diferentes tejidos. Ambos virus se detectaron en todos los tejidos analizados. En particular, se encontraron altos niveles de ambos virus en las raíces. En la Figura 4.6.A se muestran los resultados obtenidos utilizando un anticuerpo contra el virus PVX. Un resultado similar se obtuvo utilizando un anticuerpo contra el virus PVY. Si bien se puede observar la presencia del virus en los distintos tejidos, la difusión de la muestra no permitió obtener una información muy precisa. Se obtuvieron imágenes más nítidas cuando la transferencia se realizó con la ayuda de un equipo de filtración múltiple conectado a una trompa de agua para ejercer una ligera succión. A la izquierda de la Figura 4.6.B. se observa que, en tubérculos recién cosechados, el virus se encuentra preferentemente localizado en el estolón. Improntas obtenidas en distintos estadios posteriores a la ruptura de dormición de los tubérculos mostraron que el virus se encuentra inicialmente distribuido en la corteza para concentrarse más tarde en las zonas que rodean al brote y en el brote mismo (Figuras 4.6.BII y III).

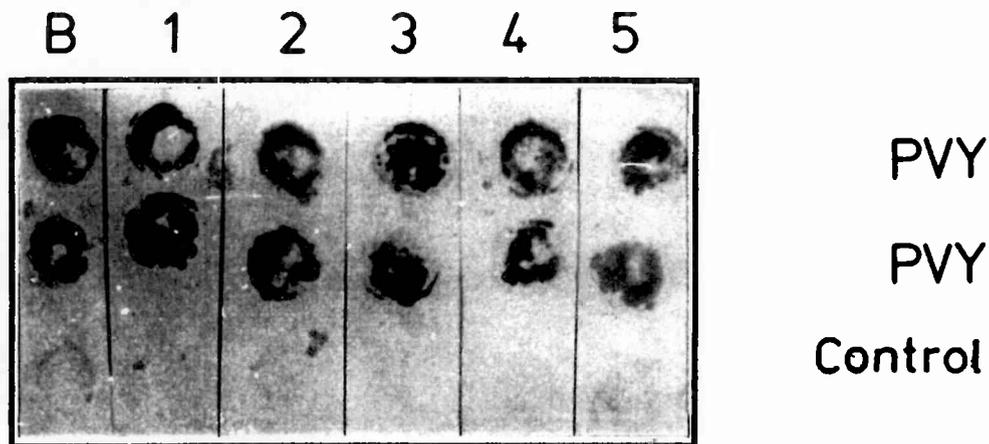


Figura 4.5. Efecto de la reutilización de los anticuerpos y del horneado de las muestras, sobre el nivel de detección.

Se tomaron muestras por sextuplicado de hojas de papa infectadas con PVY y de una hoja sana. Luego de la detección del virus en la primera réplica, las diluciones de anticuerpos anti-PVY y el conjugado se recuperaron y se guardaron a 4 °C. Las mismas diluciones se utilizaron para repetir el ensayo por cinco veces consecutivas. Líneas 1-5: número de ensayo. Línea B: muestras horneadas durante 2 hs a 80 °C y analizadas en forma conjunta con las de la primera línea.

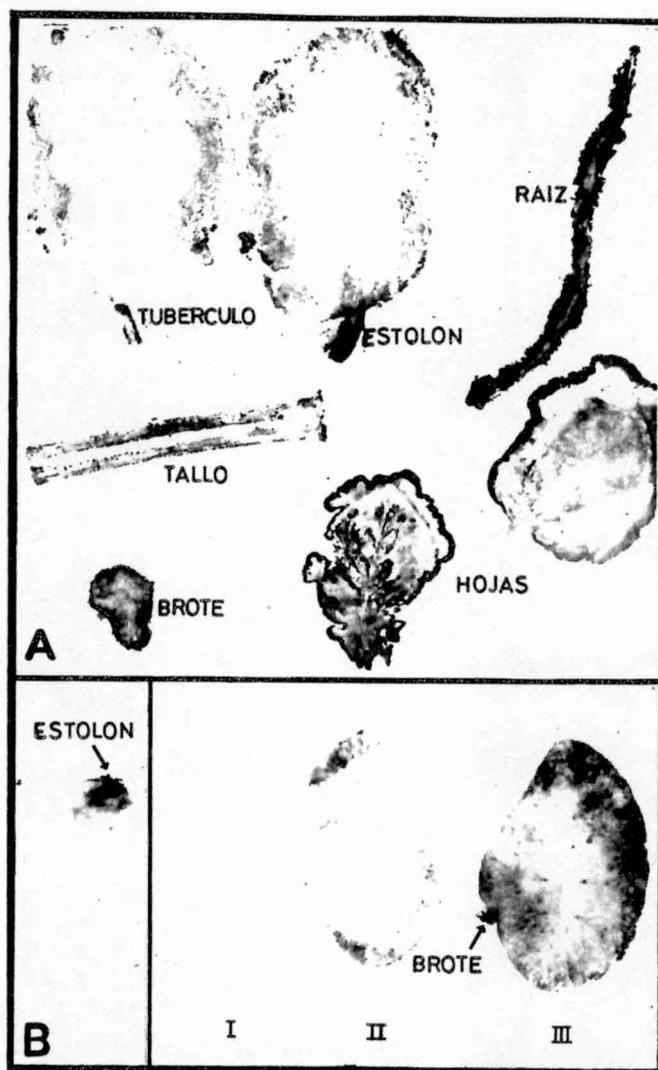


Figura 4.6. Análisis de distintos tejidos de una planta infectada con PVX.

A: Distintos tejidos de una planta de papa (Spunta) fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa (Nitroplus 2000). La presencia de PVX se detectó como se indica en Métodos.

B: Tubérculos de papa de la variedad Spunta, se cortaron en mitades y una de ellas se apoyó sobre una membrana de nitrocelulosa colocada en la base de un equipo de filtración. La transferencia se realizó entonces utilizando una leve succión.

Izquierda: tubérculo analizado una semana después de cosechado. I-III: tubérculos almacenados en oscuridad y analizados diez semanas después de cosechados. I: tubérculo sano, II: tubérculo infectado (sin brotes), III: tubérculo infectado (con brotes).

Discusión

La técnica de SBIA es un procedimiento rápido, específico y sensible que permite procesar un gran número de muestras y que podría ser utilizada ventajosamente en la certificación de semilla de papa. Cuando ambas técnicas fueron comparadas frente a diluciones seriadas de virus purificado, la sensibilidad del método fue un orden mayor que la de ELISA. Debido a las diferencias en la cantidad de virus que queda retenido en el tejido vegetal, lo cual depende de los distintos métodos de toma de las muestras, es difícil realizar una comparación estricta entre las dos técnicas a nivel de cantidad de virus detectable por peso de tejido. No obstante, cuando se comparó el SBIA con ELISA y SBMH en pruebas realizadas sobre un gran número de plantas provenientes del campo, los tres métodos dieron resultados comparables, tanto en hojas como en tubérculos.

Existen varias ventajas prácticas del método con respecto al ELISA: SBIA puede implementarse a gran escala sin la necesidad de equipos costosos, facilitando la introducción de la certificación en laboratorios de baja complejidad, los que podrían estar localizados cerca de las áreas de cultivo. Ya que la toma de muestra requiere sólo un mínimo de entrenamiento, podría ser realizada directamente por los agricultores que deseen controlar la calidad de su producción. Posteriormente, las membranas conteniendo las muestras podrían ser enviadas al laboratorio para su análisis. Dado que los virus de papa son inactivados por el tratamiento de las muestras a 80 °C durante 2 hs, esto podría utilizarse para evitar el riesgo de diseminación de patógenos en el envío de las muestras. Otras ventajas se refieren a los costos y eficiencia del trabajo. La incubación de las membranas en bolsas cerradas de polietileno, permite reducir el volumen de la solución de anticuerpos a la mitad de lo utilizado en el ELISA. Además, los anticuerpos pueden ser recuperados con facilidad y reutilizados, lo que es difícil de implementar cuando se trabaja con

Resultados y Discusión

microplacas. En términos de tiempo de trabajo, un operador mínimamente entrenado, sería capaz de completar en un día el análisis de alrededor de 400 muestras. Este número podría incrementarse si las muestras son tomadas a lo largo de varios días y son luego procesadas simultáneamente.

Finalmente, la presencia de los virus PVX y PVY fue detectada en improntas de distintos tejidos de papas infectadas. Esto sugiere la posibilidad de utilizar este método para monitorear el curso de las infecciones a lo largo del tiempo.

5 EXPRESION DE UN GEN QUIMERICO DE CAPSIDE DEL VIRUS PVY EN PLANTAS TRANSGENICAS DE PAPA

CONSTRUCCION DE UN GEN QUIMERICO DE LA CAPSIDE VIRAL

Dado que el PVY se traduce como una poliproteína, para poder expresar en plantas su proteína de cubierta, debió adicionarse a la secuencia correspondiente un codón de iniciación con un consenso adecuado para su reconocimiento por el sistema de traducción vegetal. Como región 5' de esta construcción se utilizó un clon obtenido de una nueva biblioteca de cDNA conteniendo 80 bases de la secuencia 5' no traducida y la secuencia que codifica los primeros aminoácidos de la poliproteína viral (pUC5'PVY). Utilizando este clon se construyó un gen quimérico que contiene, 72 nucleótidos de la región 5' no codificante, las secuencias que codifican los primeros 5 aminoácidos de la poliproteína del virus, los últimos 17 aminoácidos de la replicasa viral, la cápside completa y que contiene además la región 3' no codificante. Esta quimera contiene el sitio de reconocimiento de la proteasa NIa, por acción de la que se obtiene la cápside madura a partir de la poliproteína. El plásmido correspondiente se denominó pBSAUGCAP.

Construcción de una nueva biblioteca de cDNA del virus PVY

Dado que no fue posible aislar de la biblioteca construida en el fago λ gt11 clones conteniendo secuencias de la región 5' del gRNA viral que eran necesarias para construir el plásmido quimera, se decidió realizar una nueva biblioteca.

Purificación del RNA viral y síntesis de cDNA

Para la purificación del RNA viral se modificó el protocolo de purificación de virus descrito por Murphy (1990). Al introducir las modificaciones se tuvo en cuenta que el objetivo era la obtención de RNA viral y no de viriones, por lo cual se eliminaron del protocolo original las centrifugaciones a través de gradientes de sacarosa y CsSO₄. Estos pasos, necesarios para eliminar las proteínas contaminantes del huésped, fueron reemplazados por una centrifugación a través de un colchón de sacarosa, la que, si bien no impedía el paso de proteínas contaminantes, evitaba la contaminación con RNA de la planta. Posteriormente, la cubierta viral y las proteínas contaminantes se digirieron por tratamiento con proteinasa K y el RNA viral se purificó mediante extracciones con fenol y precipitación etanólica. Utilizando la técnica modificada fue posible obtener gRNA en una cantidad muy superior a la obtenida utilizando el método anterior. Así, a partir de 100g de hojas infectadas se obtuvieron rutinariamente 50 µg de RNA viral, mientras que con el protocolo anterior se obtenían 5µg.

Para la síntesis del cDNA se utilizó como iniciador de la primer cadena, el oligonucleotido 5'-GGATCCTGATGTCTAACTTC-3', que hibrida al gRNA de PVY_n entre los nucleótidos 3641 y 3655. A este cDNA se ligaron adaptadores *Eco*RI, procediéndose luego a separar el exceso de los mismos y a fraccionar los cDNAs por tamaño en una columna de Sepharose CL4B. Las fracciones que contenían cDNAs mayores de 500 bp, se reunieron y se ligaron al vector pUC13, previamente digerido con la enzima *Eco*RI y defosforilado por acción de fosfatasa alcalina. La mezcla de ligación se utilizó luego para transformar células NM522 competentes.

Construcción del plásmido pBS5'AUGCAP

Utilizando el oligonucleótido 5'-GCCATTGAGGATCTGAA-3', que hibrida sobre el codón de iniciación, se rastreó la biblioteca y se seleccionó un clon que contenía 80 bases de la región 5' no codificante más la secuencia que codifica los primeros aminoácidos de la poliproteína viral. Este clon se denominó pUC5'NCPVY. Un fragmento de restricción que comprendía 87 bp de este clon, obtenido por digestión con las enzimas *Xba*I y *Hinc*II, se introdujo en el clon pBSY8, el cual había sido previamente digerido con las enzimas *Xba*I y *Sma*I.

De esta manera se obtuvo el clon quimérico pBSAUGCAP, que contiene 72 nucleótidos de la región 5' no codificante, más las secuencias que codifican los primeros 5 aminoácidos de la proteína P1, los últimos 17 aminoácidos de la replicasa, la cápside viral completa y la región 3' no codificante. Este clon conserva el sitio de clivaje para la proteasa NIa, responsable del procesamiento de la poliproteína en su extremo carboxilo. La Figura 5.1. muestra un esquema de la estrategia seguida para la obtención del clon pBSAUGCAP.

La construcción se verificó secuenciando la región de unión entre los clones para comprobar la continuidad del marco de lectura. La secuencia se muestra en la Figura 5.2.

Introducción del gen quimérico en un vector de expresión vegetal

Para poder expresar la cápside quimérica en plantas transgénicas fue necesario, además de introducir el codón de iniciación, colocar a la misma bajo la dirección de un promotor fuerte. Para ello se utilizó el promotor de 35S de CaMV contenido en el plásmido de tipo binario pBI121. Dicho plásmido se sometió

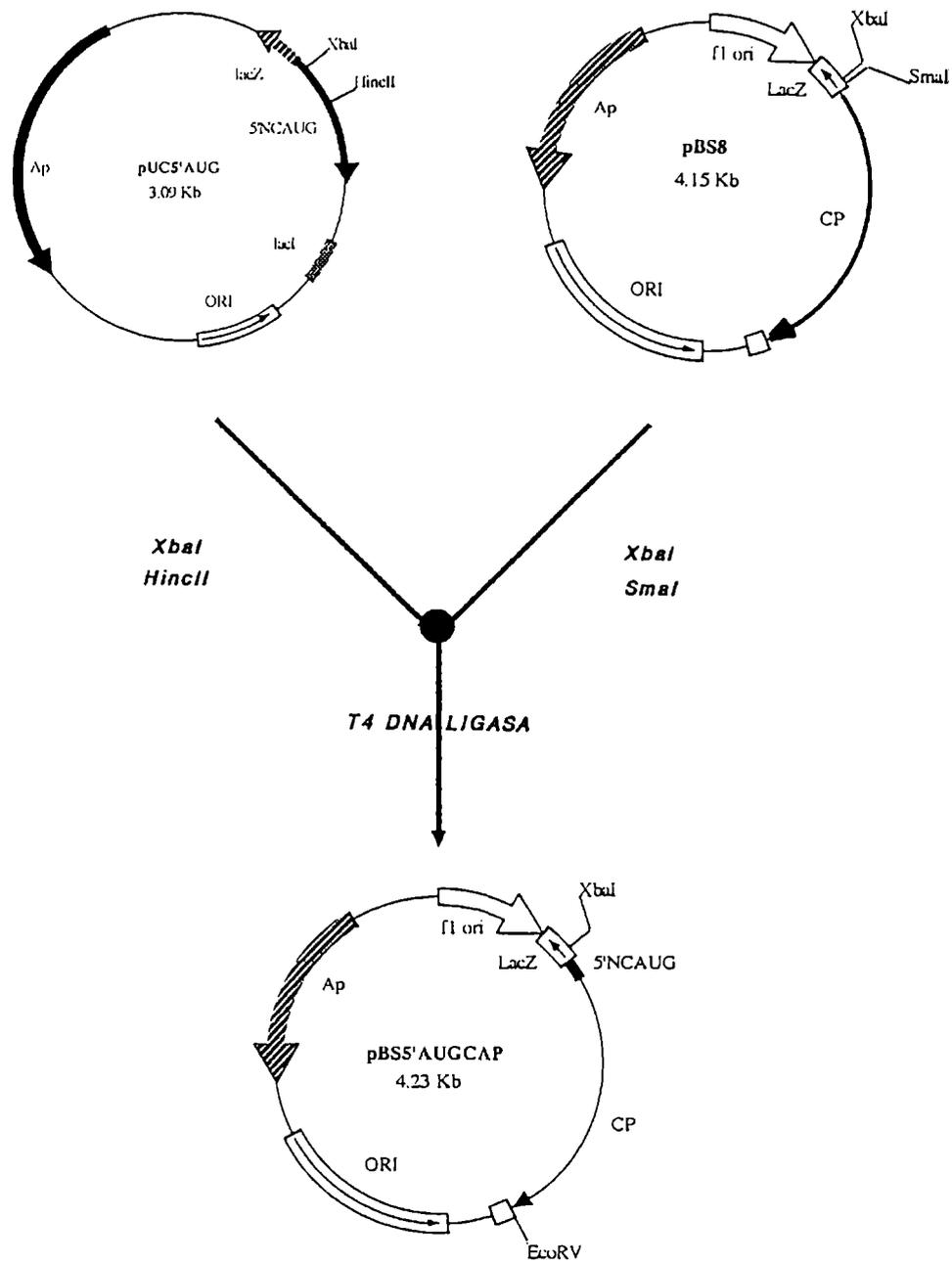


Figura 5.1. Esquema de la construcción de pBS5'AUGCAP.

Resultados y Discusión

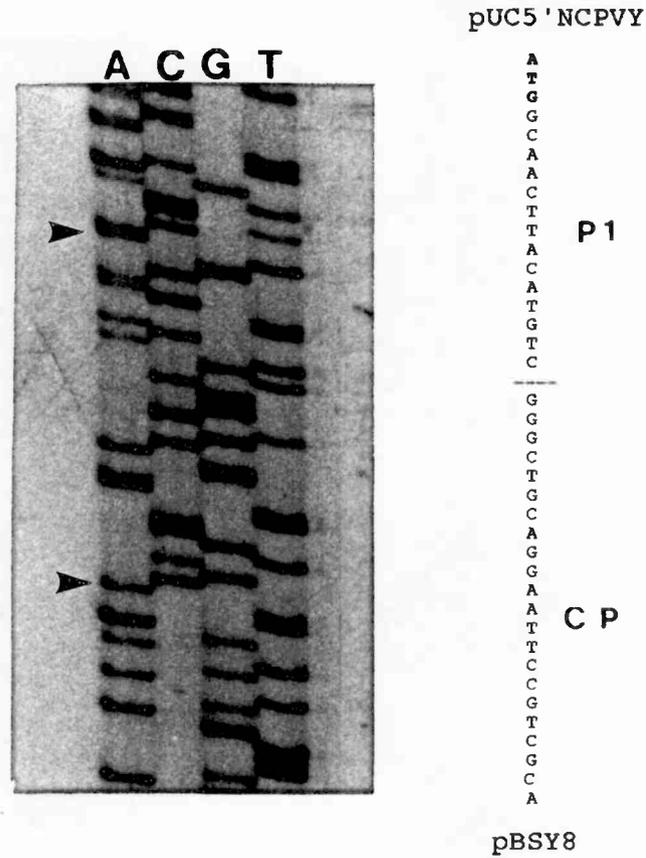


Figura 5.2. Secuencia de la unión de los plásmidos involucrados en la construcción de pBSAUGCAP.

Se muestra parte de la secuencia obtenida del clon pBSAUGCAP, mediante la que se verificó la continuidad del marco de lectura en el gen quimera. La zona de unión entre los clones se muestra como una línea quebrada. P1: región amino terminal de la proteína P1, CP: proteína de cubierta. Las flechas indican el principio y el fin de la secuencia escrita a la derecha, la que comienza con el codón de iniciación de la poliproteína.

a los siguientes tratamientos:

- Se digirió con la enzima *Sst*I y se eliminó el extremo 3' protruyente por acción de la DNA polimerasa del fago T4.

- Se digirió con la enzima *Xba*I, y se electroeluyó el fragmento de 13 Kb correspondiente al vector, eliminando de esta forma al gen que codifica para la enzima β -glucuronidasa (GUS).

- Este vector se ligó al gen quimérico, contenido en el clon pBS5'AUGCAP, obtenido por digestión con las enzimas *Xba*I y *Eco*RV.

La Figura 5.3. esquematiza los pasos descritos anteriormente.

La mezcla de ligación se utilizó para transformar células NM522 de *E. coli*. Los clones recombinantes fueron seleccionados en medio sólido conteniendo kanamicina y los clones obtenidos fueron caracterizados por mapeo de restricción

El plásmido seleccionado finalmente se denominó pBI-PVY. Contiene las secuencias mencionadas anteriormente, precedidas por un codón de iniciación con el consenso adecuado para su reconocimiento en plantas. El gen quimérico se encuentra bajo la dirección del promotor del transcripto 35S CaMV y posee las señales de terminación del gen de nopalina sintetasa (tNOS).

Transformación de *A. tumefaciens* con los plásmidos pBI-121 y pBI-PVY

La cepa de *A. tumefaciens* utilizada fue la LBA4404. La misma posee el plásmido pAL4404, el cual aporta las funciones de virulencia necesarias para la transferencia de la región T. La cepa es resistente a los antibióticos rifampicina y estreptomycin.

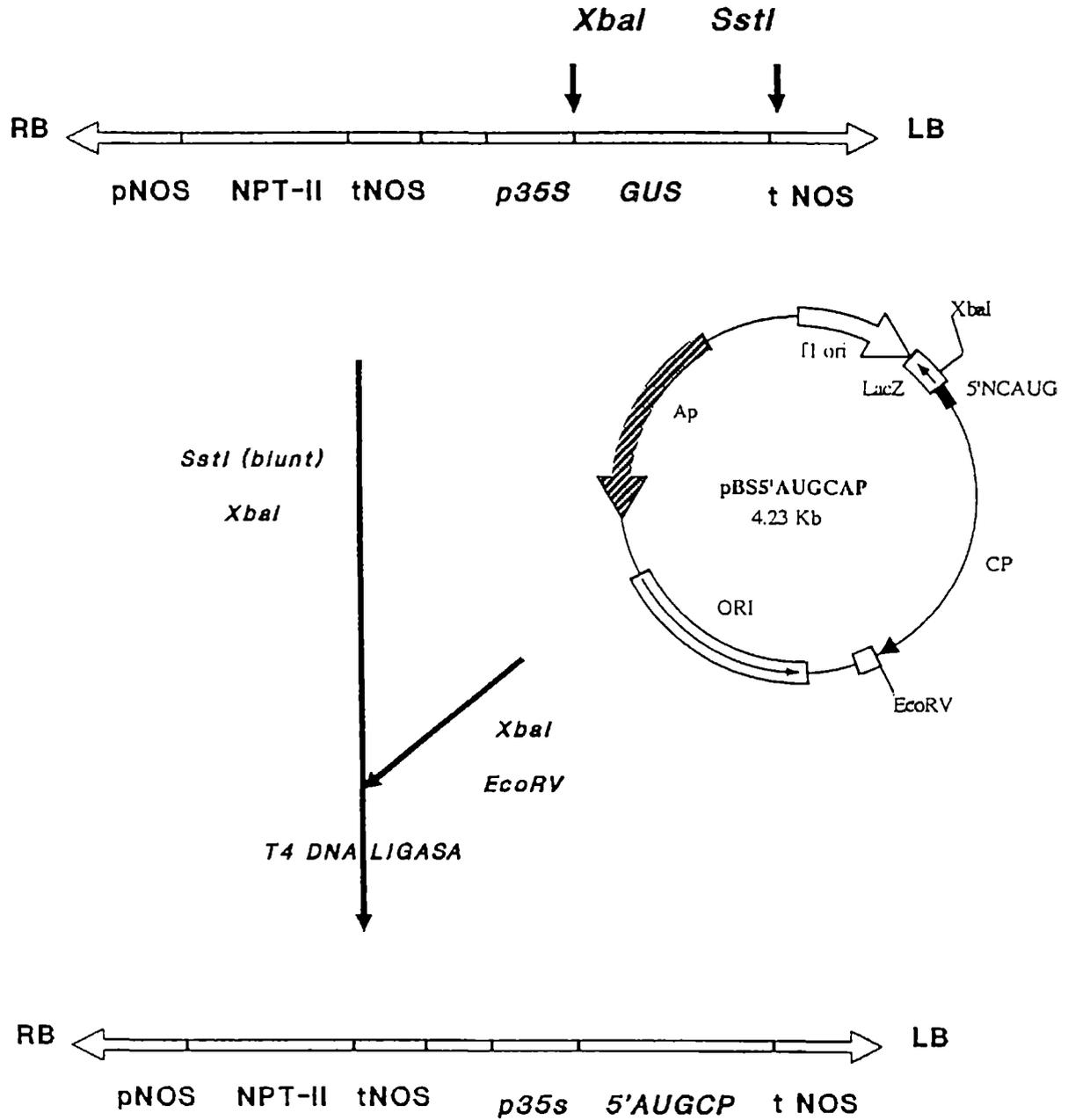


Figura 5.3. Esquema de la construcción de pBI-PVY. De los plásmidos binarios pBI-121 y pBI-PVY se muestra solamente la región del T-DNA.

Resultados y Discusión

Los plásmidos pBI-121 y pBI-PVY se utilizaron para transformar agrobacterias mediante la técnica de congelación-descongelación. Los clones recombinantes fueron seleccionados en medio sólido conteniendo los antibióticos rifampicina, estreptomycinina y kanamicina. Finalmente, los clones fueron caracterizados por mapeo de restricción. El pBI-PVY se digirió con la enzima *EcoRI* con el objeto de liberar el fragmento que codifica la construcción quimérica. El pBI-121, con las enzimas *EcoRI*/*BamHI* para liberar el gen GUS. Los productos de las digestiones fueron analizados por la técnica de Southern. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 5.4. A y B.

Transformación genética de plantas de papa

Se utilizó la técnica de cocultivo de discos de tubérculos con agrobacterias recombinantes. Se decidió utilizar minitubérculos de la variedad Spunta, en razón de ser ésta la de mayor importancia económica en nuestro país. La Figura 5.5. muestra un esquema general del proceso de transformación seguido para efectuar la transformación y regeneración.

Los minitubérculos de papa se pelaron y desinfectaron como se indica en Materiales y Métodos y se cortaron en discos de aproximadamente 1 mm de espesor y 1 cm² de superficie, que fueron cocultivadas con las agrobacterias recombinantes. El número de discos y las cepas utilizadas en cada cocultivo fueron:

Cepa	N° de discos
LBA4404	50
LBA4404 (pBI-121)	50
LBA4404 (pBI-PVY)	180
Sin inóculo	50

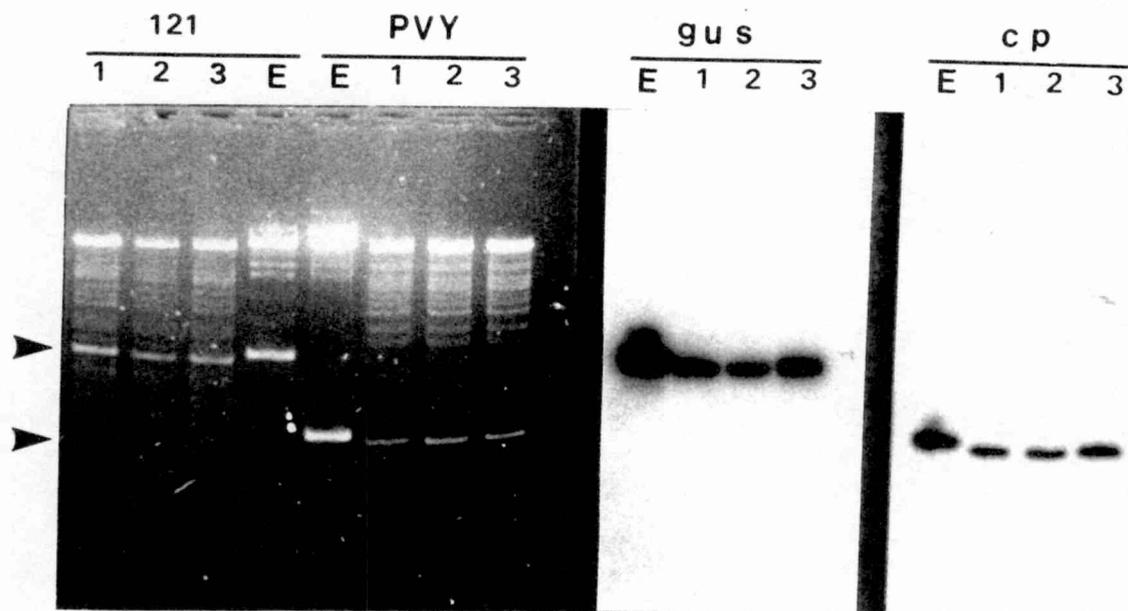


Figura 5.4. Constatación de la transformación de *Agrobacterium* con *pBI-121* y *pBI-PVY*.

Se preparó DNA plasmídico de los clones recombinantes y se caracterizaron mediante mapeo de restricción y Southern-blot.

Izquierda: productos de la digestión de los clones *pBI-121* y *pBI-PVY*. Las flechas indican las bandas correspondientes al gen GUS y al gen de la cápside. 1-3: DNA obtenido de clones de *A. tumefaciens* E: DNA obtenido de un clon de *E. coli* previamente caracterizado, utilizado como control. Derecha: *Southern-blot* del gel anterior. Como sondas se utilizaron al gen GUS y el gen de la cápside de PVY (CP).

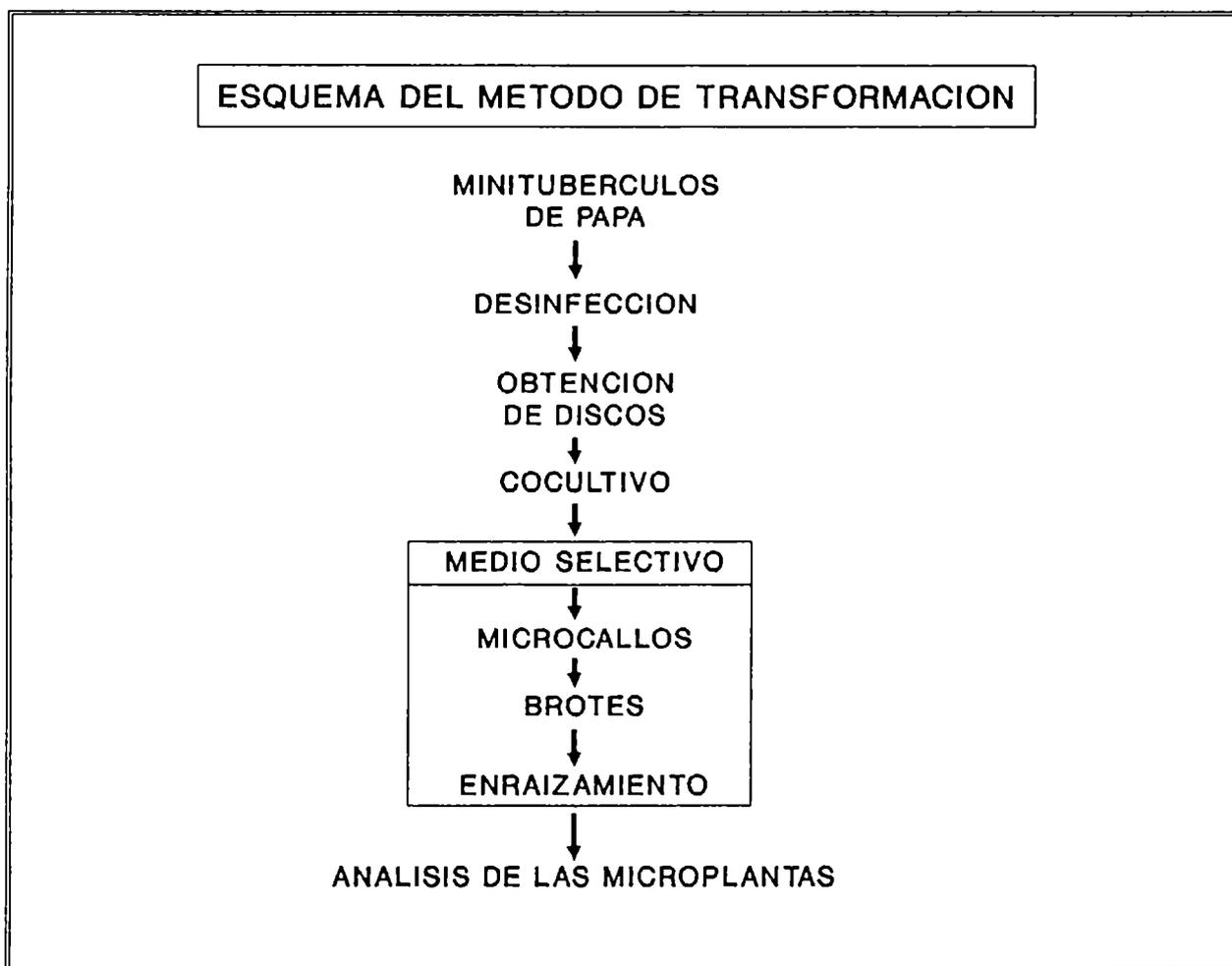


Figura 5.5. Esquema del proceso de transformación de discos de papa (variedad Spunta).

Resultados y Discusión

Luego del cocultivo, los discos cocultivados con LBA4404 (pBI-121) y LBA4404(pBI-PVY) se pasaron a recipientes conteniendo MS30, hormonas, vitaminas, bacteriostático, y kanamicina como agente de selección.

Los discos cocultivados con LBA4404 se utilizaron como control del efecto de la cepa sobre la regeneración y sensibilidad al antibiótico y los discos sin inocular como control de sensibilidad al antibiótico y control de regeneración. Los repiques se repitieron cada 20 días, utilizando siempre el mismo medio.

A los 15 días los controles de sensibilidad al antibiótico se necrosaron y murieron, mientras que los controles de regeneración formaron callos. Simultáneamente, sobre los discos cocultivados con LBA4404(pBI-121) y LBA4404(pBI-PVY) comenzaron a formarse microcallos. A los 30 días del cocultivo comenzaron a aparecer los primeros brotes en los controles de regeneración y a los 45 días los primeros brotes sobre los discos cocultivados con LBA4404(pBI-121) y LBA4404(pBI-PVY). Cuando estos últimos alcanzaron un tamaño de 10 a 20 mm se repicaron en medio MS30 sólido sin hormonas, suplementado con kanamicina y bacteriostático.

En este medio los brotes enraizaron y, luego de 2 ó 3 repiques sucesivos, las microplantas que seguían exhibiendo un desarrollo normal del sistema radicular se pasaron a tierra. En la Figura 5.6. se muestran distintos estadios del proceso de obtención de las plantas transgénicas.

Se obtuvieron 34 plantas de la transformación con pBI-PVY y 8 plantas de la transformación con pBI-121

Ensayo de actividad de la enzima β -glucuronidasa

Se analizaron las plantas obtenidas a partir del cocultivo con LBA4404 (pBI-121) para verificar la presencia de la enzima β -glucuronidasa. Al ensayar la actividad correspondiente en extrac-

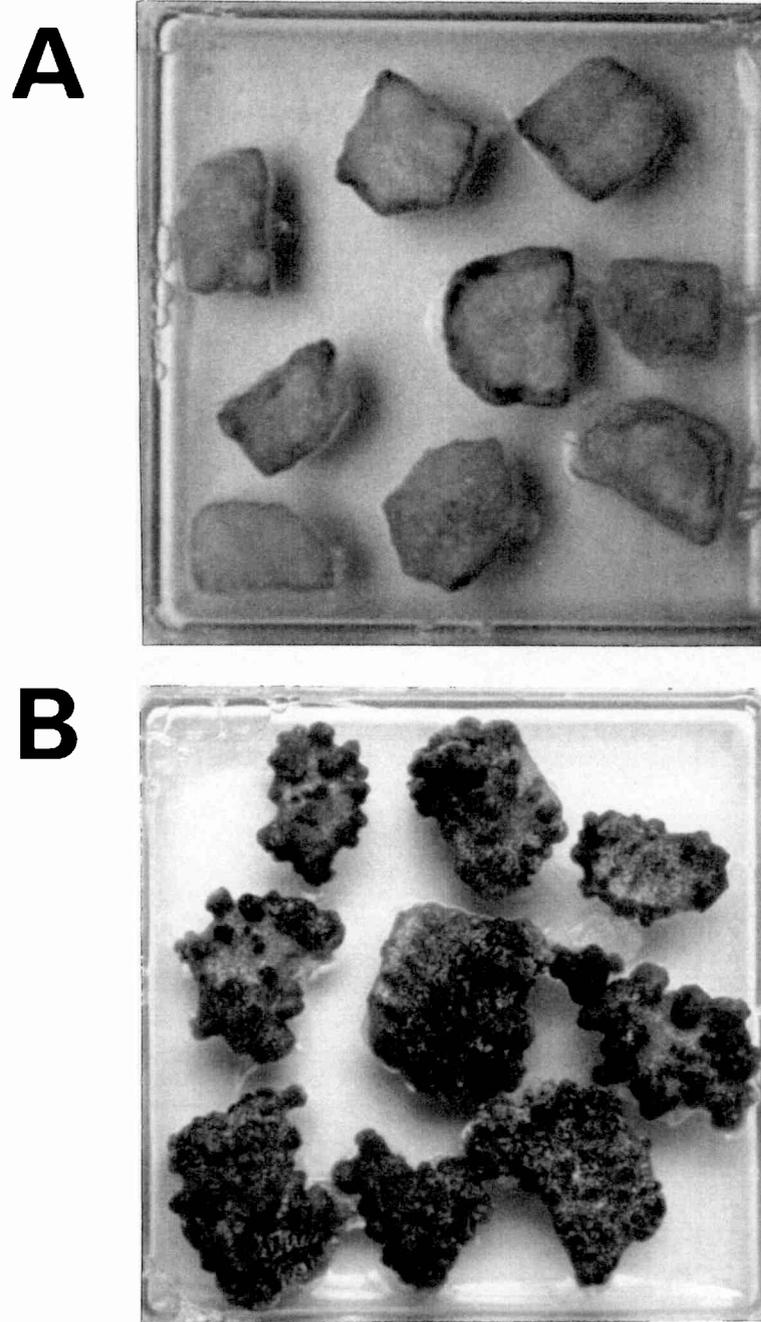


Figura 5.6. Distintos estadios en el proceso de obtención de las plantas transgénicas de papa (variedad Spunta).
A: controles de sensibilidad al antibiótico y **B:** control de regeneración a los 15 días de iniciado el experimento.

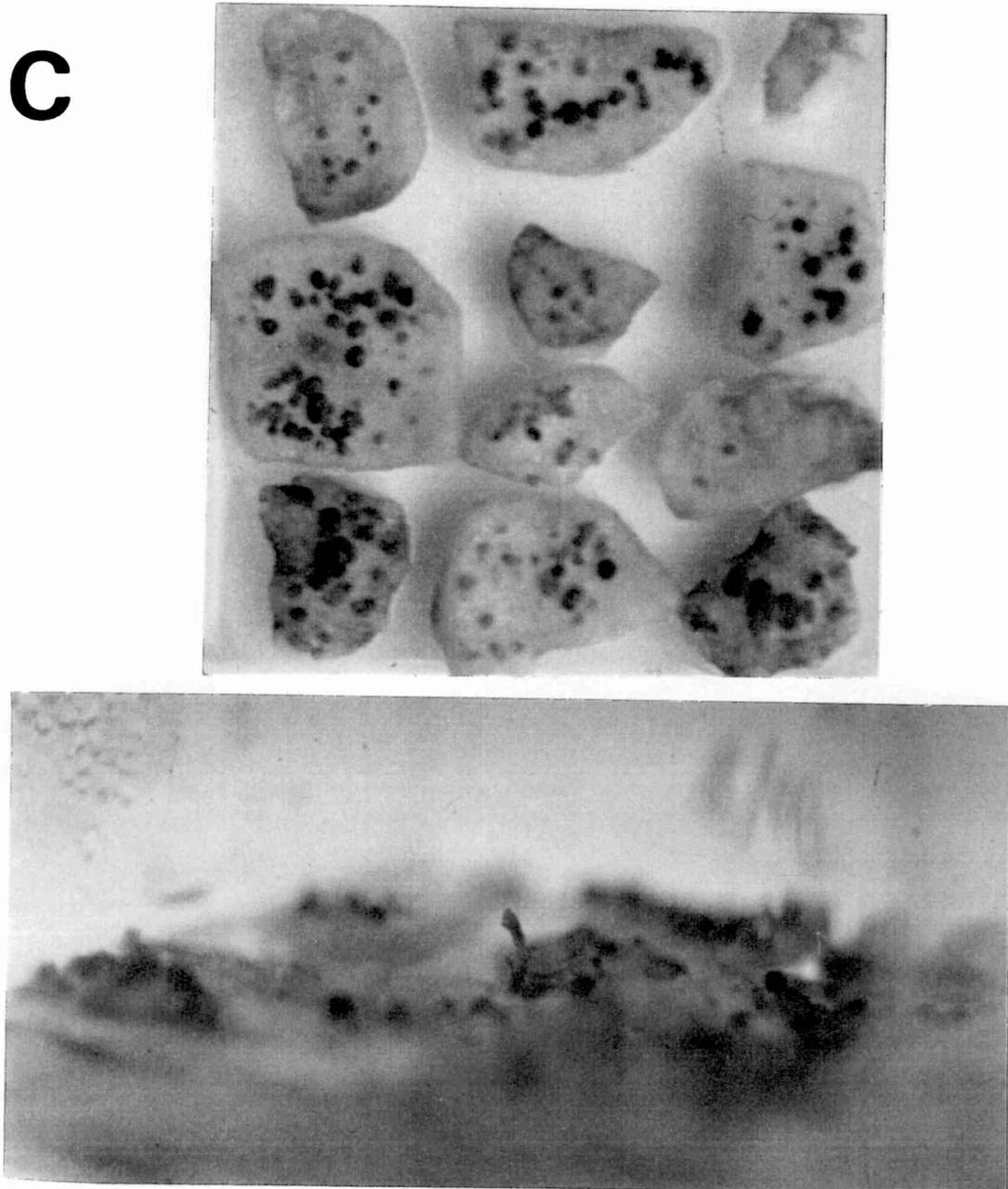


Figura 5.6. Distintos estadios en el proceso de obtención de las plantas transgénicas de papa (variedad Spunta).

C: explantos cocultivados con pBI-PVY, en medio selectivo contenido 50 mg/l de kanamicina, a los 15 días de iniciado el experimento. Se puede observar la aparición de microcallos sobre los mismos. **D:** discos cocultivados con pBI-PVY a los 30 días de iniciado el experimento, donde se observa la aparición de un brote sobre uno de ellos.

E



F

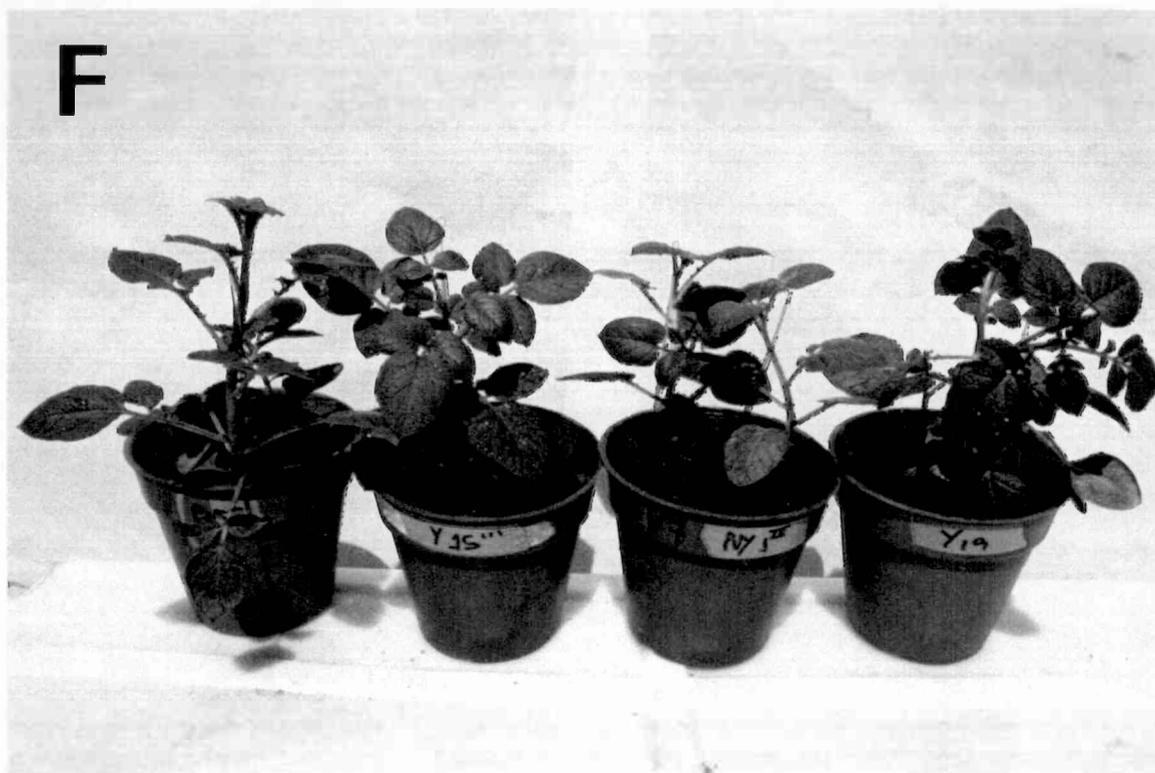


Figura 5.6. Distintos estadios en el proceso de obtención de las plantas transgénicas de papa (variedad Spunta).

E: enraizamiento de las microplantas en medio selectivo conteniendo kanamicina y libre de hormonas. **F:** plantas transgénicas de papa luego de 30 días de haber sido pasadas a tierra.

Resultados y Discusión

tos de tejidos, de un total de ocho plantas analizadas, tres dieron resultados positivos. En la Figura 5.7. se muestra una fotografía del resultado de este análisis. Como controles negativos y positivos del ensayo se utilizaron hojas y tubérculos de plantas de papa no transformadas y de plantas previamente transformadas y caracterizadas por la Lic. Silvia Cabral.

Ensayo de actividad de la enzima neomicina fosfotransferasa

Las plantas obtenidas fueron analizadas para verificar la presencia de actividad de neomicina fosfotransferasa. Todas las plantas analizadas fueron positivas en el ensayo, mientras que plantas control, no transformadas, dieron resultados negativos. En la Figura 5.8. se muestran los datos obtenidos al analizar once plantas.

Análisis de las plantas transgénicas mediante la técnica de PCR

Para poder verificar la presencia del transgen en un estadio temprano, las plantas obtenidas a partir del cocultivo con LBA4404(pBI-PVY), se analizaron mediante la técnica de PCR. Para ello se diseñó un par de oligonucleótidos complementarios a la región 3' del promotor 35S y a la zona 5' del gen de cápside capaces de amplificar una región de 400 bp del gen quimérico introducido. En la Figura 5.9.A. se muestra un esquema del transgen con la posición de los oligonucleótidos utilizados.

Empleando como molde unos 400 ng de DNA genómico obtenido de hojas, se pudo detectar la presencia de la banda esperada en 9 de 11 plantas analizadas. Como control negativo se utilizó DNA obtenido de plantas transformadas con pBI-121 y, como control positivo, 1 pg del plásmido pBI-PVY. En la Figura 5.9.B. se pueden

Resultados y Discusión

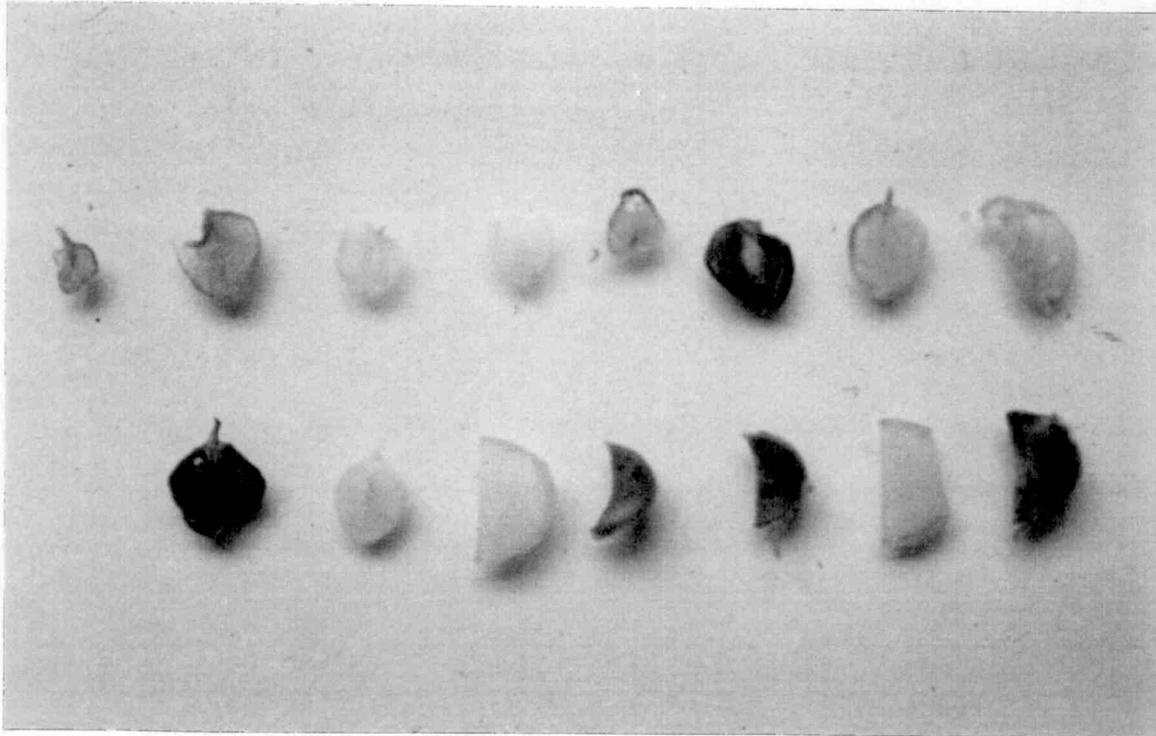
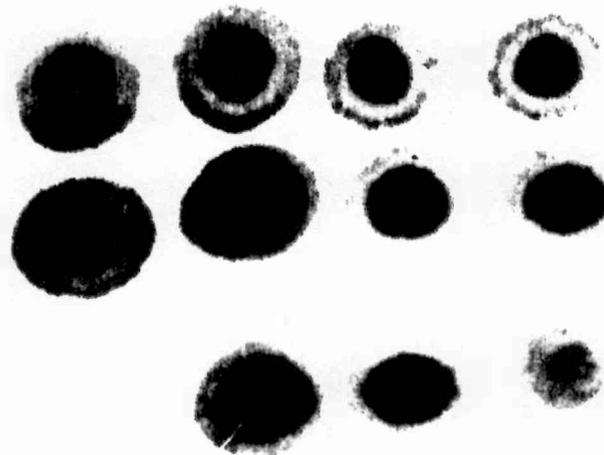


Figura 5.7. Ensayo de actividad de la enzima β -glucuronidasa. .
Se analizó la actividad de la enzima β -glucuronidasa, en hojas de las 8 plantas obtenidas de la transformación control con LBA4404 (pBI-121). Como sustrato utilizó X-Glu. Luego de decolorar los tejidos con etanol, se pudo observar la aparición de un precipitado azul sobre las muestras positivas. (ver Materiales y Métodos).
Línea superior: análisis de las plantas transgénicas. Línea inferior de izquierda a derecha: hojas transformadas y no transformadas y trozos de tubérculos transformados y no transformados obtenidos de plantas previamente caracterizadas.



(-)

Ensayo de NPTII

Figura 5.8. Ensayo de actividad de la enzima neomicina fosfo-transferasa

Se prepararon extractos de once plantas transformadas con LBA4404 (pBI-PVY) y de un control no transformado, los que se ensayaron para determinar la actividad de la enzima, tal como se indica en Materiales y Métodos. El autorradiograma obtenido mostró que las once plantas analizadas fueron positivas en el ensayo y en el control no se observó actividad alguna.

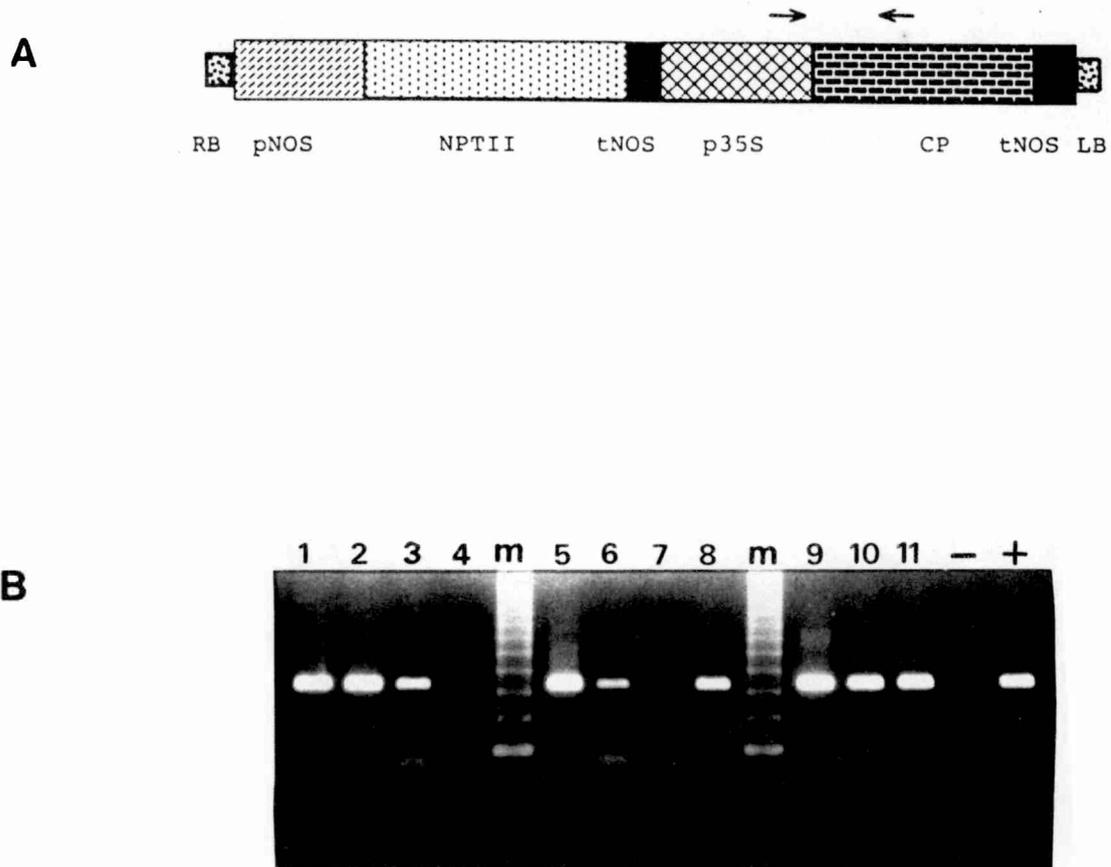


Figura 5.9. Caracterización de las plantas transgénicas mediante la técnica de PCR.

Aproximadamente 400 ng de DNA genómico, obtenido de hojas de las plantas a analizar y de una planta transformada con pBI-121 utilizada como control negativo, se sometieron a 35 ciclos de amplificación a 94°, 50° y 73°, durante un minuto a cada temperatura. **A:** esquema del transgen donde se muestra la posición de los oligonucleótidos utilizados en la reacción. **B:** Productos de la reacción analizados en un gel de agarosa de 1,2 %, teñido con bromuro de etidio. 1-11: plantas analizadas - : control negativo. +: control positivo. m: marcador de peso molecular, *ladder* de 123 bp.

observar los productos de la reacción de PCR, resueltos en un gel de agarosa de 1,2 %.

Análisis de las plantas mediante la técnica de *Western-blot*

Un lote de plantas transformadas y uno control se analizaron por medio de la técnica de *Western-blot* para constatar la presencia de la proteína quimérica en los tejidos de las mismas. Con este fin, se prepararon extractos de proteínas solubles de hojas y se determinó la concentración de las mismas mediante la técnica de Bradford. Se sembraron luego 40 µg de proteínas en cada uno de los carriles de un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12,5 %. Para estimar los niveles de expresión se incluyeron en el gel diluciones de concentración conocida de viriones de PVY en 40 µg de proteínas de hojas de plantas no transformadas. Luego de la transferencia a nitrocelulosa se reveló utilizando anticuerpos específicos para PVY. Los resultados se muestran en la Figura 5.10. En las plantas transformadas el nivel de expresión de la proteína de cubierta viral osciló entre 0 y 0,025% de las proteínas solubles.

Discusión

Con el objeto final de obtener plantas de papa resistentes al virus PVY, se construyó un gen quimérico de cápside bajo la dirección del promotor del transcripto 35S del CaMV y señales de terminación del gen de nopalina sintetasa. Utilizando esta construcción y el plásmido pBI-121, se obtuvieron 34 plantas de papa luego del cocultivo con LBA4404(pBI-PVY) y 8 plantas luego del cocultivo con LBA4404(pBI-121). El fenotipo de resistencia a ka-

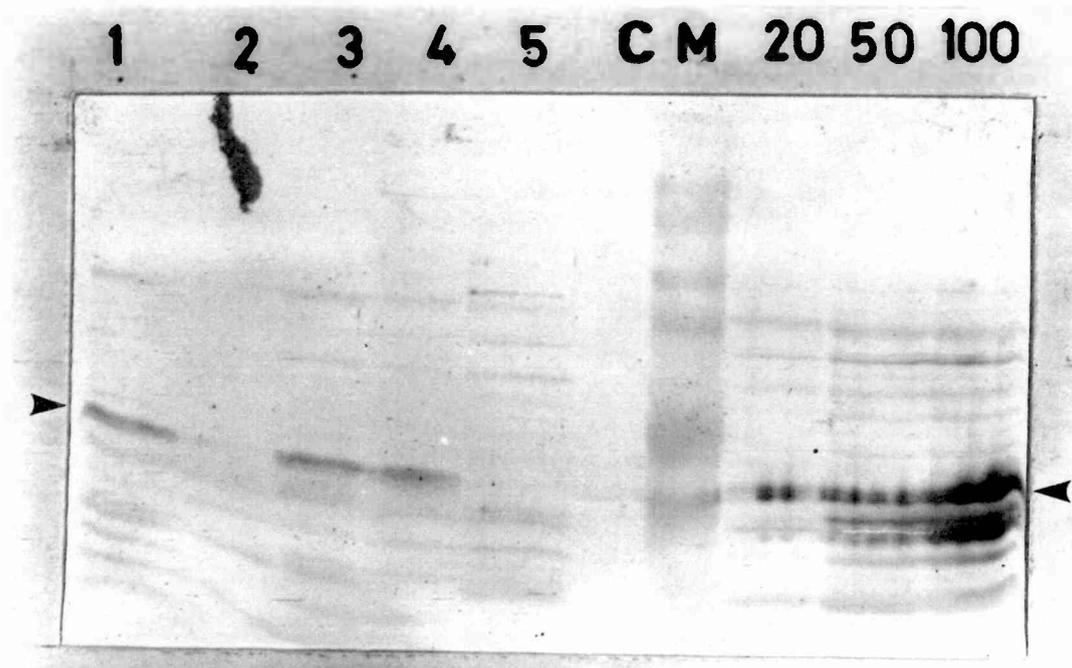


Figura 5.10. Análisis de plantas transgénicas mediante la técnica de *Western-blot*

Proteínas totales de hojas (40 μ g), extraídas de plantas transformadas con la proteína quimérica de cápside, fueron resueltas en un gel de SDS-poliacrilamida de 12,5 % y se transfirieron a nitrocelulosa. La proteína de cubierta se detectó utilizando anticuerpos anti-PVY. Como control negativo (C) se utilizaron 40 μ g de proteínas totales de hojas de planta no transformada y como control positivo 100, 50, y 20 ng de PVY purificado, mezclados con 40 μ g de proteínas de hojas de plantas no transformadas. 1-5 plantas transgénicas analizadas. M: marcador de peso molecular. Las flechas indican las bandas correspondientes a las proteínas de cápside del virus en las plantas analizadas y en los controles. En estos últimos se ven también productos de degradación.

Resultados y Discusión

namicina, evidenciado por el desarrollo de las plantas en medio selectivo, fue confirmado mediante la detección del producto de expresión del gen NPTII en todas las plantas analizadas. La técnica de PCR permitió detectar en estadios tempranos del desarrollo la presencia del transgen en un 80 % de las plantas analizadas. Finalmente, utilizando técnicas inmunológicas se pudo detectar la presencia de la proteína de cápside, en tres de cinco plantas transgénicas, lo que sugeriría que el gen se expresa de manera detectable en un 60 % de las plantas. En tres de las plantas estudiadas el nivel de expresión oscila alrededor del 0,025 % de las proteínas totales solubles de hoja.

La construcción quimérica desarrollada posee, además de otras secuencias, un sitio de clivaje específico para la proteasa NIa codificada por el propio virus. Este sitio de clivaje, cuya secuencia es YEVHHQ/A, se encuentra situado entre el gen de la replicasa viral y el gen correspondiente a la cápside. De esta forma, el resultado esperado al introducir esta quimera en las plantas, es obtener protección por medio de un doble mecanismo:

- 1- Por titulación de la acción de la proteasa NIa del virus ingresante al actuar sobre la quimera y
- 2- Por protección mediada por cápside al liberarse la cápside contenida en la quimera, mecanismo que ya ha sido demostrado para éste y otros sistemas hospedante-patógeno.

Los experimentos futuros estarán orientados a estudiar los niveles de resistencia y las características agronómicas de las plantas transformadas, en ensayos de infección de las plantas transgénicas con cantidades conocidas de virus.

Conclusiones

Conclusiones

El control de las virosis en plantas es una tarea que requiere de un esfuerzo colectivo y coordinado. No existe una solución definitiva para el problema, ya que estos patógenos evolucionan rápidamente y, por lo tanto, es necesario el desarrollo constante de medidas de control. Estas incluyen alternativas muy variadas y es necesario el uso integral de las mismas. Las más importantes son:

- Obtención de variedades resistentes mediante mejoramiento clásico.
- Control de los vectores que transmiten a los virus.
- Producción de semillas libres de virus.
- Identificación y eliminación de las fuentes de virus.
- Obtención de plantas transgénicas resistentes.

Para poder alcanzar estos objetivos, es de fundamental importancia, contar con diferentes métodos de diagnóstico que permitan identificar correctamente a los virus que afectan un determinado cultivo.

El mejoramiento de la papa mediante las técnicas clásicas ha permitido la obtención de cultivares de buenas características agronómicas. Sin embargo este proceso demanda mucho tiempo y es sumamente laborioso, en particular para especies como ésta, cuyo genoma es tetraploide y donde luego de cada cruzamiento se pierden con frecuencia caracteres de la variedad original.

En este trabajo de tesis hemos utilizado las técnicas de la ingeniería genética y el cultivo de tejido con el fin de contribuir al control de la infección producida por el virus PVY por nuevos métodos biotecnológicos.

La primera parte del trabajo consistió en la purificación y clonado del virus, lo que nos permitió contar con la secuencia correspondiente a la cápside. Esta fue caracterizada y utilizada

Conclusiones

como una sonda de hibridación molecular, lo que permitió desarrollar nuevos sistemas de diagnóstico, más sensibles que los tradicionalmente usados.

En nuestra experiencia, si bien las sondas de cDNA permiten mayores niveles de detección que los métodos inmunológicos, su introducción en el diagnóstico masivo se ve limitada por la necesidad de utilizar protocolos de preparación de la muestra de relativa complejidad para mantener la integridad del RNA. En un intento por superar esta dificultad, se desarrolló el *squash-blot molecular hybridization* con sondas radioactivas, habiéndose obtenido resultados satisfactorios. Sin embargo, al intentar hacer extensiva esta técnica para su utilización con sondas no radioactivas, se encontraron numerosos problemas relacionados con la aparición de reacciones inespecíficas y con el descenso de la sensibilidad. Estas dificultades no pudieron ser superadas hasta el momento. Sin embargo, es posible que esta situación se modifique en el futuro con la introducción de nuevos métodos de marcación no radioactiva y de nuevas alternativas de preparación de las muestras.

A pesar de lo comentado anteriormente, los métodos basados en la hibridación molecular pueden adecuarse fácilmente a situaciones en que el número de análisis a realizar no es grande, y en que es importante una mayor rigurosidad en la detección, como por ejemplo, la certificación de material de élite o la caracterización de material vegetal destinado al mejoramiento. Una posibilidad, no explorada, en esta tesis es utilizar para estos fines sondas de oligonucleótidos o reacciones de PCR.

Por otra parte las sondas de hibridación molecular mantienen sus ventajas relativas en los casos de patógenos que no poseen proteínas de cubierta, como los viroides, o en el caso de virus que se hallan presentes en muy bajo nivel en los tejidos, y que, por ende, son muy difíciles de detectar.

Conclusiones

Dado que los métodos inmunológicos se encuentran ya bien establecidos en el caso de los virus de papa, decidimos utilizar las técnicas de DNA recombinante con el fin de simplificar y abaratar el proceso de producción de anticuerpos. La expresión de la cápside de PVY en *E.coli* nos permitió contar con cantidades suficientes de la misma para su inoculación en conejos. Ello permitió obtener anticuerpos específicos sin necesidad de purificar viriones a partir de material vegetal. Esta estrategia podría extenderse a otros virus difíciles de purificar, pero que podrían ser clonados con relativa facilidad. Además, este procedimiento permitiría contar con antígenos de calidad homogénea y controlada. Una variante de ésta estrategia, que se está desarrollando actualmente en el laboratorio, es expresar determinadas regiones de las cápsides (o de proteínas no estructurales presentes en abundancia) para obtener repertorios más acotados de anticuerpos policlonales. Esto puede resultar ventajoso, pues equivaldría a disponer de anticuerpos de especificidad intermedia entre los mono y los policlonales habitualmente utilizados.

Utilizando parte de la experiencia adquirida para desarrollar sondas moleculares, se puso a punto un nuevo método de diagnóstico inmunológico, que denominamos *squash-blot immunoassay* (SBIA). Esta técnica demostró, a los fines prácticos, poseer una sensibilidad igual a la de ELISA, simplificando notablemente la toma de muestras. Esto redundó en un incremento significativo de la eficiencia del trabajo del operador, adaptándose ventajosamente a la realización de muestreos masivos. Por otra parte, por la simpleza del método y por la naturaleza de los materiales empleados, el SBIA demostró ser sensiblemente más económica que el ELISA y, por esta razón, más adaptable a laboratorios con bajo nivel de equipamiento.

Paralelamente al desarrollo y perfeccionamiento de las técnicas de diagnóstico, decidimos encarar la obtención de resistencia en plantas de papa por métodos de ingeniería genética. Para

Conclusiones

ello se decidió adoptar una estrategia ya probada para éste y otros sistemas virus-planta, la de protección mediada por la cápside viral. En un porcentaje de las plantas transgénicas obtenidas ha sido demostrada ya la expresión de la proteína quimérica, y se espera efectuar pronto los ensayos de resistencia a nivel de invernáculo. Una vez definidas las plantas piloto, se proseguirá con ensayos de campo, en los que se constatarán el nivel de resistencia adquirida y la conservación de las características agronómicas del cultivar.

Si bien los primeros ensayos a campo con plantas transformadas en forma similar han dado resultados muy alentadores, es esperable que esta estrategia de resistencia sea eventualmente sobrepasada por nuevas cepas virales. Por esta razón, la protección de plantas por medios de ingeniería genética debería tener en cuenta el desarrollo paralelo de otras estrategias, capaces de inhibir las infecciones virales en distintos puntos del ciclo replicativo. Es de suponer que la utilización simultánea de varios mecanismos de protección, que afecten diferentes funciones esenciales, introducirá barreras muy difíciles de sortear por el patógeno. La búsqueda de estrategias alternativas de protección ha comenzado a desarrollarse ya en el laboratorio. Otra posible alternativa a desarrollar por ingeniería genética es el clonado de genes naturales de resistencia para su posterior introducción en las variedades susceptibles. En el caso de PVY, se ha descrito la existencia del gen Ry, pero los trabajos encaminados a su aislamiento se encuentra todavía en una etapa inicial.

Finalmente, está previsto, en colaboración con el Instituto de Biología Molecular del INTA-Castelar, continuar con esta línea de trabajo obteniendo, por transformaciones sucesivas, plantas dobles y triples transgénicas resistentes a los virus PVY, PVX y PLRV.

Bibliografía

Bibliografía

- Abel P. P., Nelson, R. S., De. B., Hoffmann, N., Rogers, S. G. et al. 1986, Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232:738-43
- Allison, R., Johnston, R. E., Dougherty, W. G. 1986. The nucleotide sequence of the coding region of tobacco etch virus genomic RNA: evidence for the synthesis of a single polyprotein. *Virology* 154:9-20
- Allison, R.F., Doughety, W.G., Parks, T.D., Willis, L., Johnston, R.E., Kelly, M.E., and Armstrong, F.B. 1985a. Biochemical analysis of the capsid protein gene and capsid protein of tobacco etch virus: N-terminal aminoacids are located on the virion's surface. *Virology* 147:309-316.
- Allison, R.F., Sorenson, J. C., Kelly, M. E., Armstrong, F.B., and Doughety, W. G. 1985b. Sequence determination of the capsid protein gene and flanking regions of tobacco etch virus: Evidence for the synthesis and processing of a polyprotein in potyvirus genome expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:3969-3973.
- Atreya, P, Atreya, C. and Pirone, T. 1991. Aminoacid substitution in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:7887-7891.
- Bar-Joseph M, Segev D, Blicke W, Yesodi V, Franck A, and Rosner A. 1986. Application of synthetic DNA probes for the detection of viroids and virus Pages 13-23 in: *Developments and Applications in Virus Testing*. R.A.C. Jones, and L. Torrance, eds, The Lavenham Press Ltd., Lavenham, Sudbury, Great Britain.
- Barker, R. F., Idler K. B., Thompson D. V., Kemp J. D. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Mol Biol* 2:335-350.
- Baron M. H. Baltimore D, 1982, Anti-VPg antibody inhibition of the poliovirus replicase reaction and production of covalent complexes of Vpg related proteins and RNA. *Cell* 30:745-52
- Beachy, R., Loesch-Freis, S., and Tumer, N. 1990. Coat Protein-mediated resistance against virus infection. *Ann. Rev. Phytopathol.* 28:451-474.
- Benton, W.D. y Davies, R.W. (1977) Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science* 196:180-182.

Bibliografía

- Birnboim, H.C. y Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523.
- Bos, L. 1982. Crop losses caused by viruses. *Crop protection* 1:263-282.
- Braun, A.C. 1958. A physiological basis for autonomous growth of crown gall tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 44:344-349.
- Braun, C.J. and Hemenway, C.L. 1992. Expression of amino terminal portions or a full-length viral replicase genes in transgenic plants confers resistance to potato virus X infection. *The Plant Cell* 4:735-744.
- Bravo-Almonacid, F. and Mentaberry, A. 1989. Nucleotide cDNA Sequence Coding for the PVY^o Coat Protein. *Nucl. Acids Res.* 17, 4401.
- Bravo-Almonacid, F. Haim, L. and Mentaberry A.N. 1992. Rapid immunological detection of potato viruses in plant tissue squashes. *Plant. Dis.* 76:574-578.
- Brown, F. 1986. The classification and nomenclature of viruses: Summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of viruses in Sendai, September, 1984. *Intevirology* 25: 141-143.
- Chilton MD, Drummond MH, Merlo DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW. 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells. *Cell* 11:263-271.
- Christie, R. G., Edwardson, J. R. 1977. Light and electron microscopy of plant virus inclusions. *Fla. Agric. Exp. Stn. Monogr. Ser.* IX. 150 pp.
- Citovsky V, Wong ML, Zambryski P. 1989. Cooperative interaction of *Agrobacterium* VirE2 protein with single stranded DNA: implications for the T-DNA transfer process. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:1193-1197.
- Clark, M.F., and Adams, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunoabsorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475-483.
- Cornuet, P. 1987 "Eléments de virologie végétale", I.N.R.A., Paris.

Bibliografía

Cuozzo, M. O'Connell, K.M., Kaniewski, W., Fang, R.X., Chua, N.H. and Tumer, N.E. 1988. *Biotechnology* 6:549-557.

De Cleene, M. and De Ley, J. 1976. The host range of crown gall. *Bot. Rev.* 42:389-466.

de Mejia, M. V. G., Hiebert, E., Putciful, D. E., Thornbury, D. W., Pirone, T. P. 1985, Identification of potyviral amorphous inclusion protein as a non-structural virus-specific protein related to helper component. *Virology* 142:34-43.

de Mejia, M. V. G., Hiebert, E., Purcifull, D. E. 1985. Isolation and partial characterization of the amorphous cytoplasmic inclusions associated with infections caused by two potyviruses. *Virology* 142:24-33

Domier, L. L., Franklin, K.M., Shahabuddin, M., Hellman, G. M., Overmeyer, J. H., Hiremath, S. T., Siaw, M. E. E., Lomonosoff, G. P., Shaw, J. G., and Rhoades, E. 1986. The nucleotide sequence of tobacco vein mottling virus. *Nucleic Acids Res.* 14:5417-5430.

Domier, L.L., Shaw, J.G., and Rhoades, E. 1987. Potyviral proteins share amino acid sequence homology with picorna-, como-, and caulimoviral proteins. *Virology* 158:20-27.

Dougherty W. and Lindbo J. 1992. Pathogen derived resistance to a potyvirus: Immune and resistant phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. *Mol. Plant Microbe Interact.* 5:144-153.

Dougherty, W. G., and Carrington, J.C. 1988. Expression and function of potyviral gene products. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26: 123-143.

Dougherty, W. G., Hiebert, E. 1980. Translation of potyviral RNA in a rabbit reticulocyte lysate: identification of nuclear inclusion proteins as products of tobacco etch virus RNA translation and cylindrical inclusion protein as a product of the potyvirus genome. *Virology* 104:174-82

Dougherty, W. G., Willis L. Johnston W. E. 1985. Topographic analysis of tobacco etch virus capsid protein epitopes. *Virology* 144:66-72

Dougherty, W.G., Allison, R.F., Parks, T.D., Johnston, R.E., Feild, M.J., and Armstrong, F.B. 1985a. Nucleotide sequence at the 3-terminus of pepper mottle virus genomic RNA: Evidence for an alternative mode of capsid protein gene organization. *Virology* 146:282-291.

Bibliografia

- Dougherty. W. G. 1983. Analysis of viral RNA isolated from tobacco leaf tissue infected with tobacco etch virus. *Virology* 131:473-81
- Douglas CJ, Staneloni RJ, Rubin RA, Nester EW. 1985. Identification and genetic analysis of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. *J Bact* 161:850-860.
- Edwardson, J, R, Christie, R. G. 1984. Potyvirus cylindrical inclusions-subdivision-IV. *Phytopatology* 74:1111-14.
- Feimberg A., and Vogelstein, B. 1983. A technique for radio-labelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132:6-13.
- Fraley, R.T, Rogers, S. and Horsch, R.B. 1986. Genetic transformation in higher plants. *CRC Crit. Rev. Pant Sci.* 4:1-46.
- Francki, R.I.B., Milne, R.G., and Hatta, T. 1985. "Atlas of plant viruses," Vols. 1 and 2. CRC Press, Boca Raton, Florida
- Fulton, R.W. 1986. Practices and precautions in the use of cross protection for plant virus disease control. *Annu.Rev. Phytopathol* 24:67-81.
- Golemboski, D., Lomonosoff, G. and Zaitlin, M. 1990. Plants transformed with a tobacco mosaic virus non-structural gene sequence are resistant to the virus. *Proc Natl Acad Sci.* 87:6311-6315.
- Gorbalenya A. and Koonin E. 1989. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 17:4713-4730
- Gordon-Kamm, W.J., Spencer T.M., Mangano M.L., Adams T.R., Daines R. J., Start W.G., O'Brien J.W., Chambers S.A., Adams W.R., Willetts N.G., Rice T.B., Mackey C.J., Krueger Ro.W., Kausch, A.P. and Lemaux P.G. 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *The Plant Cell* 2:603-618.
- Grunstein M, Hogness D (1975). Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNA's that contain a specific gene. *Proc Natl Acad Sci.* 72:396-399.
- Gubler U, Hoffman BJ. 1983. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25:263-269.

Bibliografía

- Gugerli, P. 1979. Le test immuno-enzymatique (ELISA) et son application pour le diagnostic rapide des virus de la pomme de terre. *Rev. Suisse Agric.* 11:253-260.
- Gugerly, P. 1978. The detection of two potato viruses by enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). *Phytopathol. Z.* 92:2 51-56.
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *Escherichia coli*. En: DNA cloning. A practical approach. (eds: Glover, D.M.) 1:109-135.
- Hari, V. 1981, The RNA of tobacco etch virus: further characterization and detection of a protein linked to the RNA *Virology* 112: 391-99
- Harrison B, Robinson D, Mowat W and Duncan G. 1983. Comparison of nucleic acid hybridization and other tests for detecting tobacco rattle virus in narcissus plants and potato tubers. *Ann. Appl. Biol.* 102:331-338
- Hawkes, R., Niday, E., and Gordon J. 1982. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Annal. Biochem.* 119: 142-147.
- Hellmann, G. M., Shaw, J. G., Lesnaw J. A., Chu, Lee-Yun, Pirone, T, P., Rhoads. R. E. 1980. Cell-free translation of vein mottling virus RNA. *Virology* 106:206-16
- Hellmann, G. M., Thornbury, D. W., Hiebert, E., Shaw, J. G., Pirone, T. P., Rhoads, R. E. 1983. Cell-free translation of tobacco vein mottling virus RNA. II. Immunoprecipitation of products by antisera to cylindrical inclusion, nuclear inclusion, and helper proteins, *Virology* 124:434-44
- Hemenway, C., Fang, R.X., Kaniewski, J.J., Chua, N.H. and Tumer, N.E.. 1988. Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. *EMBO J.* 7:1273-1280.
- Hernalsteens JP, Van Vliet F, De Beucheleer M, Depicker A, Engler G. 1980. The *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid as a host vector system for introducing foreign DNA in plant cells. *Nature* 287:654-656.
- Herrera-Estrella A, Van Montagu M, Wang K. 1990. A bacterial peptide acting as a plant nuclear targeting signal: the amino-terminal portion of *Agrobacterium VirD2* protein directs a β -galactosidase fusion protein into tobacco nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9534-9537.

Bibliografía

Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. **Nature** 303:179-180.

Hoekema, A. Huisman, M.J. Molendijk, L. van den Elzen, P.J.M. and Cornelissen, B.J.C. 1989. The genetic engineering of two commercial potato cultivars for resistance to potato virus X. **Bio/Technology** 7:273-278.

Hoollings, M., Brunt, A. A. 1981. Potyviruses, In Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis, ed. E. Kurstak, pp, 732-77. New York: Elsevier North Holland Biomedical. 943 pp.

Hooykaas, P.J.J. 1989. Transformation of plants via *Agrobacterium*. **Plant Molecular Biology** 13:327-336.

Hopp, H.E., Giavedoni, L., Mandel, M.A., Arese, A., Orman, B., Bravo-Almonacid, F., Torres, H.N., and Mentaberry, A.N. 1988. Biotynilated nucleic acid hybridization probes for potato virus detection. **Arch. Virol.** 103:231-241.

Hopp, H.E., Haim, L., Bravo Almonacid, F., Tozzini, A.C., Orman, B., Arese, A.I., Ceriani, M.F., Saladrigas, V., Celnik, R., del Vas, M., and Mentaberry, A. 1991. Development and application on a radioactive nucleic acid hybridization system for simultaneous detection of four potato pathogens. **J. Virol. Methods** 31:11-30.

Huttinga, H., and Mosch, W.H.M. 1974. Properties of viruses of the potyvirus group. 2. Buoyant density, S value, particle morphology, and molecular weight of the coat protein subunit of bean yellow mosaic virus, pea mosaic virus, lettuce mosaic virus and potato virus Y. **Neth. J. Plant Pathol.** 80:19-27.

Huynt, T.V., Young, R.A. y Davis, R.W. Constructing and screening cDNA libraries in λ gt10 and λ gt11. In: D.M. Glover ed. DNA cloning techniques: a practical approach. Oxford: IRL Press, 1985: 45-79.

Jefferson, R.A. 1987. **Plant Mol. Biol. Rep.** 5:387-405

Jongedijk, E., de Schutter, A.J.M., Solte, T., van den Elzen, J.M. and Cornelissen, B.J.C. 1992. Increased resistance to potato virus X and preservation of cultivar properties in transgenic potato under field conditions. **Bio/Technology** 10:422-429.

Klee, H.J. and Rogers, S.G. 1989. Plant gene vectors and genetic transformation: Plant transformation systems based on the use of *Agrobacterium tumefaciens*. En: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. I. Vasil (ed.) vol. 6:1-23.

Bibliografía

Klein, T.M., Fromm, M.E., Weissinger A., Tomes, D., Schaaf, S., Sletten, M. and Sanford, J.C. 1988. Transfer of foreign genes into intact maize cells using high velocity microprojectiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:4305-4309.

Klein, T.M., Wolf E.D., Wu, R. and Sanford, J.C. 1987. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327:70-73.

Lain S, Martin MT, Riechmann JL, Garcia JA. 1991. Novel catalytic activity associated with positive-strand RNA virus infection : nucleic acid-stimulated ATPase activity of the plum pox potyvirus helicase-like protein. *Journal of virology* 65:1-6

Lawson C. Kaniewski W. Haley L. Rozman R. Newell C. Sanders P. Tumer NE. 1990. Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank *Bio/technology* 8:127-134.

Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M., Boedtke, H. (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical examination. *Biochemistry* 16: 4743.

Lin, N.S., Hau, Y.H., and Hsu, H.T. 1990. Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathology* 80:824-828.

Loesch-Fries, L.S., Merlo, D., Zinnen, T., Burhop, L., Hill, K., Drahm, K., Jarvis, N. Nelson, S. and Halk, E. 1987. Expression of alfalfa mosaic virus RNA 4 in transgenic plants confers virus resistance. *EMBO J.* 6:1845-1851.

Maiss E., Timpe U., Briske, A., Jelkmann, W., Casper, R., Himmler, G., Mattanovich, D. and Katinger, H.W.D. 1989. The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA. *J. Gen. Virol.* 70:513-524.

Maniatis T, Frisch EF, Sambrook J (1982). *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Matthews, R.E.F. 1982. Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Committee on Taxonomy of viruses. *Intervirology* 17:1-199.

Maule A. Infection of protoplasts from several *Brassica* species with cauliflower mosaic virus following inoculation with polyethylene glycol. 1983. *J. Gen. Virol.* 64:2655-2660

Bibliografía

- Mc Kinney H. 1929. Mosaic diseases in the Canary Island, West Africa and Gibraltar. *J. Agric. Res.* 39:557-578
- Mc. Donnell, R. E. 1987. *Plant Molec.Biol.Rep.* 5:380-386
- McCabe, D.E., Marinell, B.J. and Cristou, P. 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max.*) plants. *Bio/Technology* 87: 923-926.
- Morrow, C. D., Navab, M., Peterson. C., Hocko, J., Dasgupta, A. 1984. Antibody to poliovirus genome-linked protein (VPg) precipitates in vitro synthesized RNA attached to Vpg-precursor polypeptide(s). *Virus Res.* 1:89-100
- Murashige, T. 1962. *Physiol. Plant* 15:473-477.
- Murphy J.F., Rhoads R.E., Hunt A.G. and Shaw J.G. 1990. The VPg of tobacco etch virus RNA is the 49 Kd proteinase or the N-terminal 24 Kd part of the proteinase. *Virology* 178:285-288
- Navot, N., Ber, R., and Czosnek, H. 1989. Rapid detection of tomato yellow leaf curl virus in squashes of plants and insect vectors. *Phytopathology* 79:562-568.
- Nelson R, Powel Abel P, and Beachy R. 1987. Lesions and virus accumulation in inoculated transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of tobacco mosaic virus. *Virol.* 158:126-132.
- Owens R and Dinener. 1984. Spot hybridization for detection of virus and viroids. *Methods Virol.* 7:173-187.
- Pirone, T. P., Thornbury, D. W. 1983. Role of the virion and helper component in regulating aphid transmission of tobacco etch virus. *Phytopatology* 73:872-75
- Potrikus, I. 1991. Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:205-225.
- Powell, A.P., Nelson, R.S., De, B., Hoffman, H., Rogers, S.G., Fraley, R.T. and Beachy, R.N. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232:738-743.
- Rabinowicz, P., Bravo-Almonacid, F. and Mentaberry, A. 1992. Nucleotide cDNA Sequence Coding for the Pepper Severe Mosaic Virus Coat Protein. (enviado para su publicación a *J. of Gen. Virol.*)

Bibliografía

Ravelonandro, M., Varveri, C., Delbos, R., and Dunez, J. 1988. Nucleotide sequence of the capsid protein gene of plum pox potyvirus. *J. Gen. Virol.* 69:1509-1516.

Register J III and Beachy R. 1988. Resistance in TMV in transgenic plants results from interference with an early event in infection. *Virology* 166:524-532.

Rhodes, C.A., Lowe, K.S. and Rudy, K.L. 1988b. Plant regeneration from protoplast isolated from embryonic maize cultures. *Bio/Technology* 6:56-60.

Rhodes, C.A., Pierce, D.A., Mettler, I.J., Mascarenhas, D. and Detmer, J.J. 1988a. Genetically transformed maize plants from protoplast. *Science* 240:204-207.

Robaglia, C., Durand-Tardiff, M., Tronchet, M., Boudazin, G., Astier-Manifacier, S. and Casse-Delbart, F. 1989. Nucleotide sequence of potato virus Y (N strain) genomic RNA. *J. Gen. Virol.* 70:935-947.

Sanford, J.C. and Johnston, S.A. 1985. The concept of parasite-derived resistance: deriving resistance genes from the parasites own genome. *Theor. Biol.* 113:395-405.

Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.

Saul, M.W., Shillito, R.D. and Negrutiu, I. 1988. Direct DNA transfer to protoplasts with and without electroporation. *Plant Molecular Biology Manual A1*, 1-16.

Shillito, R.D., Saul, M.W., Paszkowski, J., Muller, M. and Potrykus, I. 1985. High efficiency direct gene transfer to plants. *Bio/Technology* 3:1099-1103.

Shukla, D. D., Gough, K. H., and Ward C. W. 1987. Coat protein of potyviruses. 3. Comparison of aminoacid sequences of the coat proteins of four Australian strains of sugarcane mosaic virus. *Arch. Virol.* 96:59-74.

Shukla, D.D., and Ward, C.W. 1988. Aminoacid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the potyvirus group. *J. Gen. Virol.* 69:2703-2710.

Shukla, D.D., Inglis, A.S., McKern, N.M., and Gough, K.H. 1986. Coat protein of potyviruses. 2. Amino acid sequence of coat protein of potato virus Y. *Virology* 152:118-125.

Bibliografia

Shukla, D.D., McKern, N.M., and Ward, C.W. 1988d. Coat protein of potyviruses. 5. Symptomatology, serology and coat protein sequences of three strains of passion-fruit woodiness virus. *Arch. Virol.* 102:221-232.

Shukla, D.D., Strike, P.M., Tracy, S.L., Gough, K.H., and Ward, C.W. 1988b. The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. *J. Gen. Virol.* 69:1497-1508.

Shukla, D.D., Thomas, J.E., McKern, N.M., Tracy, S.L., and Ward, C.W. 1988c. Coat protein of potyviruses. 4. Comparison of biological properties, serological relationships and coat protein amino acid sequences of four strains of potato virus Y. *Arch. Virol.* 102:207-219.

Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.

Stachel S. y Zambryski P. 1986. *VirA* and *VirG* control the plant induced activation of the T-DNA transfer process of *Agrobacterium tumefaciens*. *Cell* 46:325-333.

Tempe, J. and Petit, A. 1982. Opine utilization by *Agrobacterium*, in: *Molecular Biology of Plant Tumors*, Kahl, G. and Schell, J. (eds.) Acad. Press, New York. pp 451-462.

Teycheney, P.Y., Tavert, G., Delbos, R., Ravelonandro, M. and Dunez, J. 1989. The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA (strain D). *Nucl. Acids Res.* 17:10115-10116.

Tomes, D.T., Ross, M., Higgins, R., Rao, A.G., Staebell, M. and Howard, J. 1990. Direct DNA transfer into intact plant cells and recovery of transgenic plants via microprojectile bombardment. *Plant Molecular Biology Manual* A13:1-22.

van Larebeke N, Genetello C, Schell J, Schilperoort RA, Hermans AK, Hernalsteens JP, Van Montagu M. 1975. Acquisition of tumor-inducing ability by non oncogenic agrobacteria as a result of plasmid transfer. *Nature* 255:742-743

Van Regenmortel, M.H.V. 1982 "Serology and Immunochemistry of Plant Viruses", Acad. Press, New York.

Vance, V. B. , Beachy, R. N. 1984. Detection of genomic-length soybean mosaic virus RNA on polyribosomes of infected soybean leaves, *Virology* 138:26-36

Bibliografía

Vartapetian, A. B., Koonin, E. V., Agol, V.I., Bogdanov, A. A. 1984, Encephalomyocarditis virus RNA synthesis in vitro is protein-primed, *EMBO J.* 3:2593-98

Yanisch-Perron C, Viera J, Messing J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119.

Yanofski MF, Porter Sg, Young C, Albright LM, Gordon MP, Nester EW. 1986. The *VirD* operon of *Agrobacterium tumefaciens* encodes a site specific endonuclease. *Cell* 47:471-477.

Zambryski P, Joss H, Genetello C, Leemans J, Van Montagu M, Schell J. 1983. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J* 2:2143-2150.

Zhang, W. and Wu, R. 1988. Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in plants. *Theor. Appl. Genet.* 76:835-840.

Bueno Almonacid

