

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**TRANSMISIÓN NATURAL POR PULGONES DE
POTYVIRUS: ENSAYOS DE INTERFERENCIA
APLICADOS AL CONTROL DE VIROSIS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

M^a Elisa Goytia Pasquín

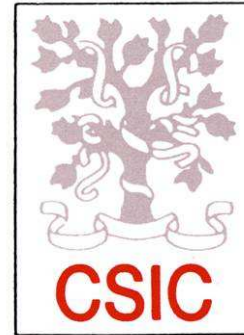
Bajo la dirección del doctor:
Juan José López-Moya Gómez

Madrid, 2007

ISBN: 978-84-669-3093-2



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DPTO. BIOQUÍMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DPTO. BIOLOGÍA DE PLANTAS

TRANSMISIÓN NATURAL POR PULGONES DE POTYVIRUS: ENSAYOS DE INTERFERENCIA APLICADOS AL CONTROL DE VIROSIS

TESIS DOCTORAL

M^a ELISA GOYTIA PASQUÍN
MADRID, 2007

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSDE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DPTO. DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR I**

**TRANSMISIÓN NATURAL POR PULGONES DE
POTYVIRUS: ENSAYOS DE INTERFERENCIA
APLICADOS AL CONTROL DE VIROSIS**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Biología por
M^a ELISA GOYTIA PASQUÍN

V^oB^o Director de la Tesis

Dr. D. Juan José López-Moya Gómez
Científico Titular
Instituto de Biología Molecular de Barcelona
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

M^a Elisa Goytia Pasquín

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas bajo la dirección del Dr. D. Juan José López-Moya Gómez, con la financiación de una beca del Plan Nacional de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia así como en la Universidad de Helsinki durante dos estancias breves financiadas con el mismo programa.

NOTA DEL AUTOR: Durante la redacción de esta tesis y con el fin de mantener la precisión de algunos términos y facilitar su entendimiento, se ha optado por utilizar algunos vocablos en el idioma original en que fueron acuñados. En algunos casos también se han castellanizado términos tal y como se emplean comúnmente en el lenguaje científico.

ÍNDICE

RESUMEN.....	VII
ABREVIATURAS.....	IX
AGRADECIMIENTOS.....	XII
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 TRANSMISIÓN DE VIRUS DE PLANTAS.....	1
<i>I.1.1 Tipos de transmisión de virus de plantas por insectos.....</i>	<i>2</i>
I.1.1.1 Transmisión persistente.....	3
I.1.1.2 Transmisión semipersistente.....	5
I.1.1.3 Transmisión no persistente.....	7
<i>I.1.2 Estrategias de transmisión de virus por pulgones.....</i>	<i>7</i>
I.2 TRANSMISIÓN NO PERSISTENTE DE POTYVIRUS POR PULGONES.....	8
I.2.1 Posición taxonómica y características de <i>Potyvirus</i>	8
I.2.2. Estructura y organización genómica del género <i>Potyvirus</i>	10
I.2.3 Expresión genómica y procesamiento de la poliproteína viral.....	11
I.2.4 Proteínas implicadas en transmisión de <i>Potyvirus</i> por pulgones.....	12
I.2.4.1 Proteína de la cápsida CP.....	12
I.2.4.2 Factor ayudante HC-Pro.....	14
I.2.5 Mecanismo de transmisión de <i>potyvirus</i> por pulgones: Hipótesis del puente.....	17
I.3 POTYVIRUS EMPLEADOS EN EL ESTUDIO.....	18
I.3.1 El virus de la Sharka.....	18
I.3.2 Virus del grabado del tabaco.....	20
I.4 LIMITACIONES EN EL ESTUDIO DE LA PROTEÍNA HC-Pro EN TRANSMISIÓN.....	20
I.4.1 Sistemas heterólogos de expresión de la proteína HC-Pro.....	22
I.5 MECANISMOS DE CONTROL DE TRANSMISIÓN DE POTYVIRUS.....	23
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	29

III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
III.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	33
III.1.1 Plantas.....	33
III.1.2 Pulgones.....	33
III.1.3 Bacterias.....	33
III.1.4 Levaduras.....	33
III.2 MANTENIMIENTO DE MICROORGANISMOS.....	34
III.3 MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	34
III.3.1 Inoculación de plantas con virus.....	34
III.3.2 Transformación de E. coli.....	35
III.3.3 Transformación de A. tumefaciens y agroinfiltración.....	35
III.3.4 Transformación de levaduras para ensayos de dos híbridos.....	36
III.4 VECTORES VIRALES Y VIRUS.....	37
III.5 PREPARACION DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	38
III.5.1 Purificación de DNA plasmídico.....	38
III.5.2 Obtención de RNA de plantas.....	39
III.5.2.1 RNA total.....	39
III.5.2.2 RNA de pequeño tamaño (sRNAs).....	39
III.6 MANIPULACION DE ACIDOS NUCLEICOS.....	39
III.6.1 Tratamientos enzimáticos en procesos de clonaje.....	39
III.6.2 Amplificación de DNA mediante PCR.....	40
III.6.3 Amplificación de secuencias de RNA por IC RT-PCR.....	40
III.6.4 Electroforesis en geles de agarosa y extracción de DNA de los mismos.....	41
III.6.5 Marcaje de DNA para la realización de sondas radiactivas.....	41
III.6.6 Detección de secuencias de RNA por hibridación de sondas radiactivas.....	41
III.6.6.1 RNA de alto peso molecular.....	41
III.6.6.2 RNA de pequeño tamaño.....	42
III.7 OLIGONUCLEÓTIDOS.....	43
III.7.1 Oligonucleótidos utilizados en procesos de clonaje de variantes de PPV no transmisibles y detección de los mismos.....	43
III.8 CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS.....	44
III.8.1 Clones infecciosos no transmisibles.....	44
III.8.2 Plásmidos para expresión transitoria.....	45
III.8.3 Plásmidos empleados en los ensayos de dos híbridos de levaduras (YTHS).....	46

III.9 MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS.....	50
III.9.1 Extracción de proteínas a partir de cultivos de <i>S. cerevisiae</i>.....	50
III.9.2 Electroforesis de proteínas.....	50
III.9.3 Inmunoelectrotransferencia.....	51
III.9.4 DASI ELISA.....	51
III.9.5. Análisis de interacción proteína-proteína mediante Far-Western blot.....	52
III.9.6 Coinmunoprecipitación de proteínas producidas <i>in vitro</i>.....	53
III.9.6.1 Producción de proteínas <i>in vitro</i>.....	53
III.9.6.2 Coinmunoprecipitación.....	53
III.10 PURIFICACION DE VIRUS Y PROTEÍNAS DE ORIGEN VIRAL.....	54
III.10.1 Purificación de partículas virales de PPV.....	54
III.10.2 Purificación de proteína HC-Pro de TEV.....	54
III.11 TRANSMISIONES.....	55
III.11.1 Transmisión de planta a planta.....	55
III.11.2 Transmisión mediante adquisición en membrana.....	55
III.11.3 Transmisión secuencial planta-membrana.....	56
III.11.4 Transmisión secuencial planta-planta.....	57
III.12 PROGRAMAS INFORMÁTICOS.....	57
III.12.1 Análisis estadístico.....	57
III.12.2 Estudios de predicción de la estructura secundaria de proteína CP de TEV.....	57

IV. RESULTADOS.....	59
IV.1 ESTUDIO DE INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEINA EN VARIANTES NO TRANSMISIBLES DEL POTYVIRUS TEV.....	61
IV.1.1 Estudio de interacción de HC-Pro de TEV consigo mismo y con la proteína de la cápsida mediante ensayos Far Western Blot.....	61
IV.1.2 Estudio de interacción de HC-Pro de TEV con la proteína de la cápsida del virus.....	67
IV.1.2.1 Estudio de la interacción de las variantes de HC-Pro de TEV con la proteína CP del virus mediante el sistema de dos híbridos de levaduras.....	67
IV.1.2.2 Estudio de la interacción de las diferentes proteínas de HC-Pro de TEV no transmisibles con la proteína CP del mismo virus mediante inmunoprecipitación de proteínas producidas in vitro.....	73
IV.1.3 Estudio de interacción de la proteína Hc-Pro DE TEV consigo misma.....	75
IV.1.3.1 Estudio de interacción del factor HC-Pro consigo mismo por el sistema de dos híbridos.....	75
IV.1.3.2 Estudio de interacción de HC-Pro de TEV consigo mismo por inmunoprecipitación de proteínas producidas in vitro.....	78
IV.2 DESARROLLO DE SISTEMAS EXPERIMENTALES ENFOCADOS AL ESTUDIO DE LA TRANSMISIÓN DEL POTYVIRUS PPV.....	79
IV.2.1 Generación y análisis de variantes no transmisibles de PPV por modificación de la región codificante de la proteína CP.....	80
IV.2.1.1 Infectividad y acumulación.....	80
IV.2.1.2 Transmisibilidad de PPV CP NAT en ensayos planta a planta.....	81
IV.2.2 Generación y análisis de variantes no transmisibles de PPV por modificación en la región codificante de la proteína HC-Pro.....	82
IV.2.2.1 Infectividad y acumulación.....	82
IV.2.2.2 Transmisibilidad en ensayos planta a planta.....	84
IV.3 PRODUCCIÓN DE HC-Pro DE PPV MEDIANTE EXPRESIÓN TRANSITORIA EN <i>N. benthamiana</i> y <i>N. tabacum</i>.....	84
IV.3.1 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA EN <i>N. benthamiana</i> y <i>N. tabacum</i>.....	85
IV.3.2 ANÁLISIS DE RNA MENSAJERO Y RNAS DE PEQUEÑO TAMAÑO (sRNAS).....	86
IV.3.2.1 Análisis de mRNA.....	86
IV.3.2.2 Análisis de sRNA.....	87

IV.4 ESTUDIOS DE FUNCIONALIDAD DE HC-PRO EXPRESADO	
TRANSITORIAMENTE EN ENSAYOS DE TRANSMISIÓN POR PULGONES.....	87
IV.4.1 Transmisión secuencial de virus purificado.....	88
IV.4.2 Transmisión de virus no transmisibles mediante complementación del	
factor HC-Pro.....	89
IV.4.2.1 PPV Quimera.....	89
IV.4.2.2 PPV EITC y PAK.	90
IV.5 ENSAYOS DE INTERFERENCIA EN LA TRANSMISIÓN DE PPV.....	92
IV.5.1 Estudios de interferencia empleando moléculas de HC-Pro modificadas	
expresadas por agroinfiltración.	92
IV.5.1.1 Ensayos de interferencia en experimentos con una única alimentación.....	92
IV.5.1.2 Ensayos de interferencia en experimentos con dos alimentaciones.	93
IV.5.2 Estudios de interferencia empleando virus no transmisibles.	94

V. DISCUSIÓN.....	99
V.1 ESTUDIO DE INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS EN VARIANTES NO TRANSMISIBLES DEL POTYVIRUS TEV.....	101
V.1.1 Estudio de interacción de HC-Pro de TEV consigo mismo y con la proteína de la cápsida mediante ensayos Far Western blot.....	101
V.1.2 Estudio de interacción de HC-Pro de TEV con la proteína de la cápsida del virus.....	102
V.1.3 Estudio de interacción de la proteína HC-Pro de TEV consigo misma.	106
V.2 GENERACIÓN Y ANÁLISIS DE VARIANTES NO TRANSMISIBLES DE PPV POR MODIFICACIONES EN LAS REGIONES CODIFICANTES DE LAS PROTEINAS CP Y HC-Pro.....	108
V.3 PRODUCCIÓN DE HC-Pro DE PPV MEDIANTE EXPRESIÓN TRANSITORIA EN N. benthamiana y N. tabacum.....	110
V.4 ESTUDIOS DE FUNCIONALIDAD DE HC-PRO EXPRESADO TRANSITORIAMENTE EN ENSAYOS DE TRANSMISIÓN.	113
V.5 ENSAYOS DE INTERFERENCIA EN LA TRANSMISIÓN DE PPV.....	116
VI CONCLUSIONES.....	123
VII	
BIBLIOGRAFIA.....	127

RESUMEN

En el presente trabajo se aborda el estudio de varios aspectos del mecanismo de transmisión de potyvirus por pulgones con especial atención a la búsqueda de posibles modos de interferir con el mecanismo y así facilitar nuevas herramientas en la protección de cultivos frente a potyvirus. También se ha profundizado en el estudio de los mecanismos moleculares que operan en este fenómeno y su implicación en la diseminación del virus.

Anteriores trabajos de nuestro laboratorio han desarrollado una serie de variantes del potyvirus TEV no transmisibles por pulgones. Uno de los primeros objetivos ha sido la búsqueda de la causa para la pérdida de transmisión de estos virus. Existen dos proteínas de origen viral implicadas en la transmisión de potyvirus por pulgones: la proteína de la cápsida o CP y el factor ayudante HC-Pro. La interacción entre ambas proteínas es una condición necesaria para que se produzca la transmisión del virus y el modelo más aceptado para explicar la transmisión es aquél en el que la proteína HC-Pro, posiblemente en alguna forma multimérica, actúa como puente entre el aparato bucal del insecto y la partícula viral. Durante el desarrollo de este trabajo se ha encontrado una modificación en la región amino terminal de la proteína de la cápsida de TEV que inhabilita la interacción entre CP y HC-Pro. Esta modificación además provoca la pérdida de transmisibilidad del clon completo infeccioso disponible en nuestro laboratorio, el clon TEV 7DA-CIB.

Los mutantes de TEV no transmisibles portan también mutaciones puntuales en la región codificante de la proteína HC-Pro. Hemos analizado si estos factores HC-Pro modificados interactúan con la proteína CP o consigo mismos. Anteriores trabajos han observado que la proteína HC-Pro activa en transmisión se encuentra en un estado de agregación al menos dimérico por lo que si la proteína no fuera capaz de interactuar consigo misma se perdería la capacidad de dimerización y por tanto la actividad en transmisión. Para llevar a cabo estos estudios se ha empleado la técnica de los dos híbridos de levaduras. La interacción de HC-Pro con CP no ha podido ser analizada con este sistema. Sin embargo, los estudios de interacción de las distintas variantes de HC-Pro consigo misma han mostrado que todas las variantes funcionales y no funcionales en transmisión interactúan consigo mismas. En los ensayos cuantitativos de la interacción se observa, sin embargo, una interacción más fuerte en los casos de las variantes de HC-Pro funcionales en transmisión que en las no funcionales, aunque estas diferencias no

son estadísticamente significativas y se desconoce si pueden reflejar algún efecto en la capacidad de transmisión.

En la búsqueda de estrategias para interferir con la transmisión de potyvirus por pulgones hemos trabajado con el virus de la Sharka PPV, virus de gran importancia económica por las pérdidas que genera en la producción de frutales de hueso en todo el mundo. Hemos desarrollado un sistema de expresión transitoria de HC-Pro de PPV que permite su expresión en el huésped *N. benthamiana* fuera del contexto de la infección viral y también permite la producción de proteínas HC-Pro alteradas y no funcionales en transmisión. La expresión de proteína fue analizada en dos huéspedes distintos: *N. benthamiana* y *N. tabacum*. La expresión de proteína HC-Pro ha sido detectada únicamente en el primero de ellos siendo los niveles de expresión de proteína en este sistema basado en *Agrobacterium* tanto o más elevados que los producidos por una infección sistémica de PPV en este huésped.

Para estudiar la actividad en transmisión de esta proteína expresada transitoriamente hemos generado tres clones completos infecciosos de PPV no transmisibles por pulgones introduciendo distintas modificaciones en la región codificante de la proteína CP así como del factor HC-Pro. Gracias a estos clones hemos podido demostrar la actividad en transmisión de la proteína expresada fuera del contexto de la infección viral mediante dos aproximaciones distintas. En ensayos de alimentación secuencial de pulgones la proteína HC-Pro de PPV expresada transitoriamente produjo valores de transmisión comparables a los generados en ensayos con proteína HC-Pro procedente de una infección viral. Sin embargo, en ensayos de transmisión de planta a planta de mutantes complementados con la proteína activa en transmisión, los valores obtenidos fueron inferiores a los de controles de virus PPV transmisible por pulgones.

Se ha empleado este sistema para producir proteína HC-Pro de PPV no funcional en transmisión y se ha ensayado la capacidad de la misma para interferir en el proceso sin observar una reducción significativa de los valores de transmisión por ninguna de las estrategias ensayadas. Asimismo se ha probado a interferir la transmisión de virus activo mediante infecciones mixtas con virus no transmisible sin obtener de nuevo una reducción significativa de la tasa de transmisión.

ACRÓNIMOS DE VIRUS CITADOS

AMV	Virus del mosaico de la alfalfa (<i>Alfalfa mosaic virus</i>)
CaMV	Virus del mosaico de la coliflor (<i>Cauliflower mosaic virus</i>)
CMV	Virus del mosaico del pepino (<i>Cucumber mosaic virus</i>)
CTV	Virus de la tristeza de los cítricos (<i>Citrus tristeza virus</i>)
CVYV	Virus del amarilleo de las venas del pepino (<i>Cucumber vein yellowing virus</i>)
LIYV	Virus de los amarillos infecciosos de la lechuga (<i>Lettuce infectious yellows virus</i>)
LMV	Virus del mosaico de la lechuga (<i>Lettuce mosaic virus</i>)
PeMV	Virus del moteado del cacahuete (<i>Peanut mottle virus</i>)
PLRV	Virus del enrollado de la patata (<i>Potato leaf roll virus</i>)
PPV	Virus de la Sharka (<i>Plum pox virus</i>)
PSbMV	Virus del mosaico del guisante transmitido por semilla (<i>Pea seed-borne mosaic virus</i>)
PVA	Virus A de la patata (<i>Potato virus A</i>)
PVX	Virus X de la patata (<i>Potato virus X</i>)
PVY	Virus Y de la patata (<i>Potato virus Y</i>)
PPMoV	Virus del moteado suave del pimiento (<i>Pepper mild mottle virus</i>)
SMV	Virus del mosaico de la soja (<i>Soybean mosaic virus</i>)
TEV	Virus del grabado del tabaco (<i>Tobacco etch virus</i>)
TMV	Virus del mosaico del tabaco (<i>Tobacco mosaic virus</i>)
TuMV	Virus del mosaico del nabo (<i>Turnip mosaic virus</i>)
TVMV	Virus del moteado de las venas del tabaco (<i>Tobacco vein mottling virus</i>)
WSMV	Virus del mosaico estriado del trigo (<i>Wheat streak mosaic virus</i>)
ZYMV	Virus del mosaico amarillo del calabacín (<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>)

ABREVIATURAS

Ac.	Ácido
AD	Dominio de activación de la transcripción
BD	Dominio de unión a DNA
BPB	Azul de Bromofenol
BSA	Albúmina de suero bovino
CP	Proteína de la cápsida
DASI-ELISA	Ensayo ELISA por doble sándwich indirecto
DIECA	Dietilditiocarbamato sódico
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO ₆₀₀	Densidad óptica medida a 600 nm
DO ₅₉₅	Densidad óptica medida a 600 nm
DO ₄₀₅	Densidad óptica medida a 405 nm
dpi	Días post inoculación
dpa	Días post Agroinfiltración
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilen diamino tetra acético
EGTA	Etilenglicol-bis- (β-aminoetileter) N', N', N', N'-tetracético
EtBr	Bromuro de Etidio
EtOH	Etanol
GAMPO	Anticuerpo procedente de cabra contra ratón conjugado con peroxidasa.
GARPO	Anticuerpo procedente de cabra contra conejo conjugado con peroxidasa.
HC-Pro	Factor de transmisión o componente auxiliar de transmisión.
hisHC-Pro	HC-Pro con 6 histidinas fusionadas en su extremo amino terminal.
HEPES	Ácido 4-2-hidroxiethyl-1-piperazinil-etanosulfónico
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
LB	Medio Luria Bertani
MAb	Anticuerpo monoclonal
MES	Ácido r-morfolinetanosulfónico
min	minuto
MOPS	Ácido 4-morfolinpropanosulfónico
mpi	Meses post inoculación
mRNA	RNA mensajero
MW	Peso molecular
PAb	Anticuerpo policlonal

PBS	Tampón fosfato salino (Na ₂ PO ₄ 15 mM, NaCl 0,15 M, pH 7.4)
PBST	Tampón fosfato salino con Tween-20 al 0.05%
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilen glicol
PNP	p-nitrofenil fosfato
PVP	Polivinil pirrolidona
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
SD	Medio mínimo de crecimiento de levaduras
SDS	Dodecil sulfato sódico
sRNA	RNA de pequeño tamaño
SSC	Tampón cloruro sódico-citrato sódico (NaCl 0,15M, citrato sódico 0,015M pH 7.0)
Taq	DNA polimerasa procedente de <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris HCl 10mM pH 7.5, EDTA 1 mM
TSM	Tampón sulfato magnésico (Tris-H ₂ SO ₄ 0.1M pH 7.2, MgCl ₂ 0.02M)
uds	unidades
UV	Ultravioleta
YPDA	Medio rico de crecimiento de levaduras suplementado con adenina

CÓDIGO GENÉTICO

		Segunda posición					
		U	C	A	G		
Primera posición	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Stop UGG Trp	U C A G	
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G	
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G	
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G	
						Tercera posición	

AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Abreviatura		Tamaño	Polaridad
	3 letras	1 letra		
Alanina	Ala	A	89	Hidrófobo
Arginina	Arg	R	174	Básico
Asparagina	Asn	N	132	Hidrófilo
Ac. Aspártico	Asp	D	133	Ácido
Ac. Glutámico	Glu	E	147	Ácido
Cisteína	Cys	C	121	Hidrófilo
Fenilalanina	Phe	F	165	Hidrófobo
Glutamina	Gln	Q	146	Hidrófilo
Glicina	Gly	G	75	Hidrófilo
Histidina	His	H	155	Básico
Isoleucina	Ile	I	131	Hidrófobo
Leucina	Leu	L	131	Hidrófobo
Lisina	Lys	K	146	Básico
Metionina	Met	M	149	Hidrófobo
Prolina	Pro	P	115	Hidrófobo
Serina	Ser	S	105	Hidrófilo
Treonina	Thr	T	119	Hidrófilo
Triptófano	Trp	W	204	Hidrófobo
Tirosina	Tys	Y	181	Hidrófilo
Valina	Val	V	117	Hidrófobo

AGRADECIMIENTOS

En el transcurso de estos últimos años he tenido la gran suerte de conocer y trabajar con una serie de personas sin las cuales la realización de esta tesis no habría sido posible. A todos vosotros os debo este trabajo, y como no quiero olvidarme de ninguno, y todos sabéis lo imprescindible que ha sido vuestra colaboración y apoyo en cada uno de los pasos que me he propuesto dar, sólo quería agradeceréoslo como merecéis:

iiiiGRACIAS!!!!

I. Introducción

I.1 TRANSMISIÓN DE VIRUS DE PLANTAS.

La transmisión por organismos vectores es el principal medio de difusión de los virus de plantas. Los virus de plantas pueden ser también transmitidos verticalmente por semilla, o ser diseminados por intervención humana, por ejemplo mediante injertos o por manipulación en las plantas que causa daño mecánico. La importancia de la diseminación por vectores es menor en el caso de virus animales ya que, a diferencia de las plantas que son organismos sésiles, la movilidad del huésped facilita el contacto y la transmisión de virus sin necesidad de que exista un vector entre huéspedes.

El primer documento científico que recoge un caso de transmisión de un virus de plantas por un vector se publicó ya en el año 1901 (Takami, 1901) y desde entonces han sido numerosos los casos de virus transmitidos por vectores que han sido estudiados. Son muchos los grupos taxonómicos de vectores implicados en la transmisión de virus de plantas, incluyendo plasmodioforales (Clase *Plasmodiophoromycetes*), hongos (Clase *Chytridiomycetes*) y animales (nematodos: Clase *Adenophorea* y artrópodos: Clases *Arachnida* e *Insecta*). La tabla 1 (adaptada de Ng & Falk, 2006b) muestra un breve resumen con los medios de transmisión de los grupos de virus de plantas más representativos. En esta tabla se observa claramente que, a pesar de ser numerosos los grupos taxonómicos de vectores implicados en la transmisión de virus de plantas son los insectos hemípteros, y dentro de este grupo los pulgones, los que transmiten la mayoría de los virus de plantas, siendo responsables de la transmisión de aproximadamente un 55% de los virus descritos (Brunt *et al.*, 1996, Nault, 1997).

Tabla 1. Medios de dispersión de virus de plantas.

Organismos dispersores	Incidencia ¹	Ejemplos de Géneros de Virus
Humanos	Raro	<i>Potexvirus</i> , <i>Tobamovirus</i>
Hongos	Raro	<i>Carmovirus</i> , <i>Tombusvirus</i> ,
Plasmodioforales	Raro	<i>Furovirus</i> , <i>Bymovirus</i>
Nematodos	Poco frecuente	<i>Nepovirus</i> , <i>Tobravirus</i>
Ácaros	Poco frecuente	<i>Rymovirus</i>
Trips (<i>O. Thysanoptera</i>)	Poco frecuente	<i>Tospovirus</i>
Escarabajos (<i>O. Coleoptera</i>)	Poco frecuente	<i>Comovirus</i> , <i>Tymovirus</i>
Mosca blanca (<i>O. Hemiptera</i>)	Alta	<i>Begomovirus</i> , <i>Crinivirus</i>
Cicadélidos (<i>O. Hemiptera</i>)	Alta	<i>Phytoreovirus</i> , <i>Mastrevirus</i> , <i>Tenuivirus</i> ,
Pulgones (<i>O. Hemiptera</i>)	Mayoritaria	<i>Potyvirus</i> , <i>Luteovirus</i> , <i>Cucumovirus</i> , <i>Closterovirus</i>

¹ Hace referencia a la incidencia relativa del tipo de organismo vector citado para la dispersión de los virus de plantas en términos globales.

La transmisión por vectores de virus de plantas es un fenómeno muy específico en el que están implicados determinantes de origen viral que interactúan específicamente con el vector. Por este motivo la transmisión se ha utilizado en ocasiones como carácter biológico de valor taxonómico para clasificar diferentes géneros de virus (por ejemplo en el caso de la familia *Potyviridae*).

Sin embargo, a pesar de la importancia que tiene este mecanismo en la dispersión de los virus de plantas en la naturaleza, los determinantes y mecanismos por los que vectores específicos son capaces de propagar sus correspondientes virus entre distintas plantas son comprendidos parcialmente. Aún quedan muchas cuestiones por aclarar. Por otra parte, aunque existen algunos casos concretos en los que el mecanismo a nivel molecular empieza a ser conocido (por ejemplo *Potyvirus*) no existe suficiente información como para conseguir establecer estrategias que permitan mejorar el control de las virosis en el campo mediante métodos que afecten la transmisión de virus.

1.1.1 Tipos de transmisión de virus de plantas por insectos.

Los conceptos básicos para describir las interacciones entre virus y vector fueron por primera vez introducidos por Watson y Roberts en 1939 (Watson & Roberts, 1939) quienes acuñaron los términos de transmisión “no persistente” y “persistente” que hacían referencia al tiempo que el vector (en este caso distintas especies de pulgones) era capaz de transmitir un virus tras su adquisición. Desde entonces la terminología ha ido variando conforme el conocimiento de la materia ha ido avanzando. En este trabajo se empleará la terminología más ampliamente utilizada y revisada recientemente por Ng y Falk (Ng & Falk, 2006b). Esta clasificación se basa en dos caracteres principales:

1. La duración de la capacidad de transmisión del virus tras ser adquirido por el insecto vector, una característica que se asocia también con el lugar de retención del virus dentro del mismo (Nault, 1997)

2. la posible translocación del virus en el interior del insecto.

Así tenemos cuatro tipos de transmisión: No persistente, semipersistente, persistente circulativa y persistente propagativa.

Durante el proceso de transmisión se distinguen tres fases bien marcadas que también se utilizan para clasificar los tipos de transmisión de virus de plantas. Estas fases son:

1. Fase de Adquisición. Es el tiempo que el vector tarda en adquirir el virus a partir de una planta infectada sobre la que se está alimentando.
2. Fase de Latencia. Es el lapso de tiempo necesario para que el vector sea capaz de inocular el virus adquirido.
3. Fase de Retención. Es el periodo de tiempo durante el cual el vector es virulífero y puede inocular el virus en nuevas plantas.

En la tabla 2 se resumen las características de los tipos de transmisión descritos.

Tabla 2. Clasificación de los tipos de transmisión de virus de plantas^a

<u>Características</u>	<u>Tipos de Transmisión</u>			
	NO PERSISTENTE ^b	SEMPERSISTENTE ^b	PERSISTENTE CIRCULATIVA	PERSISTENTE PROPAGATIVA
Duración de la fase de adquisición	Segundos Minutos	Minutos Horas	Horas	Horas
Fase de latencia: necesidad/duración	No	No	Horas	Días Semanas
Duración de la fase de retención	Minutos	Horas Días	Días De por vida	Días De por vida
Necesidad de traspaso de barreras celulares en el vector	No	No	Si	Si
Capacidad de replicación en el vector	No	No	No	Si
Ejemplos de grupos taxonómicos de virus	<i>Potyvirus</i> <i>Cucumovirus</i>	<i>Caulimoviridae</i> <i>Closteroviridae</i>	<i>Luteoviridae</i> <i>Geminiviridae</i>	<i>Tospovirus</i>

^aAdaptado de Ng y Falk 2006

^bEn el caso de transmisión mediada por hemípteros (pulgones, mosca blanca, cicadélidos, etc.) la transmisión no persistente se asocia con retención del virus en el estilete, mientras que en la semipersistente se ha postulado que la retención podría tener lugar en el aparato digestivo anterior (Nault, 1997) aunque no existen evidencias experimentales que lo demuestren.

I.1.1.1 Transmisión persistente.

Este tipo de transmisión requiere tiempos de adquisición largos de horas e incluso días. La mayoría de los virus transmitidos de este modo están restringidos al floema en su planta huésped, son transmitidos por artrópodos y el virus atraviesa la barrera hematoencefálica del insecto.

Se distinguen dos tipos de transmisión persistente: circulativa y propagativa. En la transmisión persistente circulativa (Ejemplos: *Luteovirus*, *Nanovirus*, *Geminivirus*) el virus no es capaz de replicarse en las células del vector durante su transporte. En el caso de la transmisión persistente propagativa (Ejemplos: *Tospovirus*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*) el virus es capaz de multiplicarse en las células del insecto durante su circulación

actuando como un organismo parásito tanto en la planta huésped como en el insecto vector pudiendo en ocasiones llegar a infectar a la progenie del insecto transováricamente.

La transmisión persistente circulativa ha sido bien estudiada en el caso de *Luteovirus*, transmitidos por pulgones. El virus es ingerido por el vector y transportado hasta las glándulas salivares desde donde es inoculado junto con la saliva en posteriores alimentaciones del vector. Durante el recorrido se producen asociaciones entre componentes del virus y los receptores presentes en células del intestino medio y/o posterior que permiten al virus traspasar estas células y ser liberado a la hemolinfa. Estas interacciones parecen no ser muy específicas pues los luteovirus son internalizados tanto en pulgones vectores como no vectores (Gildow, 1999). El paso desde la hemolinfa a las células de las glándulas salivares accesorias es por el contrario un fenómeno altamente específico (Brault *et al.*, 2007, Brault *et al.*, 2005, Seddas *et al.*, 2004) implicando la glicosilación de las proteínas de origen viral (Seddas & Boissinot, 2006). Durante el periodo en el que las partículas virales se encuentran en la hemolinfa se produce una interacción con la proteína de tipo chaperona denominada GroEL producida por bacterias endosimbióticas del género *Buchnera* (Filichkin *et al.*, 1997, Hogenhout *et al.*, 2000). Esta asociación parece estar implicada en la estabilización de las partículas virales en la hemolinfa del vector.

Los geminivirus son también transmitidos de manera persistente y circulativa pero en este caso por mosca blanca. Se conoce poco acerca de los mecanismos moleculares implicados en el proceso, si bien se sabe que también hay interacción en la hemolinfa con la proteína GroEL (Morin *et al.*, 1999) y que la proteína de la cápsida de estos virus está implicada en su transmisión (Liu *et al.*, 1997, Liu *et al.*, 1999).

Un caso de transmisión persistente propagativa es el de los tospovirus transmitidos por trips. En este caso las partículas virales penetran las células epiteliales del intestino medio del vector donde se multiplican (Ullman *et al.*, 1993, Nagata *et al.*, 1999). Tras su replicación en el intestino medio las partículas virales migran a las células musculares que rodean el intestino y de allí a las glándulas salivares (Ullman *et al.*, 1993, Nagata *et al.*, 1999, de Assis Filho *et al.*, 2002). Estos virus tienen un genoma de RNA tripartito envuelto por una envuelta lipídica derivada del huésped. En el RNA medio se encuentran los determinantes de transmisibilidad por trips ya que se ha demostrado que mutaciones en la pauta de lectura abierta del precursor de las glicoproteínas de la

envuelta del virus provocan la pérdida de transmisibilidad sin afectar el ensamblaje del virus (Sin *et al.*, 2005).

I.1.1.2 Transmisión semipersistente.

La transmisión semipersistente se distingue por tener periodos de adquisición e inoculación más largos que la no persistente (Palacios *et al.*, 2002) pudiendo mantenerse la capacidad virulífera del vector durante horas e incluso días. Sin embargo, el virus sólo es retenido en el aparato digestivo del vector sin atravesar barreras hematoencefálicas, a diferencia de los virus de transmisión persistente. Los virus de transmisión semipersistente mejor caracterizados son los caulimovirus y closterovirus. La adquisición del virus se produce en floema, y el vector precisa de cierto tiempo para alcanzar este tejido, lo que explica que a mayores tiempos para la adquisición, mayor sea la eficacia del proceso. El virus se considera que puede ser retenido en la región del intestino anterior del pulgón (figura 2), aunque no existe evidencia en firme que lo pruebe.

La transmisión del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) es el caso de transmisión de caulimovirus mejor estudiado (Schmidt *et al.*, 1994, Blanc *et al.*, 2001, Leh *et al.*, 2001, Palacios *et al.*, 2002, Plisson *et al.*, 2005). La transmisión de este virus requiere la asistencia de dos proteínas virales no estructurales P2 y P3 junto con la proteína mayor de la cápsida de este virus P4. La región amino terminal de la proteína P2 interacciona con el insecto vector (Moreno *et al.*, 2005) y la proteína P3 media la unión entre la proteína P2 y la partícula viral a través de la proteína de la cápsida P4 (figura 1). Estudios sobre la distribución intracelular de todos estos componentes virales parecen indicar que la adquisición de estos productos por el insecto vector se produce secuencialmente adquiriendo primero la proteína P2 y posteriormente la proteína P3 y el virión en forma de complejos preformados (Drucker *et al.*, 2002).

En el caso de la familia *Closteroviridae* la transmisión ha sido estudiada exhaustivamente puesto que incluye miembros causantes de graves pérdidas económicas a nivel agronómico. Sin embargo, los conocimientos a nivel molecular que rigen las interacciones entre estos virus y sus vectores son aún muy escasos. El género *Closterovirus* es transmitido de forma semipersistente por pulgones. Existen recientes estudios que parecen indicar que, al igual que en el caso de los caulimovirus, proteínas virales no estructurales podrían estar implicadas en el mecanismo de transmisión del closterovirus de la tristeza de los cítricos (CTV) (Herron *et al.*, 2006). El género *Crinivirus* es transmitido de forma semipersistente por mosca blanca. En este caso la inoculación y la adquisición están asociados con la alimentación por parte del vector en tejido

floemático (Johnson *et al.*, 2002) y no parece haber implicación de proteínas no estructurales de origen viral (Tian *et al.*, 1999). Estudios con el crinivirus de los amarillos infecciosos de la lechuga (LIYV) han demostrado que la proteína de la cápsida CPm (que forma estructuras diferenciadas en un segmento terminal de las partículas) está implicada en la interacción con el vector y que cambios puntuales en su secuencia imposibilitan la adquisición de partículas virales (Ng & Falk, 2006a) (figura 1).

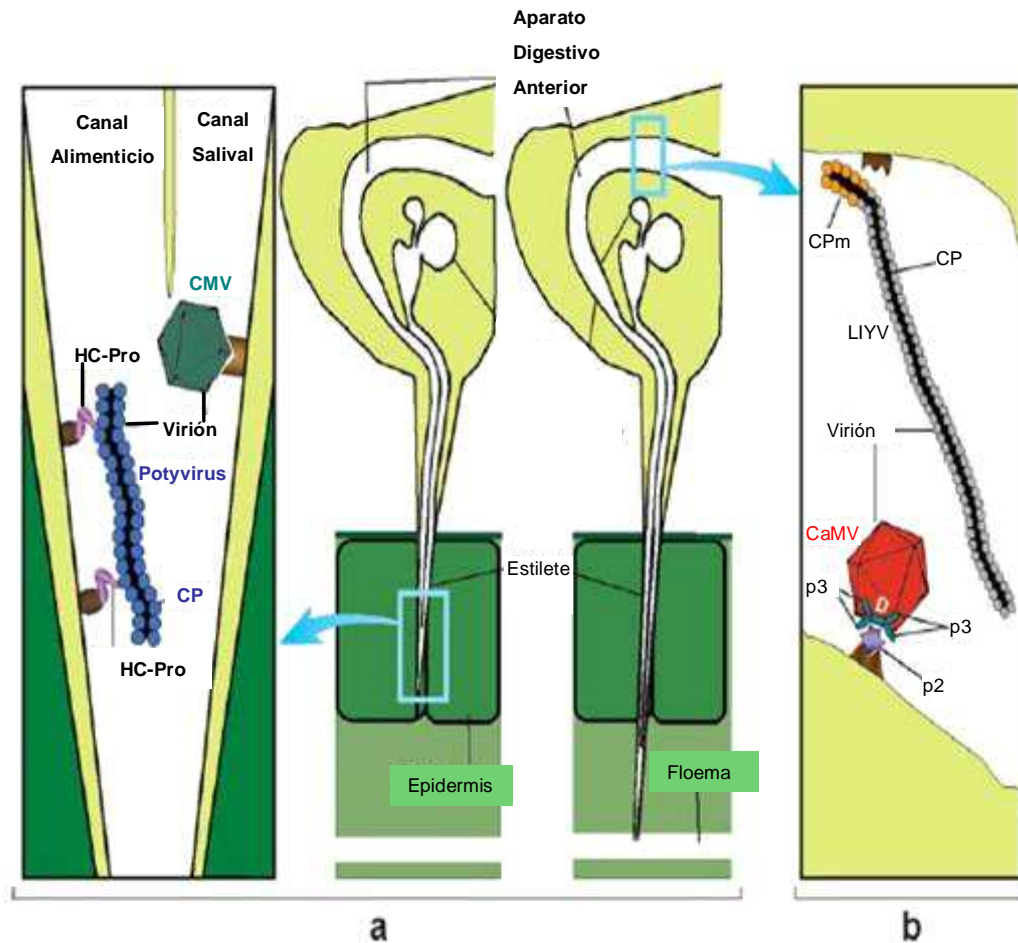


Figura 1. Representación de los modelos de transmisión semipersistente y no persistente. (a) Transmisión no persistente. Modelo de adquisición del virus (izquierda) y alimentación en un esquema general del aparato bucal de hemípteros (derecha). El panel de la izquierda muestra la transmisión no persistente de potyvirus en la que la proteína HC-Pro media la interacción entre el vector y la partícula viral a través de su proteína CP y de cucumovirus (CMV) en la que la proteína CP está implicada directamente en la interacción con hipotéticos receptores del pulgón. (b) Esquema representativo de la transmisión semipersistente de caulimovirus (CaMV) en la que se muestra cómo las proteínas p2 y p3 actúan mediando la interacción entre la partícula viral y los sitios de unión del vector, y de crinivirus (LIYV) en la que la interacción se da directamente con la proteína de la cápsida CPm sin mediación de factores ayudantes. En este caso se ha propuesto que la interacción tiene lugar en zonas más internas del aparato digestivo anterior, aunque no se dispone de evidencia experimental (Adaptado de Ng & Falk, 2006b).

I.1.1.3 Transmisión no persistente.

Este tipo de transmisión se caracteriza por tener períodos muy cortos para la adquisición y retención del virus. Todos los virus de transmisión no persistente descritos hasta la fecha tienen como vector exclusivamente pulgones (Ng & Falk, 2006b). El virus se asocia con el estilete del pulgón donde es retenido durante unos minutos e inoculado en posteriores pruebas del insecto. La adquisición y la inoculación se producen durante las breves inserciones de prueba que realiza el pulgón sobre la planta para comprobar si es un huésped apropiado (Powell & Hardie, 2000). En contra de lo que sucede con la transmisión semipersistente, la eficiencia del proceso disminuye cuando el tiempo de adquisición aumenta. Además el rendimiento es mayor si los pulgones se someten a un ayuno previo (Wang & Pirone, 1996b). El virus es retenido en el aparato bucal del pulgón, en la región del estilete donde se unen el canal alimenticio y el salival (figura 1), y en este caso sí se dispone de evidencias experimentales (Ammar *et al.*, 1994, Wang & Pirone, 1996b).

I.1.2 ESTRATEGIAS DE TRANSMISIÓN DE VIRUS POR PULGONES.

En el caso de la transmisión no persistente y semipersistente, existen dos mecanismos bien diferenciados de transmisión. Un primer caso es el de aquellos virus en los que es necesaria la presencia de proteínas de origen viral no estructurales también denominadas factores ayudantes de la transmisión (del inglés *helper*), y un segundo caso es el de los virus en los que únicamente son necesarios los componentes estructurales del virión o proteínas de la cápsida. Así tenemos dos estrategias bien diferenciadas que se denominan estrategia de la cápsida y estrategia del *helper*.

Un ejemplo típico de estrategia de la cápsida es el del cucumovirus CMV (figura 1a) uno de los virus de mayor importancia por su amplia distribución e implicaciones económicas. Este virus tiene un genoma tripartito. Los componentes que determinan la transmisión se localizan en la región codificante de la proteína de la cápsida CP (Perry & Francki, 1992, Perry *et al.*, 1994). Estudios mediante generación de distintos recombinantes para el RNA3 quiméricos, por combinaciones de diferentes fragmentos de la proteína CP de aislados transmisibles y no transmisibles han permitido identificar varias posiciones en la secuencia de la proteína que afectan la transmisión de CMV por pulgones (Perry *et al.*, 1998, Liu *et al.*, 1999). En la mayoría de los casos estudiados la pérdida de transmisibilidad correlaciona con una menor estabilidad de las partículas virales (Ng *et al.*, 2005).

El caso mejor estudiado de estrategia de *helper* es el de los potyvirus, que explicaremos con más detalle en el siguiente apartado puesto que es el objeto de estudio de esta tesis. Además, existen otros casos bien documentados como el del caulimovirus CaMV que precisa de dos proteínas no estructurales, las proteínas P2 y P3 para que se produzca la transmisión del virus (figura 1b).

I.2 TRANSMISIÓN NO PERSISTENTE DE POTYVIRUS POR PULGONES.

Los pulgones son el grupo más importante de vectores de virus de plantas transmitiendo unos 300 virus diferentes, de los cuales aproximadamente un 75% son transmitidos de forma no persistente (Nault, 1997, Fauquet *et al.*, 2004). El género *Potyvirus*, con 111 miembros definitivos descritos y 88 tentativos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>: 00.057.0.01. *Potyvirus*) es el más numeroso de entre los transmitidos por pulgones de forma no persistente, y además, muchos de sus miembros son responsables de causar importantes pérdidas económicas en agricultura.

I.2.1 POSICIÓN TAXONÓMICA Y CARACTERÍSTICAS DE POTYVIRUS.

Los Potyvirus se incluyen filogenéticamente dentro del supergrupo tipo picorna de virus de plantas con genoma de RNA de sentido mensajero. Comparten aspectos de su estructura y expresión genómica con la familia de virus animales *Picornaviridae* (Goldbach & Wellink, 1988). Dentro del supergrupo de picornavirus de plantas existen dos grandes familias: *Comoviridae* y *Potyviridae* (Goldbach *et al.*, 1990).

El género *Potyvirus* se engloba dentro de la familia *Potyviridae*. Esta familia incluye 6 géneros distintos que se clasifican principalmente en función de vector por el que son transmitidos y el número de fragmentos que componen su genoma (tabla 3). El género *Bymovirus* tiene su genoma dividido en dos fragmentos de RNA y los otros 5 géneros (*Potyvirus*, *Macluravirus*, *Rymovirus*, *Ipomovirus* y *Tritimovirus*) tienen un genoma monopartito. *Potyvirus* y *Macluravirus* son transmitidos por pulgones, *Rymovirus* y *Tritimovirus* por ácaros, *Ipomovirus* por mosca blanca y *Bymovirus* por Plasmodioforales.

Tabla 3. Clasificación de la familia Potyviridae según segmentación del genoma y vector en transmisión.

Género	Genoma	Vector transmisor
<i>Bymovirus</i>	Bipartito	<i>O. Plasmodiophorida</i>
<i>Potyvirus</i>	Monopartito	<i>O. Hemiptera</i> (Pulgones)
<i>Macluravirus</i>	Monopartito	<i>O. Hemiptera</i> (Pulgones)
<i>Rymovirus</i>	Monopartito	<i>O. Acari</i> (Eriófidos)
<i>Tritimovirus</i>	Monopartito	<i>O. Acari</i> (Eriófidos)
<i>Ipomovirus</i>	Monopartito	<i>O. Hemiptera</i> (Mosca blanca)

La familia *Potyviridae* se caracteriza por presentar partículas de morfología alargada y flexuosa (figura 2A) de aproximadamente 600-900 nm de longitud y 12-15 nm de diámetro (excepto el género *Bymovirus*, que tiene partículas con dos longitudes modales diferentes de acuerdo con sus dos segmentos genómicos). Otra característica general de importancia taxonómica, y también observable microscópicamente, es la presencia de inclusiones citoplasmáticas cilíndricas en las células infectadas (Rubio-Huertos & López-Abella, 1966, Hollings & Brunt, 1981) también denominadas “pinwheels” por su aspecto en forma de aspas de molino al ser observadas en secciones transversales (figura 2B). Estas inclusiones están inducidas por la infección viral y se corresponden con acúmulos de la proteína viral CI (Edwarson & Christie, 1996). Los potyvirus también inducen en ocasiones otros tipos de inclusiones bien citoplasmáticas o nucleares (Riedel *et al.*, 1998) a partir de proteínas no estructurales de origen viral, si bien no tienen valor taxonómico.

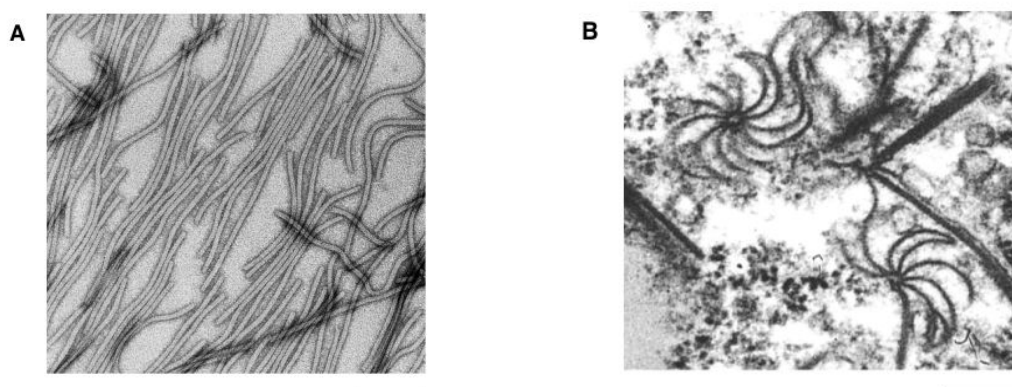


Figura 2. Fotografías realizadas al microscopio electrónico (cortesía del Prof. D. López-Abella). (A) partículas virales purificadas del virus del grabado del tabaco (TEV) por tinción negativa y (B) sección de células de *N. benthamiana* infectadas por el virus de la Sharka (PPV) mostrando las inclusiones cilíndricas citoplasmáticas en forma de aspas de molino (Barra: 200 nm).

Todos los miembros de la familia poseen un genoma constituido por una única molécula de RNA de polaridad positiva de unos 9-10 Kb de longitud, a excepción del género Bymovirus cuyo genoma está segmentado en dos fragmentos. La partícula viral está formada por una copia del RNA viral rodeada de aproximadamente 2000 copias de la proteína de la cápsida o CP (Shukla & Ward, 1989). La proteína VPg de origen viral se encuentra unida covalentemente al extremo 5' del RNA viral (Murphy *et al.*, 1990) y recientemente también se ha descrito la presencia ocasional de la proteína de origen viral HC-Pro en uno de los extremos de la partícula, al menos en parte de la población viral purificada (Torrance *et al.*, 2006) desconociéndose las posibles implicaciones biológicas de la presencia de esta proteína en la estructura del virus. La molécula de RNA tiene una cola de poliadeninas en el extremo 3' (Hari *et al.*, 1979). La expresión genómica del virus se produce por síntesis de una poliproteína de unos 350 KDa que se autoprocresa proteolíticamente para dar lugar a los diferentes productos virales (Riechmann *et al.*, 1992).

I.2.2. ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN GENÓMICA DEL GÉNERO POTYVIRUS.

Como ya se ha mencionado, la información genética de estos virus viene contenida en una única molécula de RNA de polaridad positiva y organizada en una única pauta de lectura abierta (ORF) flanqueada en sus extremos por regiones no codificantes. La traducción de esta molécula genera una poliproteína de un tamaño aproximado de 350 KDa que se procesa autocatalíticamente mediante sus propias proteasas P1, HC-Pro y NIa (figura 3) para generar los diferentes productos virales (Riechmann *et al.*, 1992).

Las regiones no codificantes están implicadas en importantes funciones del ciclo viral tales como la traducción del RNA, replicación del virus o encapsidación. La región 5' no traducible ha sido implicada en la traducción independiente de CAP del RNA (Gallie *et al.*, 1995, Gallie, 2001). Recientemente se ha descrito para TEV la presencia de un sitio de entrada de ribosomas interno (IRES) de 45 nucleótidos que potencia la traducción independiente de CAP formando una estructura secundaria en el RNA a modo de pseudonudo (Zeenko & Gallie, 2005). Además, la región 5' no traducible de potyvirus también está implicada en replicación y estabilidad del RNA viral (Simón-Buela *et al.*, 1997, Simón-Buela *et al.*, 2000).

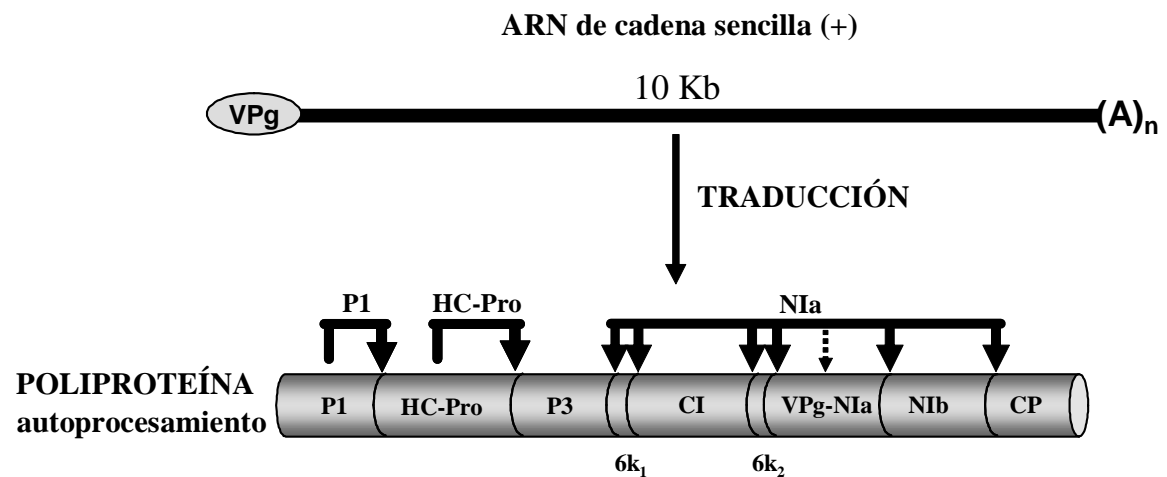


Figura 3. Esquema representativo de la organización genómica del género *Potyvirus*. La información genética está codificada en una única molécula de RNA de polaridad positiva que se traduce para dar una poliproteína que por autoprocesamiento a cargo de las proteínas de origen viral P1, HC-Pro y NIa genera todos los productos virales.

La región 3' no codificante está menos conservada entre los potyvirus en lo que se refiere a su tamaño, secuencia y estructura secundaria (Laín *et al.*, 1988, Turpen, 1989, Quemada *et al.*, 1990a, Quemada *et al.*, 1990b). Esta región está implicada en la replicación del virus, interaccionando con la replicasa viral en el inicio de la síntesis de la cadena de RNA de sentido negativo, y también actúa protegiéndola frente a la degradación por exonucleasas (Bryan *et al.*, 1992, Dolja *et al.*, 1992). Además esta región también está implicada en virulencia conteniendo determinantes de patogenicidad, como se ha visto en distintos aislados de TVMV (Rodríguez-Cerezo *et al.*, 1991).

1.2.3 EXPRESIÓN GENÓMICA Y PROCESAMIENTO DE LA POLIPROTEÍNA VIRAL.

La poliproteína generada por traducción del RNA de sentido mensajero es autoprosesada proteolíticamente generando al menos 10 proteínas maduras. Estas proteínas se han denominado: P1, factor de transmisión o ayudante "helper" (HC-Pro), P3, 6K1, proteína de las inclusiones cilíndricas (CI), 6K2, proteína "a" de las inclusiones nucleares (NIa), VPg, proteína "b" de las inclusiones nucleares (NIB) y por último la proteína de la cápsida (CP). En la tabla 4 se muestra un resumen de las funciones atribuidas a cada uno de los productos proteicos derivados del procesamiento de la poliproteína viral.

El procesamiento de la poliproteína se lleva a cabo por tres proteasas de origen viral: P1, HC-Pro y NIa (figura 3). Las proteínas P1 y HC-Pro se autoprocenan en sus respectivos extremos carboxilo terminales (Carrington *et al.*, 1989a, Carrington *et al.*, 1989b, Carrington *et al.*, 1990) mientras que la proteína NIa procesa el resto de la poliproteína en *cis* y en *trans* (Carrington & Dougherty, 1987, García *et al.*, 1989). Esta proteasa actúa sobre los distintos puntos de corte de la poliproteína con distinta eficiencia, por lo que algunos intermediarios tardan más tiempo en procesarse que otros. Se ha apuntado que algunos de estos intermediarios podrían estar implicados en funciones distintas a las de sus productos maduros (Dougherty & Parks, 1989, Dougherty *et al.*, 1989).

I.2.4 PROTEÍNAS IMPLICADAS EN TRANSMISIÓN DE POTYVIRUS POR PULGONES.

Como ya se ha mencionado anteriormente dos son las proteínas implicadas en este proceso: La proteína de la cápsida CP y el factor de transmisión HC-Pro.

I.2.4.1 Proteína de la cápsida CP.

La CP de potyvirus está implicada en numerosas funciones a lo largo del ciclo viral (ver figura 4). Entre éstas se encuentra la transmisión del virus por sus insectos vectores. Esta proteína tiene un tamaño aproximado de 30 a 37 KDa. La región central de la proteína se encuentra muy conservada entre los distintos potyvirus siendo más variables los extremos amino y carboxilo terminal. Estos extremos están expuestos en la superficie de la proteína siendo susceptibles de degradación por proteasas (Allison *et al.*, 1985, Dougherty *et al.*, 1985). Además no están implicados en la encapsidación del virus puesto que son prescindibles para que ésta se produzca (Shukla & Ward, 1989, Voloudakis *et al.*, 2004).

Esta proteína presenta en su región amino terminal un dominio altamente conservado en aislados transmisibles por pulgón (Harrison & Robinson, 1988). Consta de tres residuos aspártico-alanina-glicina (DAG) y la alteración o eliminación de aminoácidos de este dominio determina la pérdida total o parcial de la transmisibilidad por pulgones de varios potyvirus (Atreya *et al.*, 1990, Atreya *et al.*, 1991, Gal-On *et al.*, 1992, Atreya *et al.*, 1995).

Funciones

Procesamiento proteolítico, serín proteasa (Verchot & Carrington, 1995b), multiplicación viral (Verchot & Carrington, 1995a), potenciador de la supresión de PTGS (Kasschau & Carrington, 1998) y supresor <i>per se</i> en algunos casos (Valli <i>et al.</i> , 2006). Posible determinante de huésped (Valli <i>et al.</i> , 2007)	P1
Procesamiento proteolítico como cisteín proteasa de tipo papaína (Carrington <i>et al.</i> , 1989a), transmisión por pulgones (Kassanis & Govier, 1971a), movimiento célula-célula (Rojas <i>et al.</i> , 1997) y a larga distancia (Cronin <i>et al.</i> , 1995), supresor PTGS (Anandalakshmi <i>et al.</i> , 1998, Brigneti <i>et al.</i> , 1998, Kasschau & Carrington, 1998) , sinergismo (Pruss <i>et al.</i> , 1997), determinante de huésped (Saenz <i>et al.</i> , 2002)	HC-Pro
Amplificación viral (Rodríguez-Cerezo <i>et al.</i> , 1993), determinante de patogenicidad (Riechmann <i>et al.</i> , 1995, Saenz <i>et al.</i> , 2000)	P3
Determinante de patogenicidad (Merits <i>et al.</i> , 2002). Recientemente descrita como proteína madura <i>in vivo</i> en plantas infectadas con PPV (Waltermann & Maiss, 2006)	6K1
Replicación viral, actividad helicasa (Lain <i>et al.</i> , 1990, Lain <i>et al.</i> , 1991), movimiento célula-célula (Carrington <i>et al.</i> , 1998)	CI
Amplificación viral (Merits <i>et al.</i> , 2002). Anclaje del complejo de replicación a membrana (Schaad <i>et al.</i> , 1997a)	6K2
Unión covalente al extremo 5' (Oruetxebarria <i>et al.</i> , 2001), traducción del RNA genómico (Schaad <i>et al.</i> , 2000), determinante de huésped (Schaad <i>et al.</i> , 1997b). A menudo se encuentra fusionada a NIa-Pro. Localizada en el núcleo formando inclusiones nucleares junto a NIb.	VPg
Serín proteasa con cisteína en el sitio activo, encargada del procesamiento proteolítico de la poliproteína viral (Riechmann <i>et al.</i> , 1992). Generalmente fusionada a VPg por baja eficiencia del procesamiento entre ambas.	NIa-Pro
RNA polimerasa dependiente de RNA (Hong & Hunt, 1996), forma inclusiones nucleares	NIb
Ensamblaje viral (Voloudakis <i>et al.</i> , 2004), transmisión por pulgones (Harrison & Robinson, 1988), movimiento célula-célula y sistémico (Dolja <i>et al.</i> , 1994, Rojas <i>et al.</i> , 1997), amplificación viral (Mahajan <i>et al.</i> , 1996) y determinante de patogenicidad.	CP

Figura 4. Tabla resumen de las funciones asociadas a cada una de las proteínas de potyvirus producidas por procesamiento de la poliproteína viral durante la infección. Las proteínas implicadas en transmisión por pulgones se señalan en gris. Los tamaños de las proteínas indicados en el esquema son aproximados.

El dominio DAG, a pesar de su conservación, no es idéntico en todos los potyvirus y otros dominios similares también parecen ser funcionales en transmisión para distintos potyvirus, como el dominio DAS en el virus del mosaico del guisante transmitido por semilla (PSbMV) (Johansen *et al.*, 1996) o el dominio DAA en el virus del moteado del cacahuete (PeMV) (Flasinski & Cassidy, 1998). Sorprendentemente, mutaciones en el dominio DAG del potyvirus del moteado de las venas del tabaco (TVMV) para generar estos dominios DAA o DAS produjeron variantes no transmisibles (López-Moya *et al.*, 1999). En este mismo trabajo también se observa que mutaciones en residuos próximos al dominio DAG del virus del grabado del tabaco (TEV) tienen un efecto en la transmisión del virus como ya se había observado en algunas posiciones próximas al dominio DAG en TVMV (Atreya *et al.*, 1991, Atreya *et al.*, 1995).

Corroborando estos datos existe también información sobre aislados naturales no transmisibles del virus de la Sharka (PPV) que poseen una delección de 15 aminoácidos en el extremo amino terminal de la proteína CP afectando a la glicina del dominio DAG que pasa a ser DAL. Esta delección podría ser la responsable de la pérdida de transmisibilidad de la variante NAT (Maiss *et al.*, 1989) y del aislado denominado 3.3 (López-Moya *et al.*, 1995).

Todos estos resultados parecen indicar que el contexto en el que se encuentra el dominio DAG, y posiblemente la topología de la región, estén implicados en la función de transmisión. Sin embargo no existen datos de estructura tridimensional del extremo amino terminal de la proteína CP de potyvirus que permitan comprobar si esta hipótesis es acertada.

La proteína CP interacciona con la proteína HC-Pro también implicada en el proceso de transmisión. En esta interacción participa la región amino terminal de la CP y el dominio denominado PTK (ver apartado siguiente) de la proteína HC-Pro (Wang *et al.*, 1996, Peng *et al.*, 1998) La pérdida de esta interacción en variantes mutadas de la CP con alteraciones en el dominio DAG correlaciona con la pérdida de transmisión del virus (Blanc *et al.*, 1997).

I.2.4.2 Factor ayudante HC-Pro.

La otra proteína de origen viral implicada en el proceso de transmisión es la proteína HC-Pro. Esta proteína es necesaria para que se produzca la transmisión por

pulgones de potyvirus regulando la especificidad entre virus y pulgones (Wang & Pirone, 1996b, Dombrovsky *et al.*, 2005). La implicación en transmisión de una proteína ayudante diferente de las partículas virales fue constatada por primera vez en 1971 por Kassanis y Govier (Kassanis & Govier, 1971b) en experimentos con el potyvirus C de la patata (hoy en día considerado un aislado de PVY) y el potexvirus del mosaico aucuba de la patata (PAMV). Estos dos virus sólo eran transmitidos a partir de infecciones mixtas con el potyvirus Y de la patata (PVY). Para que se diera la transmisión a partir de plantas infectadas únicamente con estos virus, era necesaria una alimentación previa de los pulgones en plantas infectadas con PVY. Posteriormente estos mismos autores pudieron demostrar que el factor necesario procedente de las plantas infectadas con PVY no era el propio virus PVY, puesto que la transmisión también se producía si la primera adquisición se hacía sobre tejido infectado con PVY e irradiado con luz ultravioleta para inactivar las partículas virales (Kassanis & Govier, 1971a). La prueba definitiva acerca de la naturaleza proteica y el origen viral de este “factor ayudante” (hoy día denominado HC-Pro) de la transmisión de PVC y PAMV llegó posteriormente en una serie de trabajos donde se lograba aislar y caracterizar el componente capaz de ayudar a la transmisión (Govier & Kassanis, 1974a, Govier & Kassanis, 1974b, Govier *et al.*, 1977), hasta su purificación a homogeneidad (Thornbury & Pirone, 1983).

La forma monomérica de HC-Pro tiene un tamaño aproximado de 53 a 58 KDa. Sin embargo, la forma activa en transmisión tiene un peso molecular aparente muy superior, lo que sirve de base a la hipótesis de que la forma activa en transmisión es al menos un dímero (Thornbury *et al.*, 1985, Wang & Pirone, 1999). Trabajos posteriores mediante el sistema de dos híbridos de levaduras confirman la capacidad de la proteína HC-Pro de varios potyvirus de interaccionar consigo misma, y por tanto de formar al menos dímeros (Guo *et al.*, 1999, Urcuqui-Inchima *et al.*, 1999a, Urcuqui-Inchima *et al.*, 1999b, Guo *et al.*, 2001, Kang *et al.*, 2004,). Recientemente trabajos de biología estructural también confirman esta hipótesis (Plisson *et al.*, 2003, Ruíz-Ferrer *et al.*, 2005), si bien aún se desconoce si la forma activa en transmisión son dímeros u oligómeros de mayor tamaño.

Esta proteína es multifuncional, estando implicada en numerosas etapas del ciclo viral (figura 4) además de en la transmisión del virus. Entre las funciones que se han encontrado para HC-Pro cabe destacar su papel como supresor del PTGS. La proteína HC-Pro actúa suprimiendo el fenómeno de silenciamiento desencadenado por la planta para protegerse del virus. Su actividad en supresión está asociada a su capacidad de secuestrar moléculas de RNA de doble cadena y pequeño tamaño, que son precursoras

de las que guían el proceso de degradación de los RNAs de secuencia homóloga, una característica común a diversos supresores virales (Lakatos *et al.*, 2006, Merai *et al.*, 2006).

A pesar de que no se conoce la estructura en detalle de la proteína HC-Pro, sí que hay numerosos estudios que han determinado los dominios y residuos implicados en las diversas funciones propuestas (Oh & Carrington, 1989, Kasschau *et al.*, 1997, González-Jara *et al.*, 2005). Puesto que este trabajo se centra en la función de transmisión de esta proteína, se describirán únicamente en detalle los dominios implicados en dicha función.

Los primeros trabajos realizados en este sentido fueron posibles gracias al conocimiento de la secuencia de diversos aislados de potyvirus transmisibles y no transmisibles, lo que permitió identificar dominios y residuos conservados, presuntamente implicados en la función de transmisión. Posteriormente, la disponibilidad de clones completos infecciosos de virus permitió llevar a cabo análisis mutacionales en los que se pudieron delimitar dominios conservados y residuos implicados en el proceso (Thornbury *et al.*, 1990, Lecoq *et al.*, 1991, Canto *et al.*, 1995, Legavre *et al.*, 1996, Llave *et al.*, 1999).

La región amino terminal de la proteína HC-Pro de potyvirus presenta un dominio altamente conservado, el dominio KITC (Lys-Ile-Thr-Cys). Trabajos de intercambio de fragmentos genómicos y mutagénesis dirigida permitieron demostrar que este dominio está implicado en la transmisión, y que cambios en el primer residuo del dominio (lisina) cargado positivamente provocan la pérdida de transmisión del virus (Atreya *et al.*, 1992, Atreya & Pirone, 1993, Huet *et al.*, 1994, Blanc *et al.*, 1998). La porción amino terminal de HC-Pro posee una región rica en cisteínas justo antes del dominio KITC. Mutaciones en estas cisteínas conservadas también provocan la pérdida de transmisibilidad del potyvirus TEV (Llave *et al.*, 2002).

Otro de los dominios conservados entre potyvirus que también ha sido implicado en la transmisión se localiza al final de la porción central de la proteína HC-Pro y está constituido por el tripéptido PTK (Pro-Thr-Lys). La comparación de secuencias entre aislados transmisibles y no transmisibles, confirmada después mediante mutagénesis dirigida, ha permitido implicar este dominio en transmisión. El cambio aminoacídico treonina por alanina se observa en aislados no transmisibles del virus de mosaico amarillo del calabacín (ZYMV) (Granier *et al.*, 1993) y cuando se introduce este cambio en una variante transmisible se produce una drástica reducción en la tasa de transmisión

de este potyvirus (Huet *et al.*, 1994) Otros cambios en la primera posición del dominio también anulan la transmisión de ZYMV (Peng *et al.*, 1998).

I.2.5 MECANISMO DE TRANSMISIÓN DE POTYVIRUS POR PULGONES: HIPÓTESIS DEL PUENTE.

Se han propuesto varias hipótesis que explican el proceso mediante el cual los potyvirus son transmitidos por pulgones (revisado en Raccah *et al.*, 2001) siendo la hipótesis conocida como “puente” la más aceptada actualmente teniendo en cuenta las evidencias experimentales aportadas. Esta hipótesis fue ya postulada en 1971 por Govier y Kassanis (Govier & Kassanis, 1974a), y plantea una interacción específica de la proteína HC-Pro con el aparato bucal del pulgón y la partícula viral, actuando a modo de puente entre ambas estructuras (figura 5).

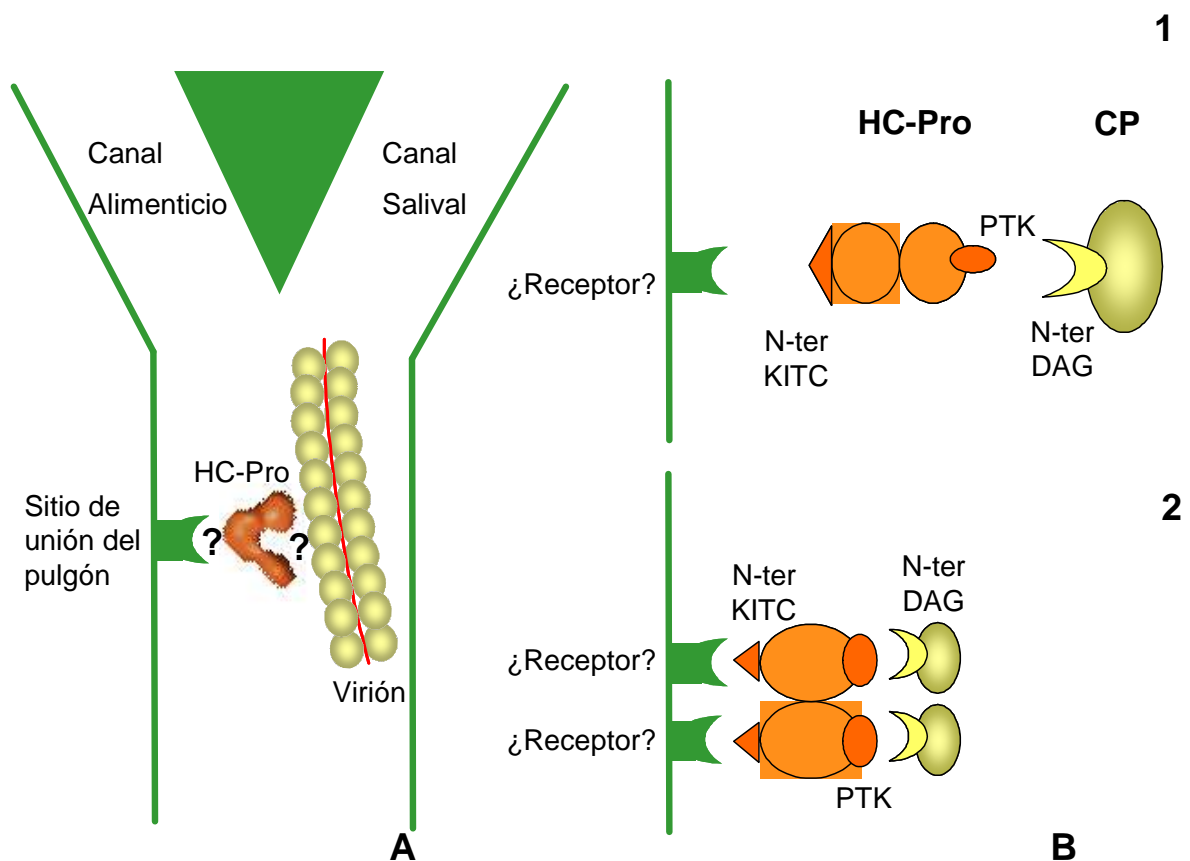


Figura 5. Representación esquemática del posible modelo de interacción de la proteína HC-Pro con el estilete del pulgón y la partícula viral a través de su CP (en amarillo). La molécula HC-Pro ha sido dibujada como dímero (en naranja). A) Localización de la interacción en el extremo distal del estilete del insecto (en verde). Hay que destacar que se desconoce el número de receptores y moléculas HC-Pro implicadas en la interacción (podrían ser varios receptores y varias moléculas HC-Pro estabilizando una única partícula viral). Asimismo se desconoce la conformación que adopta la partícula de HC-Pro en la interacción, y no existen datos acerca de la naturaleza del sitio de unión en el insecto. B) Modelo detallado mostrando los dominios de las proteínas HC-Pro y CP implicados en la interacción según evidencias experimentales; se presentan dos posibles orientaciones de los oligómeros de HC-Pro en la interacción (1 y 2).

Las evidencias que apoyan esta hipótesis son varias: Las partículas virales purificadas de diversos potyvirus marcadas radiactivamente sólo se acumulan en el extremo distal del estilete del pulgón en presencia de proteína HC-Pro (Berger & Pirone, 1986, Wang *et al.*, 1996). Tanto HC-Pro como las partículas virales colocan por inmunomicroscopía electrónica en la epicutícula del canal alimenticio de pulgones (Ammar *et al.*, 1994). Por último, diversos estudios realizados con clones completos no transmisibles que presentan mutaciones en los dominios implicados en el proceso de transmisión tanto en la proteína HC-Pro como en la proteína CP detectan la pérdida de retención en el estilete del pulgón (Wang *et al.*, 1996). La falta de interacción entre la partícula viral y la proteína HC-Pro correlaciona con la pérdida de transmisibilidad (Blanc *et al.*, 1997, Blanc *et al.*, 1998, Peng *et al.*, 1998, López-Moya *et al.*, 1999) sugiriendo que estas interacciones son esenciales para el proceso de transmisión.

Se desconoce la estructura tridimensional detallada de la proteína HC-Pro y tampoco se conoce el mecanismo de unión de la proteína HC-Pro en la epicutícula del pulgón. Aún así se han propuesto dos modelos alternativos ambos compatibles con la hipótesis “puente” (Raccah *et al.*, 2001). Ambos modelos (figura 5B) presuponen que la forma activa de la proteína es un dímero, si bien no hay pruebas experimentales que excluyan la posibilidad de que agregados de mayor tamaño estén implicados en la interacción. En un primer caso el dímero de HC-Pro se uniría por un dominio de un monómero al estilete del pulgón, mientras que el otro monómero interaccionaría con la partícula viral (figura 5B1). En un segundo caso, ambos monómeros estarían interaccionando con sus dominios correspondientes tanto con la partícula viral como con el estilete del pulgón (figura 5B2).

I.3 POTYVIRUS EMPLEADOS EN EL ESTUDIO.

Este trabajo ha sido realizado empleando dos potyvirus distintos: el virus de la Sharka PPV y el virus del grabado del tabaco TEV.

I.3.1 EL VIRUS DE LA SHARKA.

El virus de la sharka o virus de la viruela del ciruelo afecta a una gran variedad de especies del género *Prunus*, produciendo importantes pérdidas agronómicas (Cambra *et al.*, 2006). Su acrónimo (PPV del inglés *Plum pox virus*) hace referencia a la importante sintomatología que se aprecia en ciruelo, donde afecta tanto en hojas como en fruto, produciendo lesiones en forma de anillos cloróticos muy llamativos y que puede llegar a

provocar la caída prematura del fruto (Llácer & Cambra, 2006). Esta enfermedad fue descrita por primera vez en Bulgaria en 1917 y actualmente se encuentra distribuida por toda Europa y el Norte de África, habiendo sido detectada más recientemente en Argentina, Chile, Canadá y Estados Unidos. Existe una serie de artículos publicados en la revista *EPPO Bulletin* que resumen el estado en cada uno de los países afectados por este virus (**EPPO Bulletin**, Vol 36, volumen 2, páginas: 201-414). En España esta enfermedad se detectó por primera vez en 1984 en cultivos de ciruelo japonés de Sevilla, Murcia y Valencia (Llácer *et al.*, 1985) estando hoy en día ampliamente distribuida.

La detección del virus en campo se dificulta debido a que durante el invierno los síntomas de PPV se atenúan. Además los árboles infectados suelen permanecer asintomáticos varios años tras su infección. El virus infecta también un gran número de plantas herbáceas que pueden actuar como reservorio de virus. Todos estos hechos, junto con la dispersión de la enfermedad por pulgones y por propagación vegetativa, hacen que el control de la enfermedad sea difícil, y que las pérdidas económicas provocadas por este patógeno sean muy elevadas (Cambra *et al.*, 2006).

Por este motivo, son muchos los esfuerzos realizados para avanzar en el conocimiento de la patología, detección precoz del patógeno y medidas de control de la virosis causada por PPV. Para ello se vienen realizando desde hace tiempo programas de mejora genética tradicional para producir variedades resistentes al virus (Rankovic *et al.*, 1994, Rankovic & Ogasanovic, 2000, Moustafa *et al.*, 2001, Badenes & Llacer, 2006). También se ha ensayado con éxito la resistencia transgénica en frutales (Ravelonandro *et al.*, 1998, Ravelonandro *et al.*, 2000, Scorza & Ravelonandro, 2006). A pesar de los prometedores resultados, la enfermedad sigue siendo un problema fitopatológico de primera magnitud en gran parte del mundo, y las dificultades para implementar programas de erradicación y de sustitución de variedades, junto a la mala aceptación social de las estrategias basadas en resistencia transgénica, hacen presagiar que la enfermedad de la Sharka continuará siendo una de las principales virosis por su importancia económica durante bastante tiempo.

Respecto a la dispersión de tanto este como de otros potyvirus por pulgones, no existen medidas de control eficaces, fuera de los tratamientos con insecticidas para controlar las poblaciones de insectos vectores. A pesar de ser éste el principal medio de dispersión del virus a nivel local, apenas se dispone de otras medidas de control, y dada la duración plurianual de las plantas huéspedes en cultivo, los tratamientos insecticidas preventivos únicamente podrían retardar la llegada de la enfermedad.

Actualmente el virus está molecularmente bastante bien caracterizado (López-Moya *et al.*, 2000) y existen clones completos infecciosos que permiten avanzar en su conocimiento, por lo que la búsqueda de medios de control de la enfermedad puede basarse en una experimentación avanzada sobre el patógeno que la causa (López-Moya & García, 2000).

I.3.2 VIRUS DEL GRABADO DEL TABACO.

El virus del grabado del tabaco o TEV es otro representante del género potyvirus. Afecta entre otros a cultivos de tabaco, pimiento y tomate, estando presente principalmente en cultivos de Asia Central y América. La importancia económica de este virus puede decirse que es muy inferior a la de PPV, y los numerosos trabajos publicados acerca del mismo se deben a que este virus ha sido ampliamente utilizado como modelo para el estudio de los potyvirus. Se dispone de un clon completo infeccioso del virus desde hace más de 15 años (Dolja *et al.*, 1992), y este hecho junto con la posibilidad de purificar la proteína HC-Pro a partir de plantas infectadas con un clon infeccioso que porta una cola de histidinas para permitir la purificación por cromatografía de afinidad de la proteína a altas concentraciones y con muy buenos niveles de pureza (Blanc *et al.*, 1999) hacen de él un modelo idóneo para el estudio de la transmisión de potyvirus. (Llave *et al.*, 2002, Ruíz-Ferrer *et al.*, 2004, Ruíz-Ferrer *et al.*, 2005).

I.4 LIMITACIONES EN EL ESTUDIO DE LA PROTEÍNA HC-Pro EN TRANSMISIÓN.

La proteína HC-Pro fue inicialmente descrita como el factor necesario para la transmisión de potyvirus (Govier *et al.*, 1977). Sin embargo, como ya he mencionado en el capítulo I.2.4.2, la proteína HC-Pro es una proteína multifuncional implicada en otras muchas etapas del ciclo de infección viral (Carrington *et al.*, 1989a, Cronin *et al.*, 1995, Rojas *et al.*, 1997, Anandalakshmi *et al.*, 1998, Kasschau & Carrington, 1998, Saenz *et al.*, 2002).

Este hecho ha supuesto un problema para el estudio de la función de transmisión del virus, ya que se precisaba aislar la actividad en transmisión de la proteína del resto de funciones para poder estudiar el proceso en profundidad. Por ejemplo, gracias a la disponibilidad de clones completos infecciosos de potyvirus, se han podido realizar

estudios de mutagénesis dirigida sobre distintos sitios en la región codificante de la proteína HC-Pro, permitiendo delimitar dominios implicados en el proceso de transmisión del virus. No obstante, la implicación de la proteína HC-Pro en otros procesos de la infección viral ha limitado este tipo de estudios, puesto que a menudo las variantes obtenidas por mutagénesis no son infecciosas o bien sus niveles de acumulación no son comparables a los de clones no modificados, lo que impide un análisis fiable de su comportamiento en transmisión (Atreya & Pirone, 1993, Guo *et al.*, 1998, Stenger *et al.*, 2006). Además, este tipo de aproximaciones está limitado únicamente a aquellos virus para los que existe clon completo infeccioso susceptible de manipulación molecular.

Sorprendentemente, en los últimos años han surgido casos de virus de la familia *Potyviridae* en los que la región codificante de la proteína HC-Pro es inexistente o no es necesaria para que se produzca la infección sistémica por parte del virus. En el caso del tritimovirus del mosaico estriado del trigo (WSMV), la región codificante de la proteína HC-Pro es prescindible, ya que variantes delecionadas del clon completo que carecen de este cistron siguen siendo infectivas, aunque pierden su transmisibilidad por ácaros (Stenger *et al.*, 2005). Por otra parte, los datos de secuencia disponibles sobre el genoma del ipomovirus del amarilleo de las venas pepino (CVYV) muestran que para este virus no existe una región correspondiente a HC-Pro (Janssen *et al.*, 2005). En el caso de CVYV un reciente trabajo publicado por Valli y colaboradores (Valli *et al.*, 2006) muestra que la proteína supresora del silenciamiento de este virus es una de las dos proteínas tipo P1 que este virus presenta. La secuencia para P1 en este virus es más larga que sus homólogas de otros potyvirus e incluye una duplicación, con la segunda copia actuando como supresor del PTGS. Este hecho explicaría en parte la ausencia de región codificante HC-Pro porque una de sus funciones más importantes, la supresión del PTGS estaría cubierta al menos por la proteína P1. En el caso de WSMV, para el que se dispone de un clon infeccioso en el que la región codificante de la proteína HC-Pro es prescindible, recientemente ha sido publicado un trabajo en el que describen mutaciones puntuales en la región codificante de la proteína HC-Pro que provocan pérdida de infectividad (Stenger *et al.*, 2006). Este resultado podría indicar una interferencia de la proteína mutante sobre el ciclo de infección viral. Además, todos estos datos ponen de manifiesto una plasticidad en la región del genoma que incluye HC-Pro, y que daría lugar a una importante diversificación de funciones dentro de la familia *Potyviridae*. Se ignora si dentro del género *Potyvirus* hay casos que se alejen de las funciones ya conocidas.

1.4.1 Sistemas heterólogos de expresión de la proteína HC-Pro.

Dada la carencia de clones completos infecciosos de numerosos potyvirus, junto con la problemática descrita para el estudio de la función en transmisión de la proteína HC-Pro empleando los clones completos infecciosos existentes, se han ensayado diversos sistemas de expresión de la proteína fuera del contexto de la infección viral que pudieran facilitar el estudio de la transmisión de potyvirus. Un primer trabajo en esta línea se publicó con plantas transgénicas que expresaban constitutivamente la proteína HC-Pro de TVMV (Berger *et al.*, 1989). Sin embargo los niveles de proteína producidos con este sistema eran muy inferiores a los presentes en una infección viral, y sólo mediante extractos concentrados se pudo probar la actividad de la proteína en transmisión. Posteriores intentos de transgenesis con moléculas HC-Pro del potyvirus PPV tampoco han producido plantas con niveles de expresión de la proteína similares a los producidos en una infección viral (Barajas *et al.*, 2004).

Asimismo se ensayó la expresión de HC-Pro de TVMV en células de insecto mediante un sistema basado en baculovirus. Sin embargo, la proteína producida en este sistema carece de actividad en transmisión (Thornbury *et al.*, 1993). Posteriormente, trabajos de nuestro grupo han demostrado la actividad en transmisión de la proteína HC-Pro de TEV producida en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* (Ruíz-Ferrer *et al.*, 2004). Sin embargo los niveles de actividad en transmisión resultaron inferiores a los producidos por proteína purificada a partir de plantas infectadas con el mismo potyvirus.

También se han empleado vectores virales basados en el potexvirus X de la patata (PVX) para expresar la proteína HC-Pro del potyvirus PVY fuera del contexto de su infección (Sasaya *et al.*, 2000). Este sistema produce proteína activa en transmisión, pero sin embargo tiene dos inconvenientes principales: la frecuente pérdida del inserto que se está expresando tras sucesivos ciclos de replicación viral, como se ha visto también en otros casos (Barajas *et al.*, 2006), y la aparición de sinergismo en la infección con estos vectores virales como consecuencia de la expresión de un supresor de silenciamiento fuerte como es la proteína HC-Pro. Como consecuencia se produce la exacerbación de síntomas e incluso muerte de la planta infectada con dicho vector (González-Jara *et al.*, 2004).

A día de hoy, el sistema más eficaz de producción de proteína HC-Pro activa en transmisión de potyvirus es la utilización de clones completos infecciosos, de manera que

el producto se genera durante la infección viral. En el caso de TEV, gracias a la adición de una cola de 6 histidinas en el extremo amino terminal de la proteína, se permite su purificación por cromatografía de afinidad (Blanc *et al.*, 1999). La misma estrategia se ha aplicado a otros potyvirus como LMV (Plisson *et al.*, 2003). Este sistema de expresión produce grandes cantidades de proteína HC-Pro altamente purificada, permitiendo la realización de estudios estructurales sobre la misma (Plisson *et al.*, 2003, Ruíz-Ferrer *et al.*, 2005). Asimismo el HC-Pro de ZYMV y el de TuMV se pudieron purificar a partir de plantas infectadas con aislados naturales de estos virus empleando la misma técnica sin necesidad de incorporar la cola de histidinas (Kadouri *et al.*, 1998, Wang & Pirone, 1999). No obstante, esta metodología no ha resultado eficaz en intentos de purificación de HC-Pro de otros potyvirus tales como PVY o TVMV (Kadouri *et al.*, 1998). En el caso de PPV, virus de especial interés en nuestro laboratorio, la proteína HC-Pro ha sido purificada gracias a la fusión de una cola de 6 histidinas, si bien la proteína obtenida no fue activa en transmisión (Martínez-García, 2000).

Recientemente, y como consecuencia del interés que el descubrimiento de la actividad supresora del PTGS de muchas proteínas de origen viral ha suscitado, se han producido nuevas herramientas para el estudio de esta función. Una de estas herramientas es la expresión transitoria de proteínas basada en *Agrobacterium tumefaciens* (Voinnet *et al.*, 1999, Johansen & Carrington, 2001), llegando a constituir un ensayo típico para la identificación de nuevos supresores de origen viral (revisado por Voinnet, 2001). Diversas proteínas HC-Pro de potyvirus han sido estudiadas de esta manera. Esta aproximación permitiría la producción de proteína HC-Pro fuera del contexto de la infección viral. Sin embargo, hasta la realización de este trabajo esta tecnología no se había aplicado en estudios de transmisión por pulgones.

I.5 MECANISMOS DE CONTROL DE TRANSMISIÓN DE POTYVIRUS.

La transmisión por pulgones es el principal mecanismo de dispersión de potyvirus en la naturaleza (Brunt *et al.*, 1996, Hull, 2002). Los potyvirus son transmitidos en la naturaleza de modo no persistente (capítulo I.2) y este hecho dificulta el control de las enfermedades en cultivos.

El principal medio de control empleado actualmente para limitar la dispersión de estas virosis es el tratamiento con pesticidas que permite controlar las poblaciones naturales de los insectos vectores. Sin embargo, además de las graves implicaciones medioambientales, este sistema no es suficientemente eficiente en el control de las virosis transmitidas de modo no persistente, puesto que al ser un mecanismo altamente eficaz y que actúa de forma muy rápida, poblaciones pequeñas de vectores son capaces de dispersar la enfermedad sin necesidad de colonizar las plantas que infectan (Perring *et al.*, 1999). Los pesticidas podrían incluso tener un efecto contrario al deseado, puesto que fomentan una mayor actividad y movilidad de los pulgones que podría favorecer la transmisión de virosis (Budnik *et al.*, 1996). Además, como consecuencia del uso extensivo de pesticidas, están apareciendo resistencias en insecto que podrían reducir aún más la eficacia de estas estrategias (Perring *et al.*, 1999).

Otra serie de medidas se aplican para el control tanto de las virosis como de sus vectores en el campo. La combinación de todas estas estrategias converge en lo que se ha dado en llamar control integrado. Estas medidas incluyen por ejemplo el uso de aceites minerales que inhiben el comportamiento alimenticio del pulgón (Wang & Pirone, 1996a , Powell *et al.*, 1998), el uso de “plantas barrera” alrededor de las parcelas cultivadas que al ser más atractivas para los pulgones permiten reducir la población de insectos que acceden al cultivo (Hooks & Fereres, 2006) o medidas de control biológico utilizando insectos depredadores o algunos parasitoides que puedan reducir la población de pulgones, entre otras. Nuevamente, la eficacia de estas estrategias es más reducida en el caso de virus de transmisión no persistente.

En la protección de los cultivos frente a potyvirus también se ha utilizado la “protección cruzada” (Fuchs *et al.*, 1997). Este sistema consiste en la inoculación de aislados debilitados del virus cuya infección cursa asintomática, por lo que no disminuye la productividad del cultivo. Esta infección previene posteriores infecciones con otros aislados más virulentos del mismo virus. Sin embargo, la posibilidad de que los virus atenuados recuperen su agresividad por mutación hace que esta estrategia sea considerada arriesgada, y su aplicación sigue siendo limitada.

El mecanismo más eficaz actualmente para proteger los cultivos frente a virosis es la resistencia genética (revisado en Kang *et al.*, 2005 y en Soosaar *et al.*, 2005). La resistencia genética puede obtenerse tanto por mejora genética como por transgénesis, aunque en ambos casos es difícil predecir eficacia, seguridad y durabilidad de la misma en campo (Lecoq *et al.*, 2004, Thresh, 2006). Este sistema puede emplearse para

proteger frente al patógeno viral, pero también frente a su insecto vector. Esta última resistencia contra el vector tiene un doble valor, ya que previene frente al daño causado por el insecto plaga en el cultivo, y también frente a la infección con los distintos virus que este insecto pudiera transmitir. Desgraciadamente, el número de ejemplos de resistencias disponibles frente a vectores es muy limitado. Se pueden citar el gen *Mi* de tomate que controla la resistencia a nematodos y pulgones (Rossi *et al.*, 1998, Vos *et al.*, 1998), comprobándose también su acción frente a mosca blanca (Nombela *et al.*, 2003). El gen AKR de *Medicago truncatula* también controla la resistencia frente a pulgones (Klingler *et al.*, 2005). Un caso muy interesante es el del gen *Vat* que regula concretamente la transmisión de virus en melón (Lecoq *et al.*, 1979, Lecoq *et al.*, 1980, Klingler *et al.*, 2001). A pesar del gran interés que tienen estos ejemplos, no se conoce en profundidad su mecanismo de acción, y además las fuentes de resistencia son muy limitadas por el momento, por lo que serán difícilmente trasladables a otros cultivos.

En resumen, las estrategias disponibles son claramente insuficientes para conseguir un control adecuado de los daños causados por numerosas virosis en cultivos. Este hecho justifica que se continúe investigando la transmisión de virus como uno de los puntos claves en el desarrollo de futuras estrategias de control de virus.

II. Justificación y Objetivos

Los potyvirus constituyen uno de los grupos de virus fitopatógenos con mayor relevancia económica en el sector agrícola al provocar importantes pérdidas en los cultivos a los que afectan. Estas virosis se transmiten en el campo principalmente mediante insectos vectores. Existe una falta de medidas eficaces para el control de potyvirus, y en concreto su disseminación por insectos es una de las características que dificultan la lucha contra las enfermedades que causan.

En los últimos años se ha avanzado bastante en el conocimiento de los mecanismos moleculares que operan en el proceso de la transmisión por potyvirus. Las proteínas de origen viral implicadas en este proceso son la proteína de la cápsida CP y el factor ayudante HC-Pro, siendo la hipótesis de puente la más aceptada para explicar el mecanismo de transmisión. Según esta hipótesis la proteína HC-Pro, posiblemente en forma homomultimérica, actuaría a modo de puente interaccionando con la proteína CP que conforma la partícula viral y con algún tipo de estructura en el aparato bucal del pulgón donde se retendrían reversiblemente los viriones durante el proceso de adquisición, liberándose posteriormente en una inoculación en otra planta.

Uno de los potyvirus modelo para el estudio de la transmisión por pulgones es el virus del grabado del tabaco (TEV). En el laboratorio se disponía de una colección de mutantes no transmisibles por pulgón de este virus, que portan modificaciones puntuales en la secuencia aminoacídica de la región amino terminal del factor HC-Pro. Con el fin de profundizar en el conocimiento de las interacciones implicadas en el proceso de transmisión, en esta tesis se ha planteado analizar la capacidad de interacción de las diferentes proteínas HC-Pro mutagenizadas entre sí y con la CP del virus por diversas aproximaciones, constituyendo un primer objetivo la búsqueda de motivos que explicaran la pérdida de transmisibilidad de los mutantes de HC-Pro.

La proteína HC-Pro es una proteína multifuncional que no está implicada únicamente en transmisión por pulgones sino que participa también en otros procesos del ciclo viral tan importantes como el movimiento célula a célula o la supresión de los mecanismos de defensa de la planta huésped. Por este motivo, es frecuente que los estudios basados en mutagénesis sobre clones completos infecciosos de virus para el análisis de funciones de las diferentes proteínas, se hayan visto limitados en el caso del estudio de HC-Pro a la producción de variantes que retuvieran la infectividad viral. Así pues, un segundo objetivo de esta tesis ha sido desarrollar una metodología que permita la expresión de proteína HC-Pro de potyvirus fuera del contexto de la infección viral y que

Justificación y Objetivos

facilite el análisis mutacional. La metodología escogida ha sido la expresión transitoria mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Se ha analizado la expresión transitoria de proteína HC-Pro en diferentes huéspedes y la actividad en transmisión de la proteína así expresada mediante varias aproximaciones. Para el desarrollo de este objetivo se ha utilizado el virus de la Sharka PPV.

También, tras analizar la actividad en transmisión de la proteína no modificada, se han expresado variantes de HC-Pro no funcionales en transmisión con las que se han realizado diversos ensayos de interferencia del proceso de transmisión de virus. El objetivo en este caso ha sido buscar las bases de posibles estrategias futuras para el control de la diseminación de estos virus en campo.

III. Materiales y Métodos

III.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

III.1.1 PLANTAS.

El potyvirus PPV fue inoculado en plantas de la especie *Nicotiana benthamiana* que es un huésped sistémico para este virus. El potyvirus TEV fue inoculado en plantas de la especie *N. tabacum*. Los ensayos de transmisión se llevaron a cabo utilizando plántulas de 4 hojas verdaderas de *N. benthamiana*. En los ensayos de expresión transitoria se empleó esta misma especie, así como la especie *N. tabacum* cv Xanthi nc. que no es un huésped sistémico para el potyvirus PPV.

III.1.2 PULGONES.

Para los ensayos de transmisión se empleó la especie de pulgón *Myzus persicae* (Sulzer). El clon disponible en nuestro laboratorio procede de un pulgón hembra áptero cedido por el Prof. A. Fereres (ICA, CSIC, Madrid), con el objeto de crear un nuevo clon que fue mantenido en una cámara de cría MLR-350 (SANYO), sobre plantas de tabaco (*N. tabacum* var Xanthi nc), a una temperatura de 20-22 °C y un fotoperíodo de 16:8 horas (luz:oscuridad).

III.1.3 BACTERIAS.

Para la multiplicación y purificación de los plásmidos descritos en este trabajo se ha utilizado la cepa de *Escherichia coli* DH10B (Sambrook & Russel, 2001). En los ensayos de agroinfiltración se ha utilizado la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 o alternativamente la denominada LBA4404.

III.1.4 LEVADURAS.

En los ensayos de doble híbrido se empleó la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* AH109 (Clontech Takara Bio). Esta cepa tiene los genes delatores HIS3, ADE2 y *lacZ*. Estos genes delatores están bajo el control de promotores independientes GAL1, GAL2 y MEL1 que son inducibles por el activador transcripcional GAL4.

III.2 MANTENIMIENTO DE MICROORGANISMOS.

Las cepas DH10B de *E. coli* y GV2260 y LBA440 de *A. tumefaciens* se cultivaron a 37°C y 28°C respectivamente en medio LB (bacto-triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 10g/l) al que se añadían 20 g/l de agar en cultivos en medio sólido. Las cepas originales y transformadas con los diferentes plásmidos se conservaron a 4°C en placas de medio sólido con los antibióticos correspondientes durante periodos cortos de tiempo. Para largos periodos se conservaron a -80°C en medio LB con glicerol al 20%.

Para el cultivo de levaduras se utilizaron los siguientes medios:

YPDA (Medio completo): Extracto de levadura 10 g/l, bacto-peptona 20 g/l, D-glucosa 20g/l, adenina hemisulfato 0.1 g/l.

SD–Leu (Medio mínimo sin leucina): D-glucosa 20 g/l, base nitrogenada sin aminoácidos de Difco 6.7 g/l y suplemento aminoacídico sin leucina de Clontech 0.69 g/l.

SD–Trp (Medio mínimo sin triptófano): D-glucosa 20 g/l, base nitrogenada sin aminoácidos de Difco 6.7 g/l y suplemento aminoacídico sin triptófano de Clontech 0.74 g/l.

SD –Leu–Trp (Medio mínimo sin leucina ni triptófano): D-glucosa 20 g/l, base nitrogenada sin aminoácidos de Difco 6.7 g/l y suplemento aminoacídico sin leucina ni triptófano de Clontech 0.64 g/l.

SD –WAHL (Medio mínimo sin leucina, triptófano, adenina e histidina): D-glucosa 20 g/l, base nitrogenada sin aminoácidos de Difco 6.7 g/l y suplemento aminoacídico sin leucina ni triptófano de Clontech 0.60 g/l.

Los medios sólidos de cultivo se prepararon complementando los medios anteriormente citados con 20 g/l de agar. Las levaduras fueron cultivadas a 30°C. Para su conservación durante periodos cortos se mantuvieron en placas con el medio adecuado (según estuvieran o no transformadas con los distintos plásmidos) a 4°C.

III.3 MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS.

III.3.1 INOCULACIÓN DE PLANTAS CON VIRUS.

La infección se transmitió de plantas infectadas a nuevas plantas extendiendo manualmente el inóculo en dos hojas de cada planta de ensayo previamente espolvoreadas con carborundo o, alternativamente, celite. El extracto para inocular se preparó triturando

hojas infectadas en un mortero con tampón de inoculación (tampón fosfato sódico 20mM pH 7.5) empleando 2 ml de tampón por gramo de hoja. Cuando se empleó como inóculo DNA plasmídico se aplicaron 10 µg de DNA (5 µg por hoja) en una concentración de 0.1 mg/ml en tampón de inoculación.

En las inoculaciones de virus TEV se realizó una transcripción previa de los plásmidos. Para ello 5 µg de DNA plasmídico fueron digeridos con la enzima de restricción *Bgl*II y posteriormente purificados utilizando el kit PCR-Prep de Qiagen. Posteriormente se realizó la transcripción a partir del DNA linealizado utilizando el kit de transcripción SP6 mMMESSAGE (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante.

III.3.2 TRANSFORMACIÓN DE *E. coli*.

Para la transformación con plásmidos completos o con fragmentos de DNA ligados *in vitro*, se utilizaron células competentes de la cepa de *E. coli* DH10B preparadas para electroporación. Alternativamente se empleó la misma cepa pero preparada para transformar por choque térmico por el método de cloruro cálcico. Los correspondientes protocolos corresponden a los descritos por Sambrook y colaboradores (Sambrook & Russel, 2001).

III.3.3 TRANSFORMACIÓN DE *A. tumefaciens* Y AGROINFILTRACIÓN.

Se prepararon células competentes para transformación por choque térmico. Brevemente, se inoculó una colonia aislada de *A. tumefaciens* en 5 ml de LB con rifampicina a una concentración de 25 µg/ml. Este cultivo se incubó en agitación a 28°C y 200 rpm durante 48 horas. Posteriormente se usó este preinóculo para inocular 200 ml de LB rifampicina a la misma concentración y se incubó en las mismas condiciones hasta observar una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de entre 0.5 y 0.6 unidades. En estos valores el cultivo se encuentra en crecimiento exponencial. Entonces se centrifugó el cultivo a 2000 x g durante 5 minutos. Se resuspendió el sedimento en 100 ml de Tris HCl 100mM pH 8.0 frío. Se repitió la centrifugación en las mismas condiciones resuspendiendo las células en un volumen final de 2 ml que se alicuotó en fracciones de 200 µl. Estas células ya competentes se pueden conservar a -80°C por varios meses.

Para la transformación se empleó la técnica de choque térmico. Se mezcló una alícuota de células competentes con el DNA plasmídico (0.1-10 µg) preparado en un volumen final de 100 µl. La mezcla se sumergió en un baño de nitrógeno líquido durante 5

minutos. Posteriormente el tubo se pasó a un nuevo baño a 37°C durante 30 minutos. Pasado este tiempo se añade 1 ml de LB y se incuba a 28°C en agitación durante 1 hora. Se plaqueó la mezcla en fracciones de 300 µl en distintas placas de LB agar con los antibióticos de selección. Para los plásmidos derivados de pCAMBIA se usa kanamicina a 25 µg/ml y rifampicina a la misma concentración. Las placas se incubaron durante 72 horas a 28°C. La transformación de las colonias que crecen en el medio de selección se confirma por PCR y las colonias positivas se conservan en un stock de glicerol a -80°C.

Para agroinfiltrar se prepara un cultivo fresco en placa de LB agar kanamicina 25 µg/ml rifampicina 25 µg/ml (LBKR) a 28°C. Con una colonia aislada se inocula el volumen necesario de LBKR líquido y se incuba a 28°C durante unas 16 horas. Se centrifuga a 2000 x g durante 5 minutos. Se tira el sobrenadante y se resuspende el sedimento de bacterias en tampón de inducción (MES 10 mM pH 5.6, MgCl₂ 10 mM, acetosiringona 0.15 mM) dejándolo a una DO₆₀₀ final de 1.0 durante 3-4 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se agroinfiltran las hojas de *N.benthamiana* y *N.tabacum* cv Xanthi nc con ayuda de una jeringuilla de 1 ml a través de la cara abaxial. Para agroinfiltrar se seleccionaron plantas de 3-4 semanas y se agroinfiltraron las primeras hojas verdaderas que estuvieran completamente extendidas. La presencia del plásmido en estos cultivos se confirmó por PCR usando los cebadores específicos dPPV500 y rPPV2110 (tabla 4).

III.3.4 TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS PARA ENSAYOS DE DOS HÍBRIDOS.

La transformación simultánea (cotransformación) de levaduras con dos plásmidos necesarios para los ensayos de dos híbridos se realizó usando el método de acetato de litio (Gietz *et al.*, 1992). Brevemente, se refrescó el cultivo de levadura en una placa de YPDA. Se seleccionó una colonia aislada y se hizo un precultivo de 16 horas a 30°C y 225 rpm. A partir de este precultivo se inoculó un cultivo y se dejó crecer en agitación hasta alcanzar una DO₅₉₅ de 0.5 unidades aproximadamente. Se centrifugó a 1000 x g durante 5 minutos y se resuspendió en H₂O estéril. Se volvió a centrifugar el cultivo en idénticas condiciones y se resuspendió finamente en una solución de LiAc 100mM preparado en el momento en tampón TE 10mM pH 7.5. Estas levaduras ya están preparadas para ser transformadas. Se prepara entonces la mezcla de plásmidos que se desean cotransformar añadiendo 100 ng del vector AD y 200 ng del vector BD (ya que su eficiencia de transformación es menor) junto con 0.1 mg de DNA desnaturalizado de testículo de arenque. Se agita para mezclar bien y se mezcla con 0.1 ml del cultivo de levaduras competentes. Se añaden 0.6 ml de una solución de LiAc 100mM y PEG 3350 40% preparado en TE 10mM pH 7.5. Se mezcla bien

con ayuda de un vórtex y se deja incubando durante media hora a 30°C en agitación a 200 rpm. Tras esta incubación se añaden 70 µl de DMSO y se provoca un choque térmico a 42°C durante 15 minutos. Posteriormente se enfría la mezcla, se centrifuga brevemente, se elimina el sobrenadante y se resuspenden las células en 350 µl de tampón TE. Inmediatamente se plaquea en placas de agar con medio SD–Leu–Trp para la selección de las levaduras transformadas simultáneamente con los plásmidos AD y BD.

Para los estudios de interacción con el sistema de dos híbridos las colonias cotransformadas con ambos plásmidos se pasaron a medio SD-WAHL. En este caso se necesita la activación de los genes delatores ADE2 e HIS3 para que exista crecimiento de la levadura en medio selectivo. Alternativamente la selección se llevó a cabo con las células cotransformadas directamente en medio SD-WAHL para analizar interacción entre proteínas.

En el caso de transformar la levadura únicamente con un plásmido se empleó un protocolo rápido de transformación de *S. cerevisiae*. La levadura crece en un medio rico. Se toma un volumen aproximado de 25 µl de cultivo de la placa con un asa de siembra y se diluye en 1 ml de H₂O estéril. Se centrifuga en mini centrífuga a máxima velocidad y temperatura ambiente durante 30 segundos y resuspende añadiendo los siguientes reactivos en el orden que se cita y mezclando bien tras cada uno: 240 µl de PEG 3350 50%, 36 µl de LiAc 1M, 50 µl de DNA de testículo de arenque desnaturalizado a 2 mg/ml, 34 µl de H₂O estéril conteniendo el DNA del plásmido a transformar (0.1-5 µg). Se mezcla bien con ayuda de un vórtex toda la mezcla y se provoca el choque térmico en un baño a 42°C durante media hora. Se centrifugan las células a máxima velocidad en una mini centrífuga y se elimina el sobrenadante. Se resuspenden en 0.4 ml de H₂O estéril, y se incuban a RT 5 minutos. Las levaduras transformadas se plaquean en el medio mínimo SD que corresponda y se incuban a 30°C durante 2-4 días hasta tener colonias aisladas bien desarrolladas.

III.4 VECTORES VIRALES Y VIRUS.

El plásmido pICPPV 5.15 es una variante de pICPPV (López-Moya & García, 2000) que contiene una copia completa del genoma del virus PPV, aislado Rankovik, clonado bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y con una señal de terminación de la nopalina sintetasa (NOST) al final de la secuencia del virus. Además, para estabilizar al clon se le añadió un intrón ST-LS1 de un gen de patata (*Solanum tuberosum* L.) (Vancanneyt *et al.*, 1990) que interrumpe el marco de lectura de la región que codifica para la proteína P3. La variante pICPPV HC5.15 fue obtenida reemplazando la región codificante

de la proteína HC-Pro del aislado Rankovic por la correspondiente del aislado español 5.15 aumentando así su transmisibilidad (Martínez-García, 2000).

El vector pICPPV 5.15 *SpeI* (Fernández-Calvino, 2006) es una variante de pICPPV 5.15 que contiene una diana única para la enzima de restricción *SpeI* en la posición 1014 (Lain *et al.*, 1989) de forma que la secuencia aminoacídica no se ve afectada. Su infectividad y sintomatología es idéntica a la de pICPPV 5.15.

El vector pICPPV HVPVY es un plásmido derivado de pICPPV 5.15 con la región HC-Pro intercambiada por la del aislado altamente transmisible OAT del virus PVY. En infección este virus quimérico se comporta igual que PPV a niveles de acumulación viral y sintomatología. Sin embargo, a pesar de proceder el HC-Pro de un virus transmisible, pICPPV HCPVY no es transmitido por pulgones (Martínez-García, 2000).

El vector pPPV NAT, cedido por el Prof. J.A. García (CNB, CSIC, Madrid) contiene una copia del genoma completo de PPV Rankovic, clonado bajo el promotor transcripcional de la T7 RNA polimerasa presentando una delección de 45 nucleótidos en la región 5' del cistron de la proteína de cubierta.

El clon de cDNA infeccioso de TEV denominado 7DA (Dolja *et al.*, 1992) contiene la secuencia genómica del virus TEV bajo el control del promotor de la transcripción de la SP6 RNA polimerasa así como las variantes defectivas en transmisión (Llave *et al.*, 2002) G₃₄₃D, V₃₄₅E, A₃₄₆H, I₃₄₈D, K₃₅₈N y no defectivas I₃₅₉M y HCH10 (Blanc *et al.*, 1999) (con una fusión de 6 histidinas en el extremo amino del cistron de HC-Pro que permite la purificación de dicha proteína a partir de plantas infectadas).

III.5 PREPARACION DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

III.5.1 PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO.

La purificación de DNA plasmídico a partir de cultivos de colonias de *E. coli* resultantes de transformación se realizó por el método de lisis alcalina (Sambrook & Russel, 2001). Para preparación a mayor escala, el DNA se purificó a partir de cultivos bacterianos de 100 ml utilizando un protocolo modificado con un paso adicional de purificación por precipitación con PEG. Brevemente, tras la lisis alcalina el DNA se precipita con isopropanol. El sedimento obtenido se resuspende en 500 ml de H₂O a los que se añaden 5 µl de RNAsa A a 10 mg/ml y se incuba durante 1 hora a 37°C para degradar el RNA que pueda estar contaminando el DNA. Tras la incubación se procede a precipitar el DNA añadiendo 100 µl

de NaCl 5M y 600 μ l de PEG 6000 13% (p/v). Se centrifuga a máxima velocidad en mini centrífuga a 4°C durante 5 minutos. El sedimento se resuspende en 400 μ l de H₂O y se extrae con fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) dos veces. Por último se precipita la fase acuosa con 1/10 del volumen de NaAc 3M pH 5.4 y 2 volúmenes de etanol frío. Se incuba 1 hora a -20°C y se centrifuga a máxima velocidad en mini centrífuga durante 15 minutos. El sedimento se lava con EtOH 70% y finalmente se resuspende en 100 μ l de H₂O. El DNA se cuantifica con espectrofotómetro midiendo absorbancia a 260 nm.

III.5.2 OBTENCIÓN DE RNA DE PLANTAS.

III.5.2.1 RNA total.

Para la obtención de RNA total de plantas se utilizó el reactivo comercial Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El tejido fresco se trituró empleando 7.5 ml del reactivo por gramo de tejido. El sedimento se resuspendió en H₂O libre de RNAsas y posteriormente se empleó para ensayos RT-PCR o *Northern blot*.

Para ensayos *Northern blot* de una misma muestra y RNAs de alto y bajo peso molecular se empleó el sistema RNA/DNA Maxi kit de Qiagen tras la extracción con Trizol y se purificaron ambas fracciones en este segundo paso.

III.5.2.2 RNA de pequeño tamaño (sRNAs).

Para ensayos de *Northern blot* de sRNAs el RNA total extraído con Trizol fue subsecuentemente purificado usando el sistema RNA/DNA Maxi kit de Qiagen siguiendo las instrucciones del proveedor. Este sistema permite obtener RNA de alto y bajo peso molecular de una misma muestra.

III.6 MANIPULACION DE ACIDOS NUCLEICOS.

III.6.1 TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS EN PROCESOS DE CLONAJE.

Las digestiones de DNA con enzimas de restricción de diversas casas comerciales se realizaron siguiendo las indicaciones del proveedor en cada caso con ligeras modificaciones en el tiempo de restricción según la cantidad y pureza del DNA a tratar en cada caso. Las ligaciones se llevaron a cabo usando la enzima DNA ligasa del fago T4 (Promega) en reacciones de 16 horas a temperaturas que oscilaron entre los 4 y 16°C dependiendo del tamaño de los fragmentos a ligar.

III.6.2 AMPLIFICACIÓN DE DNA MEDIANTE PCR.

Las amplificaciones de DNA mediante la reacción de polimerización en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron en termocicladores PTC-100™ (MJ Research, INC). Se emplearon mezclas de reacción de 25 y 50 µl con 1.25 y 2.5 unidades de Taq polimerasa (Perkin Elmer) en cada caso. Se empleó el tampón suministrado por el fabricante suplementado con MgCl₂ a una concentración final de 2.5 mM. Como iniciadores de la elongación se emplearon distintas parejas de cebadores a una concentración final de 0.2 µM. El número y condiciones de cada ciclo de amplificación variaron en cada caso según la pareja de cebadores empleada. En caso de amplificación de fragmentos empleados para los procesos de clonaje se empleó una enzima con capacidad correctora de errores, la enzima Deep Vent polimerasa (New England Biolabs) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. En el caso de que fuera necesario introducir codones de terminación, nuevos sitios de restricción u otro tipo de modificaciones en la secuencia de DNA se utilizaron cebadores con las modificaciones adecuadas en cada caso (tablas 1 y 2).

III.6.3 AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE RNA POR IC RT-PCR.

Para la amplificación de secuencias virales de PPV en plantas infectadas se empleó la técnica de inmunocaptura (IC) y posterior transcripción reversa y PCR. Para la IC se empleó el anticuerpo policlonal para la CP de PPV procedente del kit de detección de PPV de REALISA (Durviz), A1 PPV, a una dilución 1/100 en tampón carbonato/bicarbonato 100mM pH 9.6. Se tapizaron tubos de 0.2 µl con 30 µl de tampón de tapizado durante 3 horas a 37°C. Posteriormente los tubos se lavaron con PBST tres veces y se preparó la muestra para la IC. Los extractos de planta se prepararon en un volumen 1/5 (p/v) de tampón de extracción (PBS conteniendo 2% de PVP y 0.2% de DIECA), y se clarificaron en una mini centrífuga a 5.000 rpm durante 5 min. La IC se llevó a cabo con estos extractos en los tubos tapizados previamente con el anticuerpo durante 16 horas a 4°C

Para la reacción de transcripción reversa (RT) se utilizaron los tubos en los que se había realizado la IC. Se lavaron tres veces con PBST y se preparó la reacción. La enzima seleccionada para llevar a cabo la reacción fue la transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV RT, Promega). La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl en tampón 50mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM DTT y 0.5mM de espermidina, junto con 0.5 mM de cada desoxinucleótido (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 5 Uds. de inhibidor de RNasa, (RNasin, Promega), 1 ud. de enzima AMV-RT (Promega) y 1µM del cebador que corresponda (siguiente apartado). La transcripción transcurrió durante 1 hora a

42°C. Para la reacción de PCR se emplearon 5 µl de la reacción anterior y siguiendo el método descrito en el anterior apartado.

III.6.4 ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA Y EXTRACCIÓN DE DNA DE LOS MISMOS.

La separación de fragmentos de DNA se realizó por electroforesis en geles de agarosa de concentraciones que oscilaron entre 0.7 y 2% según el tamaño de los fragmentos que se deseaba analizar. Para la visualización del DNA el gel de agarosa contenía EtBr a 10 mg/ml. El electrolito empleado fue TBE 0.5X excepto en el caso de que fuera necesario extraer el DNA posteriormente del gel. En este caso se empleó como electrolito TAE 1X. La electroforesis se llevó a cabo a 80 V durante el tiempo estimado para una correcta separación de los fragmentos. Para la visualización del DNA los geles se fotografiaron con una cámara digital Kodak modelo DC290 mientras eran iluminados con un transiluminador de radiación UV. En el caso de muestras de RNA el procedimiento fue el mismo sólo que todo el material se lavó con SDS 10% y enjuagó con H₂O libre de RNAsas.

III.6.5 MARCAJE DE DNA PARA LA REALIZACIÓN DE SONDAS RADIATIVAS.

Las sondas radiactivas usadas para detectar secuencias de RNA por ensayos *Northern blot* se obtuvieron marcando los fragmentos de DNA adecuados con α -P³² dCTP con una actividad de 3000 Ci/mmol a 10 mCi/ml (Amersham). Se utilizó el sistema comercial "Rediprime™ II Random Prime Labelling System" (GE Healthcare) siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante.

Para purificar el DNA marcado y eliminar la radiactividad no incorporada se utilizaron columnas "Micro Bio Spin" (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante.

III.6.6 DETECCIÓN DE SECUENCIAS DE RNA POR HIBRIDACIÓN DE SONDAS RADIATIVAS.

Para el análisis de *Northern* se emplearon dos tipos de geles según el tipo de RNA a detectar:

III.6.6.1 RNA de alto peso molecular.

Las muestras (5 µg) de RNA se desnaturalizaron a 65°C durante 4 minutos en tampón de carga 5X (MOPS 80 mM, glicerol 20%, formamida 30%, formaldehído 7.4%, EDTA 5mM, NaAc 20mM, BPB 0.03%). A continuación se fraccionaron en un gel de agarosa al 1.5% en HEPES 20mM pH 7.8, EDTA 1mM, formaldehído 6%. Posteriormente se transfirieron a membranas de nylon positivamente cargadas (Roche) con tampón SSC

10X por capilaridad durante 16 horas. El RNA se fijó a la membrana por radiación ultravioleta (1200 julios) con un aparato Stratalinker 1800 (Stratagene). Después de 1 hora de prehibridación a 42°C en tampón de hibridación (formamida 25%, SSC 5X, SDS 0.02%, fosfato sódico 125 mM pH 6.5, DNA de esperma de salmón desnaturalizado 0.5 mg/ml y solución de Denhards 5X) se añade la sonda marcada en el mismo tampón. Se incubó 16 horas a 42°C. La membrana se lavó 2 veces a 65°C con SSC 2X y SDS 0.2%, otra con SSC 1X SDS 0.1% y un último lavado con SSC 0.1X y SDS 0.1%. La membrana se expuso sobre películas sensibles a rayos X. En caso de que fuera necesario volver a utilizar la membrana con nueva sonda la anterior se eliminó calentando a 80°C 30 minutos con SDS 0.5%.

III.6.6.2 RNA de pequeño tamaño.

Las muestras (20 µg) de sRNAs se desnaturalizaron por calentamiento a 95°C durante 4 minutos en presencia de formamida al 40%. Se enfriaron en hielo y se añadió 10 µl de buffer de carga 4X (Glicerol 50%, BPB 0.03%, TrisHCl 50 mM pH 7.7, EDTA 5mM). A continuación se fraccionaron en geles de poliacrilamida al 15% en TBE 0.5X y 7M de urea. Los geles fueron previamente embebidos en tampón TBE 0.5X aplicándoseles 180V durante unos 10 minutos. Una vez completada la electroforesis los geles se tiñeron en tampón TBE 0.5X con EtBr (10 mg/ml) para confirmar la normalización de la carga. Posteriormente el RNA fue transferido a una membrana de nylon positivamente cargada (Roche) por electrotransferencia semi seca empleando tampón TBE 0.5X y el aparato "Trans-*blot* semi dry transfer cell" de Bio-Rad a 400mA durante 1 hora. El RNA se fijó a la membrana del mismo modo que en el apartado anterior. Para todas las hibridaciones se usó el tampón PerfectHybTMPlus (SIGMA). Después de 1 hora de prehibridación a 38°C se añadió la sonda marcada radiactivamente (apartado III.6.5) y se incubó durante 16 horas a 38°C.

Los lavados se llevaron a cabo a 50°C en intervalos de 20 minutos. Se lavó la membrana dos veces con tampón SSC 2X, SDS 0.2%, el tercer lavado se hizo con SSC 1X SDS 0.1% y el último lavado se hizo con SSC 0.5X y SDS 0.1%. La membrana se expuso sobre películas sensibles a rayos X. Cuando se necesitó volver a hibridar la membrana con una nueva sonda se procedió del mismo modo que en el apartado anterior.

III.7 OLIGONUCLEÓTIDOS.

III.7.1 OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN PROCESOS DE CLONAJE DE VARIANTES DE PPV NO TRANSMISIBLES Y DETECCIÓN DE LOS MISMOS.

Los nucleótidos presentados en la tabla 4 son los empleados para introducir mutaciones en el genoma de PPV y detectar posteriormente dichas mutaciones por IC-RT-PCR.

III.7.2 OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN EL CLONAJE DE HC-PRO Y CP DE TEV EN LOS VECTORES DEL SISTEMA DE DOS HÍBRIDOS.

Para el estudio de dos híbridos de levaduras se diseñaron una serie de cebadores necesarios para introducir los cistrones de la CP y HC-Pro de TEV en la pauta de lectura adecuada. Del mismo modo se diseñaron también cebadores para generar variantes delecionadas de la CP de TEV (tabla 5).

Tabla 4. Nombre, secuencia y posición de los cebadores empleados para la detección de los distintos variantes de PPV por IC-RT-PCR y posterior digestión con enzima de restricción.

Nombre cebador ^a	Secuencia 5' 3' ^b	Posición ^c
dPPV500	AACGGTCCGGATGCAAT	500
rPPV2110	GCATAGCAAGGAAAATG	2110
dM13	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	-
rM13	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	-
dEITC	GAGAAATCACATGTCTGCAGTGTGCTCAAAAG	1222
rEITC	ACACTGCAGACATGTGATTTCTCCGCAAGGG	1245
dPAK	ATAAGTCCAGCAAAGAATCATTAG	1995
rPAK	CTAAATGATTCTTTGCTGGACTTAT	2020

^a Los cebadores designados con una primera letra “d” tienen secuencia homóloga a la de la hebra codificante y aquellos cuya primera letra corresponda a una “r” tiene la secuencia homóloga a la de la hebra complementaria.

^b La secuencia homóloga a la del virus aparece representada en azul. Los nucleótidos marcados en negro son los no complementarios a la secuencia de PPV responsables de la generación de las mutaciones EITC y PAK. Los cebadores universales dM13 y rM13 son complementarios a la secuencia del vector pBS flanqueando el sitio de clonaje múltiple.

^c Posición con respecto a la secuencia completa de: PPV (Laín *et al.*, 1989).

Tabla 5. Secuencia de los cebadores empleados para el clonaje de las regiones CP y HC-Pro de los distintos mutantes de TEV.

Nombre	Secuencia 5'-3' ^a
dNcoI _{hisHC}	T <u>TCC</u> <u>ATG</u> <u>GGG</u> <u>AGC</u> <u>GAC</u> <u>CAT</u> <u>CAC</u> <u>CAT</u> <u>CAC</u>
dNcoI _{HC}	T <u>TCC</u> <u>ATG</u> <u>GGG</u> <u>AGC</u> <u>GAC</u> <u>AAA</u> <u>TCA</u> <u>ATC</u> <u>TCC</u> <u>G</u>
rPstI _{HC}	TT <u>CTG</u> <u>CAG</u> <u>TTA</u> <u>CCC</u> <u>TCC</u> <u>AAC</u> <u>ATT</u> <u>GTA</u> <u>AGT</u> <u>T</u>
dXmaI _{HC}	T <u>TCC</u> <u>CCG</u> <u>GGG</u> <u>AGC</u> <u>GAC</u> <u>AAA</u> <u>TCA</u> <u>ATC</u> <u>TCT</u> <u>G</u>
dXmaI _{hisHC}	T <u>TCC</u> <u>CCG</u> <u>GGG</u> <u>AGC</u> <u>GAC</u> <u>CAT</u> <u>CAC</u> <u>CAT</u> <u>CAC</u>
rClaI _{HC}	TT <u>ATC</u> <u>GAT</u> <u>TTA</u> <u>CCC</u> <u>TCC</u> <u>AAC</u> <u>ATT</u> <u>GTA</u> <u>AGT</u> <u>T</u>
dCP _{XmaI}	TTC <u>CCG</u> <u>GGG</u> <u>AGT</u> <u>GGC</u> <u>ACT</u> <u>GTG</u> <u>GAT</u> <u>GCT</u> <u>G</u>
rCP _{SalISacI}	TTT <u>GAG</u> <u>CTC</u> <u>GTC</u> <u>GAC</u> <u>TCA</u> <u>CTG</u> <u>GCG</u> <u>GAC</u> <u>CCC</u> <u>TAA</u> <u>T</u>
dF1	TTC <u>CCG</u> <u>GGG</u> <u>TAC</u> <u>AAG</u> <u>CCA</u> <u>CAG</u> <u>CAA</u> <u>ATT</u> <u>GAT</u> <u>TTG</u> <u>TCA</u> <u>AAT</u> <u>GCT</u>
dF2	TTC <u>CCG</u> <u>GGG</u> <u>CCT</u> <u>AGG</u> <u>TAT</u> <u>GGT</u> <u>CTA</u> <u>CAG</u> <u>AGA</u> <u>AAC</u> <u>ATT</u> <u>ACA</u> <u>GAC</u>
rR1	TTT <u>GAG</u> <u>CTC</u> <u>GTC</u> <u>GAC</u> <u>TCA</u> <u>AGC</u> <u>ATT</u> <u>TGA</u> <u>CAA</u> <u>GTC</u> <u>AAT</u> <u>TTG</u> <u>CTG</u> <u>TGG</u>
rR2	TTT <u>GAG</u> <u>CTC</u> <u>GTC</u> <u>GAC</u> <u>TCA</u> <u>GTC</u> <u>TGT</u> <u>AAT</u> <u>GTT</u> <u>TCT</u> <u>CTG</u> <u>TAG</u> <u>ACC</u> <u>ATA</u> <u>CCT</u> <u>AGG</u>

^a En azul se muestra la secuencia homóloga a TEV. Los cebadores designados con una primera letra “d” tienen secuencia homóloga a la de la hebra codificante y aquellos cuya primera letra corresponda a una “r” tienen secuencia homóloga a la hebra complementaria. Las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción aparecen subrayadas.

III.8 CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS.

III.8.1 CLONES INFECCIOSOS NO TRANSMISIBLES.

El vector pICPPV 5.15 CPNAT es una variante de pICPPV 5.15 cuya CP tiene una delección de 15 aminoácidos. Para ello se intercambió una porción de N1b y de la CP procedente del vector pPPV NAT usando los sitios únicos para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sac*I presentes en las posiciones 7120 y 9210 del plásmido pICPPV.

Para la construcción de vectores virales con modificaciones por mutagénesis dirigida sobre HC-Pro 5.15, se generó un subclón en el que, dado su menor tamaño, se facilitara el clonaje de los fragmentos mutagenizados. Se empleó el vector Bluescript II KS (pBS) de Stratagene y se introdujo en él el fragmento comprendido entre las posiciones 1014 y 2904 procedente de pICPPV 5.15 *Spe*I usando los sitios únicos de restricción *Spe*I y *Dra*III. El plásmido resultante se denominó pBSHC.

El clon pICPPV EITC (Goytia *et al.*, 2006) procede del plásmido pICPPV 5.15 *Spe*I, diferenciándose de éste únicamente en un aminoácido perteneciente al dominio KITC de la proteína HC-Pro, implicado en transmisión. Mediante mutagénesis dirigida por PCR la lisina (K) fue sustituida por ácido glutámico (E). Del mismo modo se introdujo un nuevo sitio de restricción para la enzima *Pst*I, que permitiera la detección del cambio KITC→EICT

simplemente por digestión enzimática. La mutagénesis se realizó en el plásmido pBSHC que contiene el fragmento de PPV situado entre las dianas de las enzimas de restricción *SpeI* y *DraIII* en las posiciones 1012 y 2904 del plásmido pICPPV. Para llevar a cabo la mutagénesis se utilizaron los cebadores dM13, rM13, dEITC y rEITC (tabla 4). Los cebadores M13 son de secuencia homóloga al vector Bluescript y los cebadores dEITC y rEITC homólogos a la región comprendida entre las posiciones 1222 y 1245 del genoma de PPV. Estos últimos introducen los cambios nucleotídicos necesarios para producir las modificaciones deseadas. La presencia de la mutación fue confirmada por digestión enzimática y secuenciación.

El clon pICPPV PAK procede igualmente de pICPPV 5.15 *SpeI*, y se diferencia de éste únicamente en un aminoácido perteneciente al dominio PTK, en la parte central de la proteína HC-Pro, implicado igualmente en la transmisión del virus. Mediante mutagénesis dirigida por PCR la treonina (T) fue sustituida por alanina (A). El proceso de mutagénesis y clonaje en el clon completo fue idéntico al de pICPPV EITC empleándose en este segundo caso los cebadores dM13, rM13, dPAK y rPAK.

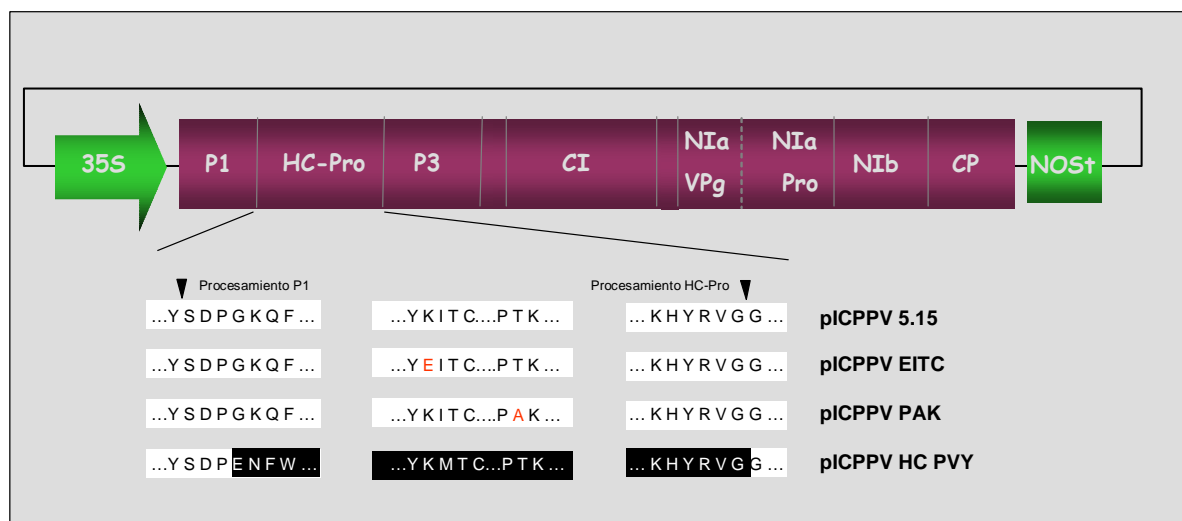


Figura 6. Esquema de los vectores virales derivados de pICPPV con modificaciones sobre HC-Pro. El esquema representa el clon completo con todos los cistrones presentes en el vector. Los bloques de color blanco corresponden a la secuencia procedente del virus PPV y los recuadros en negro a la procedente del virus PVY. Con un triángulo se indican los puntos de procesamiento de la poliproteína viral así como qué proteasa está implicada en esta función. Los cambios puntuales en los dominios KITC y PTK se muestran en rojo.

III.8.2 PLÁSMIDOS PARA EXPRESIÓN TRANSITORIA.

Para la expresión transitoria en plantas se empleó el vector binario pCAMBIA 2300 (CAMBIA, Canberra, Australia). En un primer paso se generó un plásmido intermedio en el

que se introdujo empleando las enzimas de restricción *Pst*I y *Hind*III el terminador de la transcripción del gen de la nopalina sintasa (NOST) procedente de pICPPV 5.15. En un segundo paso, empleando las dianas de restricción *Xma*I y *Pst*I, se introdujo el fragmento procedente de pICPPV 5.15 que contenía el promotor duplicado 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y la región 5' del virus PPV desde la posición 1 hasta la posición 2924 incluyendo 5'UTR, P1, HC-Pro y un fragmento de la región codificante de P3. El plásmido resultante se denominó pTRANS5'PPV 5.15. Todas las manipulaciones se llevaron a cabo de modo similar a los casos anteriores y siguiendo las técnicas moleculares habituales (Sambrook & Russel, 2001).

Del mismo modo se generaron también los vectores pTRANS5'PPV HCPVY, pPTRANS5'PPV EITC y pTRANS5'PPV PAK introduciendo la parte correspondiente a partir de los vectores pICPPV HCPVY (Martínez-García, 2000), pICPPV 5.15 EITC y pICPPV 5.15 PAK respectivamente.

También se empleó un cuarto vector de expresión transitoria denominado Vector Vacío (VV) en el que se había clonado exclusivamente el promotor duplicado 35S de CaMV y el terminador NOST sin ningún gen para expresar entre ambos (Vargas, 2005).

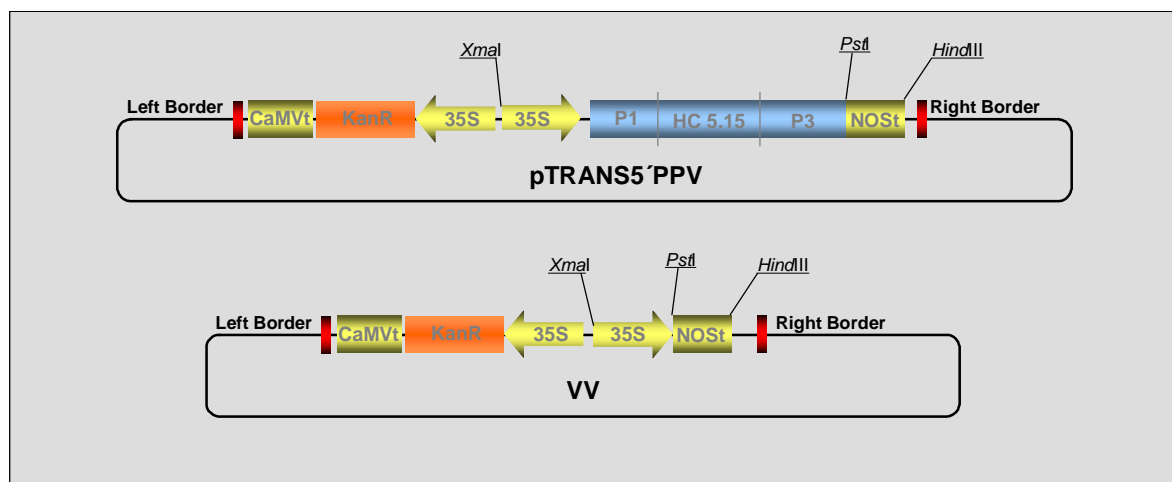


Figura 7. Esquema representativo de la construcción pTRANS5'PPV para expresión transitoria. En azul se ha representado la parte correspondiente al genoma de PPV. Se marcan las posiciones donde se encuentran las dianas para las enzimas de restricción empleadas en el proceso de clonaje.

III.8.3 PLÁSMIDOS EMPLEADOS EN LOS ENSAYOS DE DOS HÍBRIDOS DE LEVADURAS (YTHS).

Todos los clonajes se hicieron en los plásmidos pGADT7 y pGBKT7 (Clontech, Takara Bio) utilizando las enzimas de restricción únicas del sitio de clonaje múltiple (MCS) que correspondieron a cada caso.

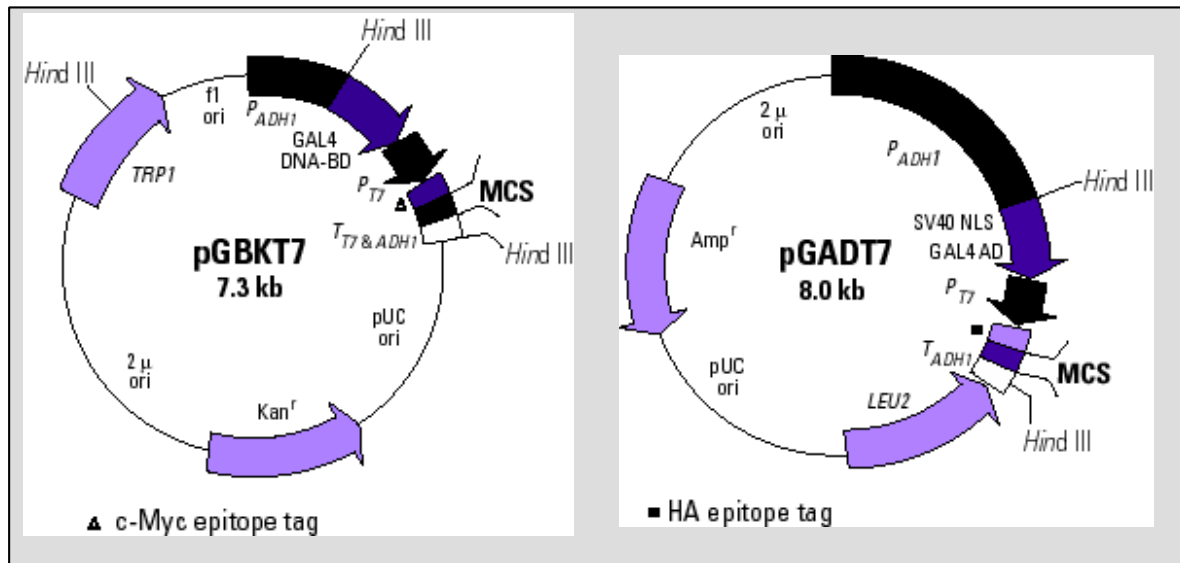


Figura 8. Esquema representativo de los vectores empleados para los estudios de YTHS. Se muestran en color azul los genes necesarios para la selección en bacterias y levaduras transformadas con los distintos vectores. Los genes de interés se clonaron como proteínas de fusión al dominio de unión a DNA (GAL4 DNA-BD) y al dominio de activación (GAL4 DNA-BD) en los MCS de cada vector.

El YTHS es una herramienta para el estudio *in vivo* de la interacción de proteínas empleando levaduras (Brent & Ptashne, 1985, Fields & Sternglanz, 1994). Este sistema está basado en la naturaleza modular de algunos activadores transcripcionales de eucariotas, entre los que se encuentran las proteínas GAL4 (Keegan *et al.*, 1986, Ma & Ptashne, 1987, Ma & Ptashne, 1988). Estos activadores tienen dos dominios bien diferenciados. El dominio de unión a DNA (BD) está encargado de posicionar la proteína sobre una secuencia específica de DNA que precede a los genes regulados por la misma. Un ejemplo de BD es el extremo amino terminal de la proteína GAL4 de levaduras (Laughon & Gesteland, 1984) así como la primera porción del represor LexA de *E.coli* (Ruden *et al.*, 1991). El dominio de activación (AD), una vez situado, interacciona con los demás componentes de la maquinaria transcripcional para permitir el inicio de la síntesis de RNA. Un ejemplo de dominio de activación es el extremo carboxilo terminal de la proteína GAL4 de levaduras (Keegan *et al.*, 1986).

En este trabajo se ha empleado el sistema comercializado por Invitrogen denominado Matchmaker 3. Se utilizan dos plásmidos de levadura distintos. pGADT7 codifica el dominio de activación y pGBKT7 codifica el dominio de unión a DNA. Se introduce la secuencia de las proteínas cuya interacción quiere ser analizada fusionada al extremo carboxilo de dichos dominios y, si las proteínas que estamos estudiando

interaccionan entre sí, el complejo formado por las proteínas quiméricas será capaz de unirse a la región promotora de tres genes delatores HIS3, ADE2 y *lacZ* que contienen el sitio de reconocimiento necesario permitiendo así que el dominio AD active la transcripción de estos genes (figura 9).

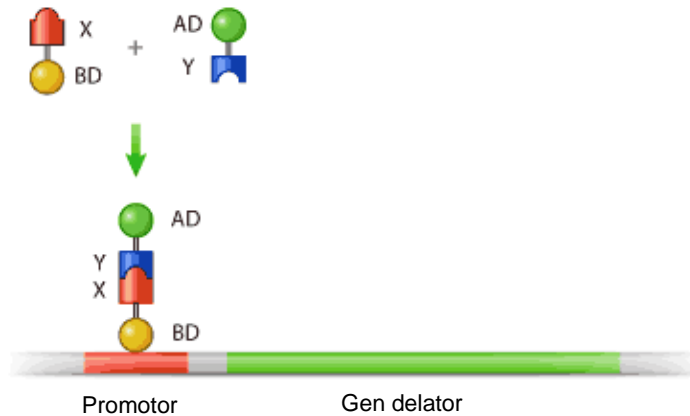


Figura 9. Esquema explicativo del sistema de los dos híbridos. Las proteínas fusionadas a los dominios BD y AD (X e Y) interaccionan entre sí formándose así un factor transcripcional activo y permitiendo la transcripción del gen delator.

Los cistrones para la CP y los distintos HC-Pro transmisibles y no transmisibles se extrajeron a partir de los clones completos infecciosos disponibles en el laboratorio (Llave *et al.*, 2002). Se escogió una selección de 5 mutantes de HC-Pro no transmisibles: G₃₄₃D, V₃₄₅E, A₃₄₆H, I₃₄₈D, K₃₅₈N y un mutante sí transmisible I₃₅₉M así como la variante de HC-Pro no modificada 7DA y la variante funcional unida a una cola de histidinas procedente del clon infeccioso HCH10. Asimismo, se diseñaron los cebadores dF1, dF2, rR1 y rR2 (capítulo III.6.2) para amplificar fragmentos de la CP de TEV con diversas deleciones en los extremos amino y carboxilo.

Todos los insertos fueron secuenciados para descartar la posibilidad de haber introducido alguna mutación durante el proceso de amplificación pro PCR y confirmar la inserción en el marco de lectura apropiado. Los plásmidos generados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 6. Plásmidos generados para el estudio de dos híbridos de levaduras con secuencias de HC-Pro procedentes de los distintos clones infectivos de TEV (A) y de CP con diferentes deleciones tanto en el extremo amino como carboxilo (B).

A)

Nombre ^a	Inserto
AD HC 7DA	HC-Pro de TEV clon 7DA entre las dianas <i>XmaI</i> y <i>ClaI</i>
BD HC 7DA	HC-Pro de TEV clon 7DA entre las dianas <i>NcoI</i> y <i>PstI</i>
AD HC HCH10	hisHC-Pro de TEV clon HCH10
BD HC HCH10	hisHC-Pro de TEV clon HCH10
AD HC I ₃₅₉ M	HC-Pro de TEV clon I ₃₅₉ M
BD HC I ₃₅₉ M	HC-Pro de TEV clon I ₃₅₉ M
AD HC G ₃₄₃ D	HC-Pro de TEV clon G ₃₄₃ D
BD HC G ₃₄₃ D	HC-Pro de TEV clon G ₃₄₃ D
AD HC V ₃₄₅ E	HC-Pro de TEV clon V ₃₄₅ E
BD HC V ₃₄₅ E	HC-Pro de TEV clon V ₃₄₅ E
AD HC A ₃₄₆ H	HC-Pro de TEV clon A ₃₄₆ H
BD HC A ₃₄₆ H	HC-Pro de TEV clon A ₃₄₆ H
AD HC I ₃₄₈ D	HC-Pro de TEV clon I ₃₄₈ D
AD HC I ₃₄₈ D	HC-Pro de TEV clon I ₃₄₈ D
AD HC K ₃₅₈ N	HC-Pro de TEV clon K ₃₅₈ N
BD HC K ₃₅₈ N	HC-Pro de TEV clon K ₃₅₈ N

B)

Nombre ^a	Inserto
AD CP TEV	CP de TEV entre las dianas <i>XmaI</i> y <i>SacI</i>
BD CP TEV	CP de TEV entre las dianas <i>XmaI</i> y <i>SalI</i>
AD F1 CP	Fragmento de CP con una deleción de 69 aminoácidos en el extremo amino
BD F1 CP	Fragmento de CP con una deleción de 69 aminoácidos en el extremo amino
AD F2 CP	Fragmento de CP con una deleción de 179 residuos en el extremo amino
BD F2 CP	Fragmento de CP con una deleción de 179 residuos del extremo amino
AD R1 CP	Fragmento de CP con una deleción de 183 residuos del extremo carboxilo
BD R1 CP	Fragmento de CP con una deleción de 183 residuos del extremo carboxilo
AD R2 CP	Fragmento de CP con una deleción de 74 residuos en el extremo carboxilo
BD R2 CP	Fragmento de CP con una deleción de 74 residuos en el extremo carboxilo

^a Nombre designado al vector resultante de la inserción de los distintos genes de HC-Pro en los vectores de doble híbrido. Las siglas AD designan a los vectores derivados de pGADT7 y las siglas BD designan a los vectores derivados de pGBKT7

III.9 MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS.

III.9.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE CULTIVOS DE *S. cerevisiae*.

Las proteínas totales procedentes de cultivos de la levadura *S. cerevisiae* se extrajeron por modificación del método de Volland y colaboradores (Volland *et al.*, 1994). Brevemente, se crecieron las levaduras en el medio de selección adecuado a 30°C y 225 rpm durante 16 horas. Se midió la densidad óptica de los cultivos y se normalizaron a una $DO_{595}=1$. Se centrifugaron 10 ml de cultivo durante 5 minutos a 1000 x g y temperatura ambiente. El sedimento se congeló en nitrógeno líquido. Posteriormente se descongeló en hielo y se resuspendió en 100 μ l de solución de lisis (NaOH 1.85M y β -mercaptoetanol al 7%). Se incubó en hielo durante 10 minutos tras los cuales se agregaron 100 μ l de TCA al 50% y se volvió a incubar otros 5 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugó a 12000 x g y temperatura ambiente por 10 minutos. El sedimento que contenía las proteínas precipitadas se resuspendió en TrisHCl 1M pH 7.5 y se dejó incubar 2-3 minutos a temperatura ambiente para neutralizar el pH. Se volvió a centrifugar 2 minutos a 12000 x g y se resuspendió el sedimento en tampón de carga para proceder a su electroforesis.

III.9.2 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS.

Las preparaciones de purificaciones de partículas virales, proteínas HC-Pro y extracto de proteínas de tejido vegetal o cultivo de levaduras se analizaron en geles discontinuos desnaturalizantes de acrilamida-bisacrilamida (29.2:0.8) (SDS-PAGE) del 4-10% o 4-12% según los tamaños de las proteínas que se deseaba detectar (Sambrook & Russel, 2001) empleando el equipo Mini-Protean III (Bio-Rad). Las muestras de proteínas y partículas virales purificadas se diluyeron en tampón de carga 2X (TrisHCl pH 6.8 50mM, DTT 100mM, SDS 2%, BPB 0.01%, glicerol 10%) y se hirvieron durante 5 min. Las muestras de tejido vegetal se trituraron en tampón de carga 2X a una concentración de 250 mg/ml y se hirvieron igualmente durante 5 min. La electroforesis se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante. Las proteínas se visualizaron tiñendo el gel en una solución de azul de Coomasie (0,25% azul de Coomasie R-250, 20% Metanol y 10% ácido tricloroacético en agua destilada). Los pesos moleculares de las proteínas se estimaron comparando su movilidad electroforética con la de marcadores de peso molecular conocido (Prestained SDS-PAGE standards, Low Range, Bio-Rad).

III.9.3 INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

La detección serológica de proteínas virales, separadas previamente por electroforesis, se llevó a cabo mediante ensayos de inmunoelectrotransferencia (*Western blot*).

Las proteínas, separadas previamente por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham Biosciences) mediante el sistema Mini Trans-*Blot* Cell (Bio-Rad), empleando tampón Tris-Glicina (Tris-HCl 25 mM pH 8.6, glicina 192 mM) con 20% de metanol y aplicando una corriente de 250mA durante 1 hora y 15 min (Towbin *et al.*, 1979). Tras la transferencia, las membranas se dejaron incubando durante 1 hora en tampón PBST con leche desnatada en polvo al 5% (PBST-leche) para bloquear las zonas de la membrana no ocupadas por las proteínas. A continuación, la membrana se incubó con el primer anticuerpo diluido en tampón PBST-leche. Tras una incubación durante toda la noche, la membrana se lavó 5 veces con PBST-leche, con una duración de 20 minutos en cada lavado. Posteriormente, esta membrana se incubó durante 1 hora con un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa diluido en tampón PBST-leche. Los anticuerpos y las diluciones utilizadas para la detección de las proteínas virales se especifican en la Tabla 7. Finalmente, la membrana se lavó 3 veces con tampón PBST y se procedió al revelado de la actividad de la enzima peroxidasa por quimioluminiscencia mediante el sistema ECL (Amersham Biosciences).

Tabla 7. Anticuerpos empleados en los inmunoensayos realizados.

	PROCEDENCIA	MAb/PAb ^a	DILUCIÓN ^b
α CP PPV A1	REALISA (ELISA, Durviz)	PAb	1:5000
α HC PPV	Martínez, 2001	PAb	1:500
α CP TEV	Ecogene Europe LTD	PAb	1:5.000
α histidinas	Qiagen Pentahis	MAb	1:500
α -AD	Clontech	MAb	0,5 mg/ml
α BD	Clontech	MAb	0,5 mg/ml
GARPO	Nordic Immunological laboratories	PAb	1:10.000
GAMPO	Nordic Immunological laboratories	PAb	1:10.000

^a Tipo de anticuerpo: Policlonal (PAb) o Monoclonal (MAb).

^b Dilución utilizada para cada anticuerpo en un ensayo *Western blot*.

III.9.4 DASI ELISA.

El sistema de detección serológico (ELISA) fue utilizado para determinar la presencia y acumulación de virus PPV en las plantas empleadas en los ensayos de transmisión con pulgones.

En la detección de partículas virales del virus PPV se utilizó el kit de la casa comercial REAL (Durviz), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Las placas de ELISA se tapizaron con un anticuerpo policlonal de conejo anti-PPV (A1-PPV) a una dilución 1/100 en tampón carbonato/bicarbonato pH 9,6, y se dejaron incubando durante 4 horas a 37°C ó 16 horas a 4°C. Tras la incubación se lavaron los pocillos con PBST antes de añadir las muestras.

Los extractos de planta se prepararon en un volumen 1/10 (p/v) de tampón de extracción (PBS conteniendo 2% de PVP y 0.2% de DIECA), y se clarificaron en una mini centrífuga a 5.000 rpm durante 5 min.

Tras añadir las muestras en los pocillos, la placa se incubó a 4°C durante 16 horas. Tras este período los pocillos se volvieron a lavar con PBST y se procedió a la incubación con el segundo anticuerpo (A2-PPV) durante 2 horas a 37°C. Este anticuerpo monoclonal se añadió a una dilución 1/1000 en PBS con 0,5% de leche desnatada en polvo. A esta incubación le siguió otra en iguales condiciones con un tercer anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con fosfatasa alcalina.

Para el revelado se utilizó PNP (SIGMA) como sustrato de la reacción a una concentración de 1 mg/ml en tampón sustrato (10% dietanolamina, 0,5 mM MgCl₂, pH 9,8). Los resultados de la reacción colorimétrica se midieron en un espectrofotómetro (EAR 400 SLT, Lab. Instruments) a una absorbancia de 405 nm (DO₄₀₅).

III.9.5. ANÁLISIS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA MEDIANTE FAR-WESTERN BLOT.

La membrana de nitrocelulosa con las proteínas fijadas tras la inmunoelectrotransferencia se dejó bloqueando durante 30 min en PBST con leche desnatada en polvo al 5% (PBST-leche) y se incubó posteriormente con la proteína seleccionada para la interacción. Las proteínas de incubación fueron partículas virales a una concentración de 1 µg/ml, o proteína HC-Pro a una concentración de 200 µg/ml en un volumen total de 5 ml en PBST-leche (Figura 11). Esta incubación se dejó toda la noche a 4°C. Transcurrido este tiempo, tras lavar las membranas 3 veces con PBST-leche, se realizó una incubación en PBST-leche con el correspondiente anticuerpo primario a la dilución indicada (Tabla 7). Para los controles de interacción inespecífica las membranas se incubaron directamente con el anticuerpo primario seleccionado en cada caso (ensayo tipo

Western-blot sin proteína interpuesta). El anticuerpo primario se incubó durante 4 horas a temperatura ambiente y con agitación suave. Tras esta incubación las membranas se lavaron de nuevo con PBST-leche tres veces y posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con fosfatasa alcalina, diluido en PBST-leche.

Esta última incubación se realizó durante 1 hora y media a temperatura ambiente con agitación suave. Las membranas se sometieron a 3 lavados con PBST y se procedió al revelado de la actividad peroxidasa por quimioluminiscencia mediante el sistema ECL (Amersham Biosciences).

III.9.6 COINMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS PRODUCIDAS IN VITRO.

III.9.6.1 Producción de proteínas *in vitro*.

Se empleó un sistema de traducción no celular para producir proteína a partir de plásmidos de DNA. Para ello se empleó el sistema de transcripción y traducción acopladas de Promega (TNT® Quick Coupled Transcription/Translation System). Este sistema libre de células se basa en lisado de reticulocito de conejo, y se emplea para producir la proteína a partir de DNA directamente. Las proteínas se produjeron tanto marcadas como no marcadas con radiactividad. El marcaje se realizó por adición al sistema de traducción de ³⁵S-metionina con una actividad de 1000 Ci/mmol a 15 mCi/ml (Amersham) siguiendo las instrucciones del fabricante (se añadieron 15 µCi totales en cada traducción).

III.9.6.2 Coinmunoprecipitación.

Se emplearon proteínas sintetizadas *in vitro*. El análisis se llevó a cabo utilizando el sistema de coinmunoprecipitación de Clontech (Matchmaker COIP kit) siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos estudios permiten confirmar por análisis *in vitro* los resultados obtenidos *in vivo* con el sistema de dos híbridos de levaduras para estudios de interacción de proteínas. Brevemente, se mezclan las dos proteínas producidas *in vitro* cuya capacidad de interacción se quiere analizar. Se incuba 1 hora a temperatura ambiente. Se añade 1 µg de anticuerpo específico para uno de las dos proteínas (cada proteína tiene fusionado un epítipo que permite la detección con los anticuerpos anti HA y anti c-myc respectivamente). Se incuba a temperatura ambiente de nuevo durante una hora. Se añade sefrosa conjugada con Proteína A y se incuba en agitación durante otra hora. La proteína A une específicamente inmunoglobulinas. Se centrifuga brevemente a 7000 rpm y

se lavan varias veces la *sef*rosa con tampón de lavado. Finalmente se resuspenden en tampón de carga de electroforesis (capítulo III.9.2) y se analiza por electroforesis la presencia de una o las dos proteínas.

III.10 PURIFICACION DE VIRUS Y PROTEÍNAS DE ORIGEN VIRAL.

III.10.1 PURIFICACIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES DE PPV.

Las partículas virales se purificaron a partir de tejido vegetal infectado, con síntomas, de plantas *N. benthamiana* descritos por Laín y colaboradores (Lain *et al.*, 1988) para PPV con algunas modificaciones (López-Moya *et al.*, 1994).

La concentración de las partículas virales en las preparaciones purificadas se determinó por densitometría a partir de análisis electroforético (apartado III.9.2) y tinción de las proteínas, comparando la banda correspondiente a la CP viral con un patrón de BSA de concentración conocida. Todo el proceso de purificación se realizó en frío y las partículas virales purificadas se guardaron congeladas a -20 ó a -80°C para períodos de almacenamiento superior a un mes.

Para todas las purificaciones virales se comprobó, mediante ensayos de transmisión por alimentación artificial a través de membrana, que las partículas virales purificadas estaban libres de proteína HC-Pro, y por tanto, no eran capaces de transmitirse a través de pulgón por sí solas. También se comprobó su capacidad infectiva inoculando 0,5 µg en plantas *N. benthamiana* y su capacidad de transmisión realizando ensayos de transmisión, por alimentación artificial a través de membrana, incluyendo en la solución de alimentación además de partículas virales, proteína HC-Pro purificada de TEV (capítulo III.10.2).

III.10.2 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA HC-PRO DE TEV.

La presencia de proteína HC-Pro en preparaciones purificadas se verificó en ensayos de *Western blot* (III.8.2) empleando anticuerpos monoclonales frente a la proteína HC-Pro y su concentración se determinó por densitometría a partir de análisis electroforético (apartado III.8.1) y tinción de las proteínas, comparando la banda correspondiente a HC-Pro con un patrón BSA de concentración conocida. El protocolo utilizado para purificar la proteína HC-Pro del aislado TEV-HCH10 (que contiene una cola de seis histidinas fusionadas al extremo amino terminal del HC-Pro, hisHC-Pro) se basa en el ya descrito (Blanc *et al.*, 1999) con las modificaciones detalladas por Ruíz-Ferrer y col. (Ruíz-Ferrer *et al.*, 2005). Este procedimiento es dependiente de las propiedades de unión de la cola de histidinas a una resina de níquel.

III.11 TRANSMISIONES.

En todos los experimentos de transmisión se utilizaron pulgones ápteros adultos que se sometieron a un período de ayuno de 1-2 horas previo al ensayo, en viales de vidrio. Cuando la fuente de adquisición del virus fue una hoja, ésta se lavó previamente con PBST, se aclaró con agua destilada y se secó perfectamente antes de su uso. Tras el período de adquisición, los pulgones fueron transferidos a plantas individuales cubiertas con vasos de vidrio para permitirles la inoculación, y transcurridas 16 horas, se retiraron los vasos y se pulverizaron con insecticida (PirimicarbTM (Zeltia) al 0,05% p/v). Tras dos semanas se observa la aparición de síntomas.

III.11.1 TRANSMISIÓN DE PLANTA A PLANTA.

Los pulgones fueron colocados sobre hojas cortadas de plantas, permitiéndoles un tiempo de adquisición de 5 min. A continuación, se transfirieron con un pincel a las plantas de ensayo, *N. benthamiana* de unos 2 cm. de altura (3-4 hojas verdaderas), en grupos de 10 pulgones aproximadamente por planta. Una vez dispuestos los pulgones en las plantas, éstas fueron cubiertas con vasos de vidrio para evitar desplazamientos indeseados de los insectos a otras plantas contiguas. Tras el periodo de inoculación las plantas fueron pulverizadas con insecticida.

III.11.2 TRANSMISIÓN MEDIANTE ADQUISICIÓN EN MEMBRANA.

Este tipo de transmisión se llevó a cabo utilizando un sistema de alimentación artificial de pulgones a través de membranas de Parafilm. Transcurrido el período de ayuno, los pulgones fueron transferidos, en grupos de 50-60 individuos, a cilindros opacos cuya abertura superior se cubrió con membranas estiradas de Parafilm. Sobre la membrana se dispuso una gota de solución alimenticia (40 μ l) que contenía 20% de sacarosa en tampón TSM (100mM Tris-H₂SO₄ pH 7,2, 20mM MgSO₄) y partículas virales purificadas (0,2 μ g/ μ l), pudiendo además incorporar proteína HC-Pro purificada (0,2 μ g/ μ l). Sobre la gota se colocó un cubreobjetos de vidrio y se iluminó desde arriba con luz blanca. De esta forma, los pulgones atraídos por la luz ascienden hacia la membrana y realizan pruebas de alimentación en las que pueden adquirir el virus durante un tiempo de adquisición de 5 min. Posteriormente los pulgones se transfirieron a plantas sanas (*N. benthamiana*) con la ayuda de un pincel en grupos de 10 pulgones por planta. Una vez dispuestos los pulgones en las plantas, éstas fueron cubiertas con vasos de vidrio para evitar desplazamientos indeseados

de los insectos a otras plantas contiguas. Tras el periodo de inoculación las plantas fueron pulverizadas con insecticida.

III.11.3 TRANSMISIÓN SECUENCIAL PLANTA-MEMBRANA.

En este tipo de transmisiones la alimentación del pulgón se hace en dos etapas. En una primera etapa se adquiere el factor HC-Pro. La adquisición tiene lugar en hojas de *N. benthamiana* que pueden haber sido agroinfiltradas con una construcción que permite la expresión transitoria de la proteína, o también pueden proceder de plantas infectadas con virus PPV 5.15 CP NAT (virus no es transmisible, y con una deleción en el extremo amino terminal de la CP que inhabilita la interacción con el factor HC-Pro). En la segunda etapa se adquiere el virus purificado a través de membrana.

Tras el periodo de pertinente ayuno los pulgones se disponen sobre las hojas de *N. benthamiana* y se produce un primer periodo de adquisición de 5 minutos en el que los pulgones tiene acceso al factor HC-Pro. Tras este primer paso los pulgones se transfieren, en grupos de 50-60 individuos, a cilindros opacos cuya abertura superior se cubre con membranas estiradas de Parafilm. Sobre la membrana se dispone una gota de solución alimenticia que contiene las partículas virales purificadas de igual modo que se hace en las transmisiones por membrana. Los pulgones adquieren en este segundo paso las partículas virales durante 5 minutos, tras los cuales se transfieren a plantas de ensayo (*N. benthamiana*) en grupos de 10 pulgones por planta aproximadamente. Una vez dispuestos los pulgones en las plantas, éstas son cubiertas con vasos de vidrio. Tras el periodo de inoculación las plantas se pulverizan con insecticida.

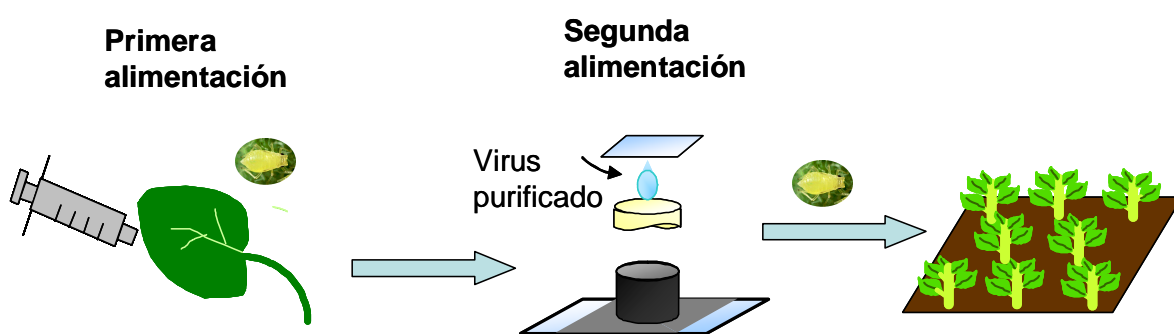


Figura 10. Esquema de transmisión secuencial. En una primera alimentación el pulgón se deposita sobre plantas de *N. benthamiana*. Tras 5 minutos de adquisición se pasan a cilindros opacos cubiertos de Parafilm a través del cual los pulgones se alimentan. Por último, se depositan los pulgones sobre las plántulas donde podrían inocular el virus en caso de que éste haya sido adquirido en la segunda alimentación.

III.11.4 TRANSMISIÓN SECUENCIAL PLANTA-PLANTA.

En este tipo de transmisiones los pulgones se alimentan también en dos etapas. Tras el periodo de pertinente ayuno se disponen los pulgones para la primera alimentación sobre plantas de *N. benthamiana* durante un periodo de 5 minutos. Transcurrido este primer periodo de adquisición los pulgones se pasan a una nueva planta de *N. benthamiana* en la que se produce un segundo periodo de adquisición y/o inoculación de 5 minutos. Tras el segundo periodo de adquisición los pulgones son transferidos en grupos de 10 pulgones a plantas sanas de *N. benthamiana*. Una vez dispuestos los pulgones en las plantas, éstas son cubiertas con vasos de vidrio. Tras el periodo de inoculación las plantas se pulverizan con insecticida y se espera unas dos semanas a la aparición de síntomas.

III.12 PROGRAMAS INFORMÁTICOS.

III.12.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para comparar los resultados de transmisión de dos grupos de datos se utilizó el *test* de Fisher. Si la comparación se realizaba entre tres o más grupos con repeticiones se empleó un análisis de la varianza (ANOVA) con un post-test de Tukey-Kramer. En todos los casos se utilizó el programa informático Graphpad Prism 4.

III.12.2 ESTUDIOS DE PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE PROTEÍNA CP DE TEV.

La predicción de la estructura secundaria de la CP de TEV se llevó a cabo a partir de la secuencia de aminoácidos mediante la utilización del servidor para predicción de estructuras secundarias JPRED (<http://www.compbio.dundee.ac.uk>). Este programa emplea a su vez otros programas informáticos que buscan secuencias conservadas comparando en bases de datos y utilizan estos resultados para realizar la predicción de estructura.

IV. Resultados

IV.1 ESTUDIO DE INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA EN VARIANTES NO TRANSMISIBLES DEL POTYVIRUS TEV.

El potyvirus TEV ha sido ampliamente utilizado como virus modelo para el estudio de la transmisión. La proteína HC-Pro se purifica siendo funcionalmente activa gracias a la adición de una cola de histidinas en el extremo amino terminal de la proteína y los niveles de transmisión obtenidos en laboratorio rondan el 40%. El laboratorio disponía de una colección de mutantes, con cambios puntuales en la región rica en cisteínas del extremo amino de la proteína HC-Pro. Todos estos mutantes eran infectivos y no transmisibles (Llave, 1999). Sin embargo, la causa de su falta de transmisibilidad no había sido analizada. Por este motivo se decidió estudiar mediante distintas aproximaciones la causa para la pérdida de función en estos mutantes.

IV.1.1 ESTUDIO DE INTERACCIÓN DE HC-Pro DE TEV CONSIGO MISMO Y CON LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA MEDIANTE ENSAYOS FAR WESTERN BLOT.

Las primeras hipótesis sobre la falta de funcionalidad en los mutantes se relacionan con una posible alteración de la capacidad de interacción consigo misma de la proteína HC-Pro así como con la proteína de la cápsida CP. Además, recientes estudios estructurales han probado que la forma de HC-Pro activa en transmisión es al menos un dímero (Ruíz-Ferrer *et al.*, 2005), por lo que la proteína HC-Pro debe estar interaccionando consigo misma para producir esta dimerización.

Resultados previos en nuestro laboratorio han permitido desarrollar un sistema de análisis de la interacción de la proteína HC-Pro de TEV consigo misma así como con la proteína CP mediante un ensayo que utiliza proteína purificada hisHC-Pro de TEV. En este tipo de ensayos se separan por electroforesis extractos de plantas infectadas con diferentes variantes virales, se transfieren las proteínas a una membrana de nitrocelulosa que se incuba primeramente con proteína purificada hisHC-Pro de TEV y después con un anticuerpo monoclonal anti histidinas, que detectará la unión de la proteína hisHC-Pro a proteínas presentes en el extracto de plantas. En el caso de plantas infectadas con virus TEV transmisible por pulgones se detectaría la interacción de la proteína con el HC-Pro y la CP propios del virus, observándose una banda a 53 KDa aproximadamente y otra a 33 KDa respectivamente (Fernández-Calvino, 2006). Se empleó esta técnica para detectar la interacción de proteína hisHC-Pro de TEV purificada y activa en transmisión con las proteínas presentes en el extracto de plantas infectadas con las distintas variantes de TEV

Resultados

transmisibles y no transmisibles. Puesto que la proteína CP de los mutantes de TEV no está modificada respecto a la variante viral 7DA, un primer resultado esperado debería ser la detección de la interacción de la proteína superpuesta con la proteína CP, en todos los casos. Sin embargo, tras numerosas repeticiones del ensayo sólo se detectó la interacción con la proteína CP en el caso de plantas infectadas con el virus transmisible HCH10. Tampoco se pudo detectar con claridad la interacción de hisHC-Pro con la proteína HC-Pro de las distintas variantes (figura 11).

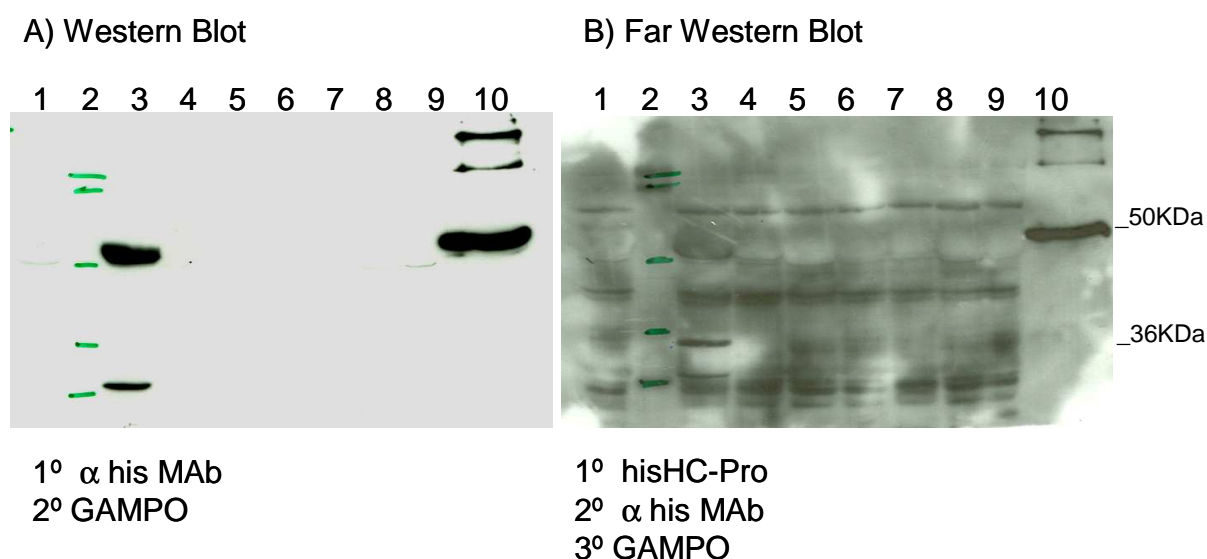


Figura 11. Ensayo de interacción de la proteína purificada hisHC-Pro de TEV con extractos de plantas infectadas con diferentes variantes del virus TEV separadas por SDS-PAGE. Las muestras se distribuyeron según se indica: Planta no infectada (carril 1), marcador molecular (carril 2), planta infectada con las variantes de TEV HCH10, 7DA, AH, GD, ID, IM y VE, respectivamente (carriles 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9) y proteína hisHC-Pro purificada (carril 10). Se separaron los extractos por electroforesis y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y analizaron por *Western* (A) o *Far Western blot* (B). Las incubaciones del ensayo *Far Western blot* se realizaron con proteína hisHC-Pro de TEV y con un anticuerpo monoclonal anti histidinas y un anticuerpo secundario GAMPO. En el ensayo control por *Western blot* (panel A) el paso de incubación con proteína HC-Pro fue omitido y las incubaciones se realizaron únicamente con los anticuerpos mencionados. El revelado se realizó empleando el sistema quimioluminiscente ECL.

El hecho de que la interacción entre la proteína CP de las diferentes variantes de TEV analizadas y la proteína hisHC-Pro purificada no se detecte en ensayos de *Far Western blot* podría estar indicando que estas variantes no fueran transmisibles por pulgón, ya que dicha interacción se considera una condición *sine qua non* para el proceso. En efecto ya se había demostrado la falta de transmisibilidad en los mutantes producidos en el laboratorio (Llave *et al.*, 2002), sin embargo, el clon completo 7DA se consideraba teóricamente

derivado de una cepa viral transmisible, la cepa denominada HAT, secuenciada por Allison y colaboradores (Allison *et al.*, 1986), por lo que la falta de interacción observada podría indicar que el clon disponible en el laboratorio no representara exactamente la cepa esperada. Para estudiar esta posibilidad se realizaron ensayos de transmisión de planta a planta usando tejido sistémico infectado con las variantes del virus TEV disponibles: la variante 7DA (supuestamente transmisible), y que decidimos denominar 7DA-CIB para distinguirla de otras construcciones similares, y la variante HCH10 (variante que porta 6 histidinas en el extremo amino terminal de la proteína HC-Pro y que también es supuestamente transmisible). Los resultados de la transmisión se muestran en la tabla 8. La variante de virus TEV HCH10 fue transmitida por pulgones con un porcentaje de transmisión del 33%, mientras que la variante 7DA-CIB no fue transmitida por pulgones.

Para analizar si la falta de transmisibilidad de esta variante 7DA-CIB se debía a modificaciones en la proteína CP (una posibilidad, puesto que la interacción entre CP y hisHC-Pro no se había detectado en los ensayos de *Far Western blot*) y no a posibles alteraciones en la región codificante de HC-Pro, se realizaron también transmisiones a través de membranas de Parafilm® empleando partículas virales purificadas y asistencia con proteína hisHC-Pro purificada y activa en transmisión procedente del clon HCH10. Los resultados de estas transmisiones pusieron de manifiesto que las partículas virales de TEV 7DA-CIB purificadas no eran transmitidas en ensayos de transmisión por membrana con la asistencia de proteína hisHC-Pro de TEV. Por el contrario, las partículas de virus purificado HCH10, incluidas como control positivo del experimento, sí que fueron transmitidas con la asistencia de proteína hisHC-Pro purificada (tabla 9).

Tabla 8. Transmisión por pulgones de planta a planta de los clones del virus TEV 7DA y HCH10.

<u>Adquisición</u>	<u>Transmisión</u>	
	Virus	Total ^a Porcentaje
TEV 7DA-CIB 10dpi	0/24	0%
TEV HCH10 10dpi	8/24	33.3%

Resultados

Tabla 9. Transmisión por pulgones de virus purificado TEV 7DA y HCH10 a través de membrana por asistencia de proteína purificado hisHC-Pro de TEV.

<u>Adquisición</u>		<u>Transmisión</u>	
Virus	hisHC-Pro	Total ^b	Porcentaje
TEV 7DA-CIB 0.2 mg/ml	0.2 mg/ml	0/24	0%
TEV 7DA 0.2 mg/ml	-	0/24	0%
TEV HCH10 0.2 mg/ml	0.2 mg/ml	23/24	95.8%
TEV HCH10 0.2 mg/ml	-	0/24	0%

En resumen, la variante TEV 7DA-CIB no fue transmitida en ensayos de planta a planta (tabla 8) ni en ensayos de transmisión por membrana (tabla 9), donde la proteína hisHC-Pro de TEV purificada sí fue capaz de asistir la transmisión del virus purificado HCH10. Por tanto, la falta de transmisibilidad del clon 7DA se podría deber a algún tipo de defecto en su proteína de la cápsida.

Para analizar esta posibilidad, se realizó una extracción de RNA total de plantas infectadas y posterior RT-PCR y secuenciación de la región de la cápsida de los virus 7DA-CIB y HCH10 empleados en los ensayos de transmisión. Se encontraron diferencias con las secuencias descritas previamente (Allison *et al.*, 1986, López-Moya *et al.*, 1999, Carrasco *et al.*, 2006). En la figura 12 se muestra un alineamiento de las secuencias observadas tras la RT-PCR y secuenciación de los clones de TEV 7DA-CIB y HCH10 y la secuencia publicada por Allison en 1986 (número GeneBank NC_001555) y por Carrasco y colaboradores para el aislado 7DA (número GeneBank DQ986288). La secuencia publicada por Allison en 1986 para el aislado HAT (*high aphid transmissible*) presenta dos motivos DAG en el contexto VDAGADAG, comenzando en posición +4 respecto al extremo amino terminal. La secuencia publicada por Carrasco en 2006 presenta en cambio en la misma posición VGAGVDAG para un clon completo de TEV denominado 7DA, coincidiendo con la secuencia encontrada por López-Moya y colaboradores (López-Moya *et al.*, 1999) para el mismo. El clon HCH10 secuenciado en nuestro laboratorio presentó la secuencia correspondiente a la publicada por Allison para el aislado HAT. Finalmente el clon de 7DA-CIB disponible en nuestro

laboratorio contenía una secuencia no descrita anteriormente, conteniendo en la posición equivalente la secuencia VDAGVDAG (figura 12). Asimismo, se observó que tanto los dos clones analizados por RT-PCR como la secuencia publicada por Carrasco presentaban un segundo cambio en la secuencia aminoacídica, esta vez en la región central de la proteína, produciéndose un cambio conservativo de aspártico a glutámico en la posición 136 respecto a la publicada por Allison (figura 12).

```

          10          20          30          40          50
CP TEV nt Allison NC001555 SGTVDAGADAGKKKDQKDDKVAEQASKDRDVNAGTSGTFSVPRINAMATK
CP TEV NT 7DA DQ986288 SGTVGAGVDAGKKKDQKDDKVAEQASKDRDVNAGTSGTFSVPRINAMATK
CP TEV nt 7DA-CIB SGTVDAGVDAGKKKDQKDDKVAEQASKDRDVNAGTSGTFSVPRINAMATK
CP TEV nt HCH10 SGTVDAGADAGKKKDQKDDKVAEQASKDRDVNAGTSGTFSVPRINAMATK

          60          70          80          90          100
CP TEV nt Allison NC001555 LQYPRMRGEVVVNLNHLGYPKQQIDLSNARATHEQFAAWHQAVMTAYGV
CP TEV NT 7DA DQ986288 LQYPRMRGEVVVNLNHLGYPKQQIDLSNARATHEQFAAWHQAVMTAYGV
CP TEV nt 7DA-CIB LQYPRMRGEVVVNLNHLGYPKQQIDLSNARATHEQFAAWHQAVMTAYGV
CP TEV nt HCH10 LQYPRMRGEVVVNLNHLGYPKQQIDLSNARATHEQFAAWHQAVMTAYGV

          110          120          130          140          150
CP TEV nt Allison NC001555 NEEQMKILLNGFMVWCIENGTSPNLNGTWVMDGEEQVSYPLKPMVENAQ
CP TEV NT 7DA DQ986288 NEEQMKILLNGFMVWCIENGTSPNLNGTWVMDGEEQVSYPLKPMVENAQ
CP TEV nt 7DA-CIB NEEQMKILLNGFMVWCIENGTSPNLNGTWVMDGEEQVSYPLKPMVENAQ
CP TEV nt HCH10 NEEQMKILLNGFMVWCIENGTSPNLNGTWVMDGEEQVSYPLKPMVENAQ

          160          170          180          190          200
CP TEV nt Allison NC001555 PTLRQIMTHFSDLAEAYIEMRNRERPYMPRYGLQRNITDMSLSRYAFDFY
CP TEV NT 7DA DQ986288 PTLRQIMTHFSDLAEAYIEMRNRERPYMPRYGLQRNITDMSLSRYAFDFY
CP TEV nt 7DA-CIB PTLRQIMTHFSDLAEAYIEMRNRERPYMPRYGLQRNITDMSLSRYAFDFY
CP TEV nt HCH10 PTLRQIMTHFSDLAEAYIEMRNRERPYMPRYGLQRNITDMSLSRYAFDFY

          210          220          230          240          250
CP TEV nt Allison NC001555 ELTSKTPVRAREAHMQKAAAVRNSGTRLFGLDGNVGTAEEDTERHTAHD
CP TEV NT 7DA DQ986288 ELTSKTPVRAREAHMQKAAAVRNSGTRLFGLDGNVGTAEEDTERHTAHD
CP TEV nt 7DA-CIB ELTSKTPVRAREAHMQKAAAVRNSGTRLFGLDGNVGTAEEDTERHTAHD
CP TEV nt HCH10 ELTSKTPVRAREAHMQKAAAVRNSGTRLFGLDGNVGTAEEDTERHTAHD

          260
CP TEV nt Allison NC001555 VNRNMHTLLGVRQ*
CP TEV NT 7DA DQ986288 VNRNMHTLLGVRQ*
CP TEV nt HCH10 VNRNMHTLLGVRQ*
CP TEV nt 7DA-CIB VNRNMHTLLGVRQ*

```

Figura 12. Alineamiento de las secuencias correspondientes a la región codificante de la proteína de la cápsida de TEV, publicadas por Allison y por Carrasco con las secuencias obtenidas por amplificación mediante RT-PCR y secuenciación de muestras de RNA total procedentes de plantas infectadas con los transcritos de los clones TEV 7DA-CIB y TEV HCH10 disponibles en el laboratorio. Los aminoácidos sombreados con el mismo color están conservados en las secuencias alineadas.

Para descartar la posibilidad de que este cambio amionoacídico presente en la secuencia del clon 7DA-CIB fuese una mutación puntual únicamente en ese clon se realizó una RT-PCR y secuenciación de la región de la CP en plantas infectadas con cada uno de los mutantes estudiados. Los datos de secuencia mostraron que ésta era idéntica en todos los mutantes a la secuenciada del clon 7DA-CIB. Para confirmar que esta secuencia ya estaba presente en el plásmido de DNA y no era resultado de algún fenómeno ocurrido durante la transcripción también se secuenció la región codificante de la CP en el DNA plasmídico de los clones de TEV 7DA-CIB, HCH10 y de los distintos mutantes, volviéndose a observar los mismos resultados.

Con el fin de confirmar que la interacción entre la CP del virus 7DA-CIB y moléculas activas de HC-Pro está inhabilitada también se repitió el ensayo de *Far Western blot* empleando partículas de virus purificado 7DA-CIB y HCH10 en lugar de extractos de plantas infectadas con dichos virus. Se separaron por electroforesis muestras de virus purificado y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Tras incubar con proteína hisHC-Pro purificada y revelar la interacción se observó que las partículas purificadas de virus HCH10 sí interaccionaron con hisHC-Pro mientras que las partículas purificadas de virus 7DA-CIB no lo hicieron (datos no mostrados).

IV.1.2 ESTUDIO DE INTERACCIÓN DE HC-PRO DE TEV CON LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DEL VIRUS.

El análisis por *Far Western blot* ha permitido detectar una nueva modificación en el cistron de la proteína CP que inhabilita la interacción entre la proteína CP y proteína purificada hisHC-Pro. Para poder estudiar la interacción de la proteína HC-Pro de todas las variantes de TEV disponibles en nuestro laboratorio se buscó un sistema alternativo de análisis de interacciones proteína-proteína. Resultados previos en nuestro laboratorio habían demostrado la funcionalidad de moléculas de HC-Pro expresadas en un sistema heterólogo utilizando la levadura metilotrónica *Pichia pastoris* (Ruíz-Ferrer *et al.*, 2004). Este resultado indicaba que la proteína HC-Pro producida en levaduras retiene su funcionalidad. Por este motivo se escogió el sistema de dos híbridos de levaduras para el estudio de las interacciones de la proteína HC-Pro procedente de los diferentes clones transmisibles y no transmisibles con la proteína de la cápsida.

IV.1.2.1 Estudio de la interacción de las variantes de HC-Pro de TEV con la proteína de la cápsida del virus mediante el sistema de dos híbridos de levaduras.

Con el fin de analizar si las proteínas de HC-Pro de TEV modificadas en su extremo amino terminal procedentes de los clones no transmisibles generados previamente en nuestro laboratorio (Llave *et al.*, 2002) eran capaces de interaccionar con la proteína CP del mismo virus, se llevó a cabo un estudio basado en el sistema de dos híbridos de levaduras (YTHS). La interacción entre la proteína HC-Pro y la proteína CP es necesaria para que se produzca la transmisión del virus y por tanto una posible causa de la pérdida de transmisión de estos mutantes de TEV podría ser la pérdida de la interacción de estas proteínas de secuencia modificada con la proteína CP del virus. Para clonar la proteína CP de TEV se empleó el clon completo HCH10 cuya secuencia es idéntica, como ya hemos indicado (figura 11), a la publicada para el aislado altamente transmisible por pulgones publicada por Allison (GeneBank NC_001555). Las distintas proteínas HC-Pro con diferentes modificaciones en el extremo amino terminal se extrajeron de los clones completos disponibles en el laboratorio (figura 13). De este modo se generaron todos los plásmidos necesarios para el estudio.

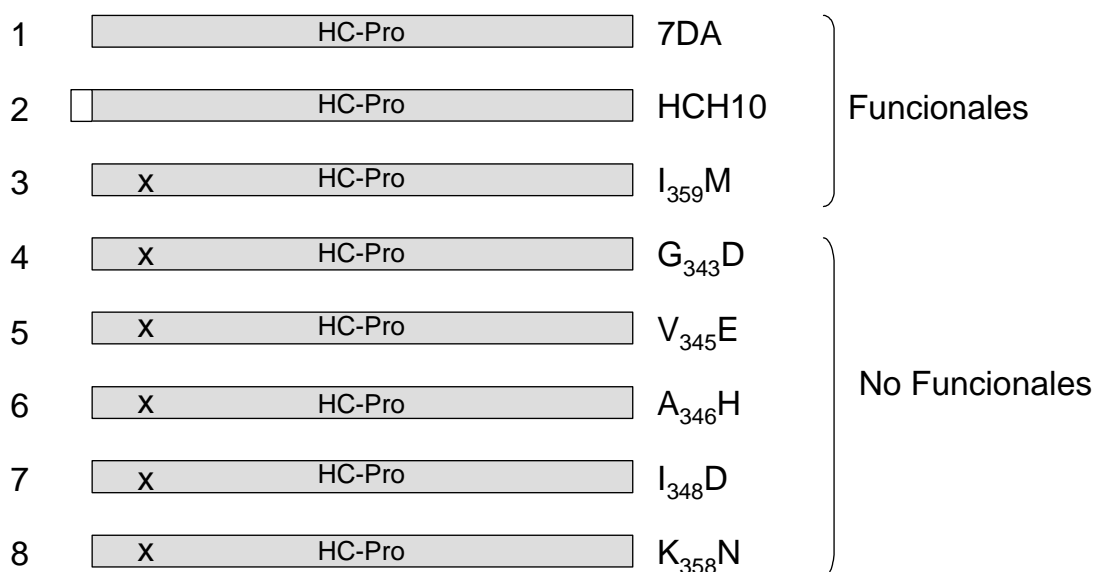


Figura 13. Representación esquemática de las variantes de proteína HC-Pro de TEV empleadas en los estudios de dos híbridos (la numeración empleada hace referencia a la posición en la poliproteína). 1. Proteína del virus no modificado. 2. Proteína con una inserción de 6 histidinas en el extremo amino que permite la purificación por cromatografía de afinidad de la proteína. 3. Proteína con el cambio Ile por Met en el dominio conservado KITC. 4. Proteína HC-Pro con el cambio Gly por Asp en la posición 343. 5. HC-Pro con el cambio Val por Glu en la posición 345. 6. HC-Pro con el cambio Ala por His en la posición 346. 7. HC-Pro con el cambio Ile por Asp en la posición 348. 8. Proteína HC-Pro con el cambio Lys por Asn en el dominio conservado KITC. Las distintas proteínas se han separado en dos categorías. Las denominadas funcionales en transmisión son aquellas que cuando introducidas en el clon completo infeccioso producen un virus transmisible por pulgones y las no funcionales producen un virus no transmisible.

El dominio PTK de la región central de la proteína HC-Pro ha sido implicado en la interacción entre la proteína HC-Pro y la proteína CP (Peng *et al.*, 1998). El cambio de alanina por treonina en este dominio generando un dominio PAK anula esta interacción. Por este motivo se decidió generar una proteína HC-Pro modificando este dominio. Esta proteína HC-Pro modificada se podría emplear como control negativo de interacción puesto que la modificación alanina por treonina debería anular la interacción entre HC-Pro y CP según se desprende del trabajo publicado por Peng y colaboradores.

El sistema de dos híbridos de levaduras se basa en la naturaleza modular de algunos activadores transcripcionales de eucariotas (ver capítulo II.8.3). Si las proteínas analizadas interaccionan entre sí, se produce la activación de diversos promotores transcripcionales que permiten detectar la interacción. Este estudio requiere el uso de proteínas de fusión en las que se fusionan fragmentos de un activador transcripcional a las proteínas cuya capacidad de interacción se quiere analizar. El análisis se llevó a cabo utilizando la cepa de levadura AH109 que tiene los genes delatores HIS3, ADE4 y lacZ bajo el control de tres

promotores independientes. Esta cepa permite el uso de varios genes delatores al mismo tiempo, facilitando la discriminación entre falsos positivos e interacciones verdaderas. En un primer paso se transformó esta cepa de *S. cerevisiae* con los dos híbridos correspondientes en cada caso y se analizó el crecimiento de la levadura en medio mínimo SD –Leu–Trp. En estas condiciones de selección sólo crecen aquellas levaduras transformadas con los dos híbridos pGAD y pGBK simultáneamente. Posteriormente las colonias que crecieron en medio SD –Leu–Trp se pasaron a un medio de selección de interacción SD-WAHL, empleando histidina y adenina como agentes para la selección de interacción y manteniendo la ausencia de leucina y triptófano para mantener los híbridos por presión de selección. Si existe interacción entre los productos de fusión codificados por los plásmidos pGAD y pGBK se activará el factor de transcripción de los genes delatores y se observará crecimiento en el medio de selección dado que se activa la transcripción de los genes HIS3 y ADE2 y la levadura puede sintetizar este aminoácido y este nucleótido por sí misma. Como controles de la interacción se emplearon productos de fusión ya estudiados y ajenos a nuestro estudio: los productos de fusión pGAD-T (antígeno T largo del poliovirus SV40) y pGBK-p53 (proteína p53 de origen murino) cuya interacción es conocida en el sistema (Iwabuchi *et al.*, 1993, Li & Fields, 1993), y como control negativo se usaron los productos de fusión pGAD-T y pGBK-lam (proteína lamina C de origen humano). La proteína lamina C no forma complejos ni interacciona con un gran número de proteínas estudiadas, por lo que se recomienda su uso como control negativo de interacción (Bartel *et al.*, 1993).

La interacción de la proteína CP de potyvirus consigo misma, así como con la proteína HC-Pro en potyvirus ha sido descrita en varios sistemas (Blanc *et al.*, 1997, Guo *et al.*, 2001) incluyendo el sistema de dos híbridos de levaduras para otros potyvirus. Se analizó la interacción de la proteína CP de TEV con todas las variantes de HC-Pro de TEV, así como la interacción de la CP consigo misma. La proteína CP interacciona consigo misma para formar la partícula viral durante la encapsidación del virus, por lo que resultaba un buen control positivo interno del sistema. Asimismo se analizó la interacción de la proteína HC-Pro de TEV HCH10 consigo misma como un segundo control puesto que se sabe que la proteína hisHC-Pro de la variante de TEV HCH10 activa en transmisión es al menos un dímero (Ruíz-Ferrer *et al.*, 2005).

Resultados

Tabla 10. Análisis de las interacciones entre CP y HC-Pro de TEV por el sistema de dos híbridos de levaduras. Crecimiento en medio de selección de interacción SD-WAHL.

AD ^a	BD ^b	SD-WAHL ^c
HC-Pro 7DA	CP	-
HC-Pro HCH10	CP	-
HC-Pro I ₃₅₉ M	CP	-
HC-Pro G ₃₄₃ D	CP	-
HC-Pro V ₃₄₅ E	CP	-
HC-Pro A ₃₄₆ H	CP	-
HC-Pro I ₃₄₈ D	CP	-
HC-Pro K ₃₅₈ N	CP	-
HC-Pro T ₆₁₅ A	CP	-
CP	HC-Pro 7DA	-
CP	HC-Pro HCH10	-
CP	HC-Pro I ₃₅₉ M	-
CP	HC-Pro G ₃₄₃ D	-
CP	HC-Pro V ₃₄₅ E	-
CP	HC-Pro A ₃₄₆ H	-
CP	HC-Pro I ₃₄₈ D	-
CP	HC-Pro K ₃₅₈ N	-
CP	HC-Pro T ₁₂₃ A	-
HC-Pro HCH10	HC-Pro HCH10	+
CP	CP	-
Antígeno T	P53	+
Lam C	P53	-

^a Proteínas de fusión generadas en el plásmido pGADT7.

^b Proteínas de fusión generadas en el plásmido pGBKT7.

^c Crecimiento en medio selectivo SD-WAHL.

Las levaduras se transformaron con las dos construcciones correspondientes a cada caso. Crecieron en un medio selectivo SD-Leu-Trp en el que se seleccionan las levaduras transformadas simultáneamente con los dos vectores. Posteriormente colonias aisladas que crecieron en este medio se pasaron al medio de selección de interacción SD-WAHL. Los resultados se muestran en la tabla 10. No se observó crecimiento en este medio selectivo en ninguno de los casos en los que estuvo implicada la proteína CP. No se observó interacción consigo misma, ni con ninguna de las proteínas de fusión de HC-Pro analizadas. Sin embargo, la interacción de la proteína hisHC-Pro consigo misma sí fue detectada. Los ensayos se realizaron en las dos orientaciones posibles introduciendo la secuencia codificante de cada proteína en cada uno de los dos vectores, y sin embargo la interacción no se observó en ninguna de las dos orientaciones.

Con el fin de relajar las condiciones de selección de la interacción se prepararon placas con medio empleando únicamente el gen delator *HIS3*. Sin embargo los resultados no fueron satisfactorios puesto que todas las levaduras, incluido el control negativo pGAD

lam/pGBK p53, mostraron el mismo comportamiento en este medio. A tiempos largos de incubación se apreciaba un leve crecimiento de la levadura en todos los casos. Por tanto el uso de un único gen delator no permite en nuestro caso detectar interacciones.

Una posibilidad que explicaría la observada falta de interacción en el sistema es que los productos de fusión no se expresen. Para confirmar si había una correcta expresión de las proteínas de fusión en la levadura se realizó un ensayo *Western blot*. Se extrajeron las proteínas totales de cultivos de levadura en medio SD-Leu-Trp y se analizó la producción de las proteínas de fusión en los extractos. Se utilizaron anticuerpos específicos de los dominios de activación y unión a DNA así como un anticuerpo policlonal específico de la CP de TEV. La expresión de las proteínas de fusión procedentes de los plásmidos derivados de pGADT7 fue en todos los casos baja e incluso indetectable en algunos casos. Se necesitaron tiempos de exposición mucho más largos que para detectar las proteínas de fusión procedentes de todos los plásmidos derivados de pGBKT7.

En la literatura se han descrito numerosos casos en los que interacciones funcionales no pueden ser detectadas por el sistema de los dos híbridos. A menudo la generación de variantes delecionadas de la proteína facilita el estudio de las interacciones entre proteínas. Por este motivo se decidió hacer un análisis de predicción de estructura secundaria de la proteína CP de TEV y generar variantes delecionadas en regiones no estructuradas de la proteína para repetir los estudios de interacción de la proteína CP consigo misma así como con HC-Pro de TEV y sus variantes no transmisibles. Para ello empleamos el servidor disponible en Internet denominado JPRED. El sistema hace una búsqueda en bases de datos con la secuencia de la proteína cuya estructura secundaria queremos predecir para encontrar proteínas homólogas, realiza un alineamiento múltiple de secuencias y determina las regiones conservadas. Con estos datos y utilizando un segundo algoritmo denominado JNET predice la estructura secundaria de la proteína que estamos estudiando. Cuando se empleó este programa para la secuencia de la proteína CP de TEV, se obtuvo el resultado que se presenta a continuación (figura 14), donde se muestra la secuencia de la proteína y en la fila inferior la estructura predicha por el programa. La letra H hace referencia a hélices alfa y la letra E hace referencia a láminas beta. El aminoácido en el que comienza o termina prematuramente la proteína para las variantes delecionadas generadas en nuestro trabajo se ha remarcado con una flecha sobre el residuo que indica el comienzo (→) o terminación (←) del fragmento proteico estudiado (figura 14).

Resultados

```

SGTVDAGADAGKKKDQKDDKVAEQASKDRDYNAGTSGTFSVPRINAMATKLQYPRMRGEVVVNLNHLGLY
-----EE-----EE-----EEHHHHHH--
→      ←
KPQQIDLNSNARATHEQFAAWHQAVMTAYGVNEEQMKILLNGFMVWCIENGTSPNLNGTWVMMGDGEDQVSY
-----HHHHHHHHHHHHHH--HHHHHH--EEEEEE-----EEEE-----EEE-
                                           →      ←
PLKPMVENAQPTLRQIMTHFSDLAEAYIEMRNRERPYPYRGLQRNITDMSLSRYAFDFYELTSKTPVRA
--HHH-----HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH--HHHH--HHHHHHHH--EEE-----HHH

REAHMQMKAAAVRNSGTRLFGLDGNVGTAEEDTERHTAHDVNRNMHTLLGVRQ
HHHHHHHHHHHH--EEE-----EE-----EE-----

```

Figura 14. Secuencia de la proteína de la cápsida CP y predicción de su estructura secundaria mediante el programa JPRED. La letra H simboliza hélices alfa y la letra E láminas beta. Las regiones para las que no hay predicción de su estructura secundaria se marcan con guiones. También se han señalado con una flecha orientada a la derecha los residuos en los que comienza cada variante de delección del extremo amino terminal y con una flecha orientada a la izquierda las variantes truncadas por delección en el extremo carboxilo.

Se generaron proteínas en las que aproximadamente un tercio y dos tercios de las regiones amino y carboxilo terminal fueron delecionadas. Las delecciones se llevaron a cabo en puntos donde no había regiones con predicción de estructura secundaria. Un esquema de las delecciones se muestra a continuación (figura 15).

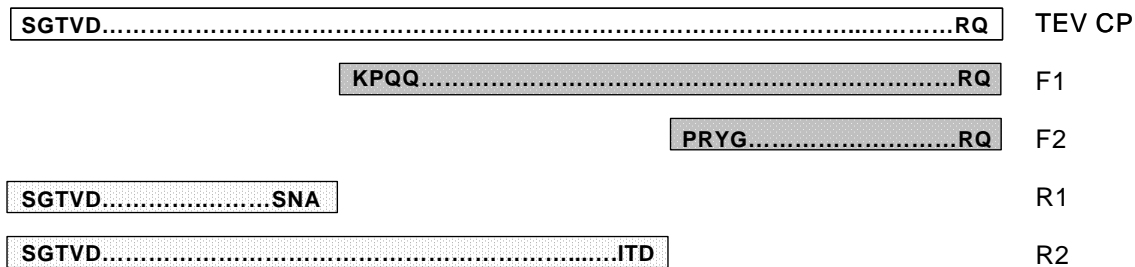


Figura 15. Esquema representativo con las variantes delecionadas de la CP de TEV. Se señala la secuencia aminoacídica por la que comienza y termina el fragmento considerado en cada caso.

La tabla 11 muestra el resultado de todas las combinaciones analizadas para la interacción de la proteína CP y las variantes F1, F2, R1 y R2 consigo mismas y con proteína HC-Pro activa en transmisión (derivada de la variante 7DA-CIB). Se analizó el crecimiento de la levadura transformada con los vectores correspondientes en cada caso sobre medio SD-WAHL. No se detectó interacción de las diferentes variantes de CP consigo mismas ni tampoco con proteína HC-Pro. Únicamente en el caso de la proteína R2 se pudo observar interacción consigo misma, no así con proteína HC-Pro. Además el crecimiento de la levadura transformada con R2 fue más lento que el control positivo del sistema, indicando una interacción débil.

Tabla 11. Análisis de la interacción de las diferentes versiones truncadas de la proteína CP de TEV consigo misma como con la proteína HC-Pro de TEV activa en transmisión por el sistema de dos híbridos de levaduras. Crecimiento de la levadura en medio de selección de interacción SD-WAHL.

AD ^a	BD ^b	SD-WAHL ^c
Antígeno T	p53	+
Antígeno T	Iam C	-
HC-Pro 7DA	HC-Pro 7DA	+
HC-Pro 7DA	CP	-
CP	HC-Pro 7DA	-
CP	CP	-
F1	F1	-
F2	F2	-
R1	R1	-
R2	R2	+/-
F1	CP	-
CP	F1	-
F2	CP	-
CP	F2	-
R1	CP	-
CP	R1	-
R2	CP	-
CP	R2	-
F1	HC-Pro 7DA	-
HC-Pro 7DA	F1	-
F2	HC-Pro 7DA	-
HC-Pro 7DA	F2	-
R1	HC-Pro 7DA	-
HC-Pro 7DA	R1	-
R2	HC-Pro 7DA	-
HC-Pro 7DA	R2	-

^a Proteínas de fusión generadas en el plásmido pGADT7.

^b Proteínas de fusión generadas en el plásmido pGBKT7.

^c Crecimiento en medio selectivo SD-WAHL.

A la vista de los resultados obtenidos con el sistema de dos híbridos para las variantes delecionadas de la CP de TEV parece confirmarse que este sistema no permite detectar la interacción entre CP y HC-Pro, imprescindible como control positivo para poder estudiar las variantes de HC-Pro modificadas procedentes de los clones infecciosos no transmisibles por pulgón.

IV.1.2.2 Estudio de la interacción de las diferentes proteínas de HC-Pro de TEV no transmisibles con la proteína CP del mismo virus mediante inmunoprecipitación de proteínas producidas *in vitro*.

Se realizaron estudios de inmunoprecipitación de las proteínas producidas *in vitro* para estudiar la interacción de las mismas. El sistema de dos híbridos de levadura permite la expresión de las diferentes proteínas fusionadas a epítomos específicos (figura 16). De este modo, mediante el uso de anticuerpos específicos para estos epítomos se pueden coimmunoprecipitar las proteínas y por tanto estudiar la capacidad de interacción de estas proteínas expresadas *in vitro* ya que, si las proteínas interaccionan entre sí, pueden precipitar simultáneamente empleando únicamente el anticuerpo específico de uno de los dos epítomos.

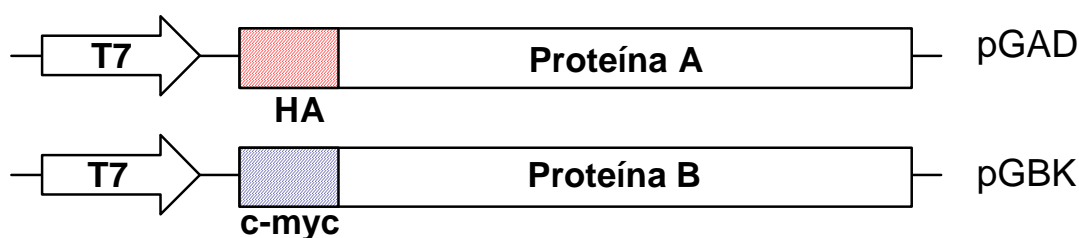


Figura 16. Representación esquemática de las construcciones pGAD y pGBK a partir de las que se realiza la transcripción con T7 polimerasa y traducción de las proteínas. Las proteínas producidas en el plásmido pGAD presentan una fusión en su extremo amino terminal con el epítomo HA y las producidas en el plásmidos pGBK una fusión con el epítomo c-myc.

Se estudió la interacción de la proteína CP de TEV con las diferentes variantes transmisibles y no transmisibles de la proteína HC-Pro de TEV. También se analizaron como controles las interacciones de CP y HC-Pro activo en transmisión consigo mismos, puesto que se conoce la capacidad de oligomerización de ambos. Se expresaron todas las proteínas marcadas radiactivamente con metionina S^{35} excepto en el caso en el que se analizó la interacción de las proteínas CP y HC-Pro consigo mismas. En estos casos sólo se realizó marcaje radiactivo (señalado en las figuras 17 y 18 como un asterisco) para aquella proteína que no presentara el epítomo correspondiente al anticuerpo con el que se realiza la precipitación. Se utilizaron anticuerpos correspondientes a uno de los dos epítomos y se analizó la interacción.

Los resultados de las inmunoprecipitaciones usando los anticuerpos policlonal α HA y monoclonal α c-myc revelaron problemas de especificidad. En concreto, la proteína CP sin el epítipo HA precipitaba en presencia del anticuerpo anti HA (figura 17), y lo mismo ocurría cuándo se empleó el anticuerpo anti c-myc (figura 18), por lo que no es posible determinar la capacidad de interacción de CP y HC-Pro de TEV entre sí.

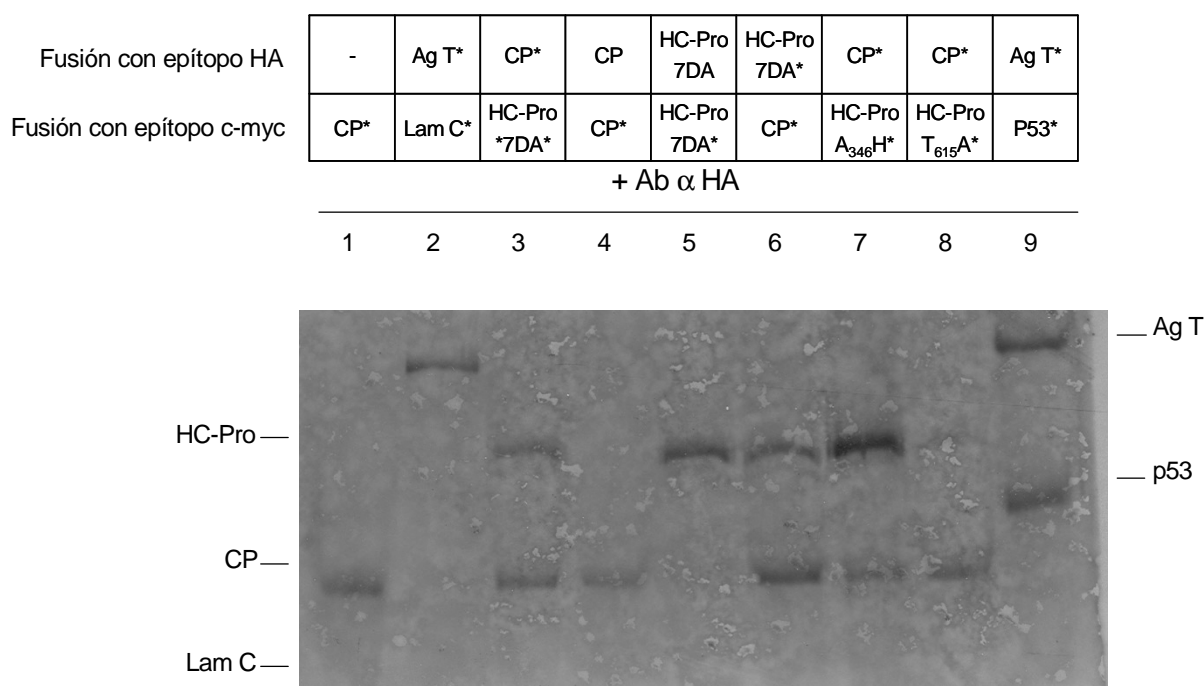


Figura 17. Análisis por SDS-PAGE de la coimmunoprecipitación de las proteínas HC-Pro y CP de TEV. En la tabla sobre la imagen se indican en cada columna las proteínas incubadas en el carril que se analiza debajo. Para precipitar las proteínas se empleó el anticuerpo α HA. Como controles se emplearon dos proteínas que no interaccionan entre sí (carril 2) y dos proteínas que sí interaccionan (carril 9). La identificación por tamaño de las proteínas se indica en los márgenes derecho e izquierdo de la figura. Para control de especificidad se empleó proteína CP sin el epítipo para precipitar (carril 1). Para los estudios de interacción de CP y HC-Pro consigo mismos se expresó proteína radiactiva y no radiactiva, indicándose mediante un asterisco la presencia de marcaje (*).

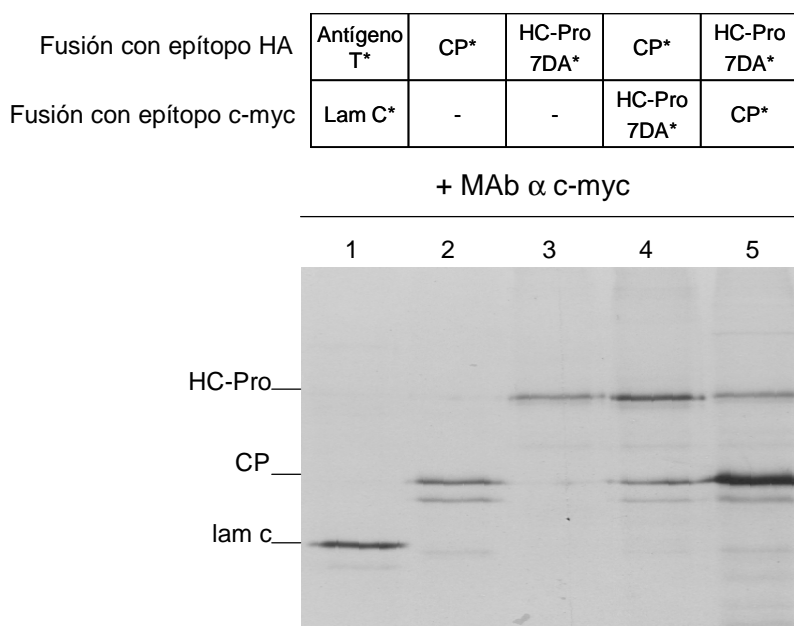


Figura 18. Análisis por SDS-PAGE de la coimmunoprecipitación de las proteínas HC-Pro y CP de TEV. En la tabla sobre la imagen se indican en cada columna las proteínas incubadas en el carril que se analiza debajo. Para precipitar las proteínas se empleó el anticuerpo α c-myc. La identificación por tamaño de las proteínas se indica en el margen derecho de la figura. Se observa que en ausencia de proteína unida al epítipo c-myc, la proteína CP unida a epítipo HA también precipita con este anticuerpo (carril 2). Lo mismo ocurre para la proteína HC-Pro (carril 3). El control con dos proteínas ajenas al estudio de las que se conoce que no interactúan entre sí se muestra en el carril 1.

IV.1.3 ESTUDIO DE INTERACCIÓN DE LA PROTEÍNA HC-Pro DE TEV CONSIGO MISMA.

IV.1.3.1 Estudio de interacción del factor HC-Pro consigo mismo por el sistema de dos híbridos.

Dado que el YTHS sí fue efectivo en el análisis de la interacción de la proteína hisHC-Pro consigo misma (tabla 10), decidimos emplear este sistema para profundizar en el estudio y comprobar si las distintas proteínas HC-Pro procedentes de los clones no transmisibles de TEV eran también capaces de interactuar consigo mismas. Este estudio se llevó a cabo con toda la serie de mutantes disponibles (figura 13). Se emplearon seis mutantes de TEV y se analizó para cada una de las variantes de HC-Pro su capacidad de interacción consigo misma. También se analizó el comportamiento de la proteína HC-Pro procedente de los clones 7DA-CIB y HCH10 como controles de interacción positiva.

El análisis de las interacciones se llevó a cabo de la misma forma que en el caso de las distintas proteínas HC-Pro con la proteína CP. Los resultados se muestran en la figura 19 y un resumen de los mismos en la tabla 12. Se observó la interacción de todos los factores HC-Pro estudiados consigo mismos ya que las levaduras transformadas con las diferentes combinaciones de HC-Pro crecieron en el medio de selección de interacción.

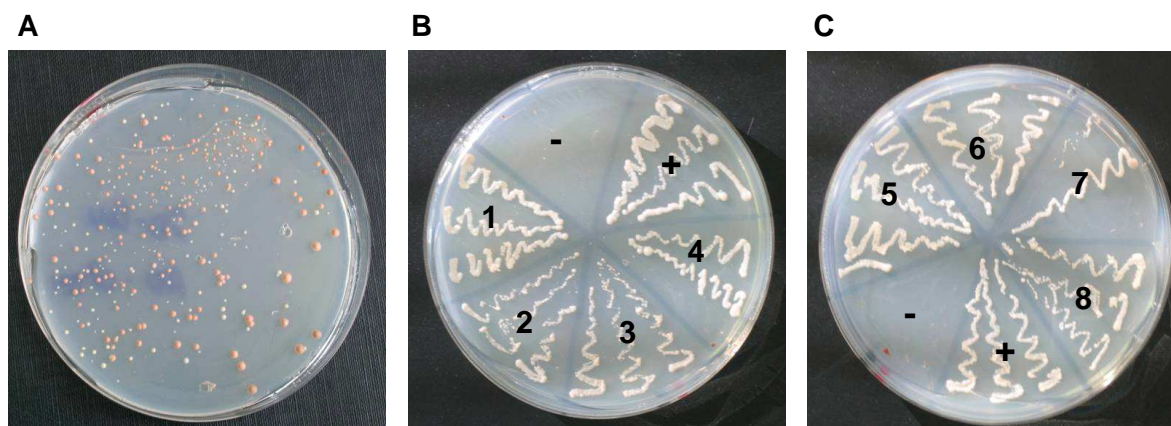


Figura 19. Aspecto de la levadura creciendo en los distintos medios de selección utilizados en el ensayo de dos híbridos. A. Levadura transformada con los vectores pGAD y pGBK en medio selectivo SD –Leu–Trp. B y C. Levadura creciendo en medio selectivo de interacción SD-WAHL +. Control positivo de interacción -. Control negativo de interacción 1.HC-Pro 7DA 2.HC-Pro HCH10 3.HC-Pro I₃₅₉M 4.HC-Pro G₃₄₃D 5.HC-Pro V₃₄₅E 6.HC-Pro A₃₄₆H 7.HC-Pro I₃₄₈D. 8. HC-Pro K₃₅₈N

Tabla 12. Análisis de interacción por ensayo de dos híbridos de las diferentes proteínas HC-Pro de TEV consigo mismas. Crecimiento en medio selectivo de interacción.

AD	BD	SD-WAHL
HC-Pro 7DA	HC-Pro 7DA	+
HC-Pro HCH10	HC-Pro HCH10	+
HC-Pro I ₃₅₉ M	HC-Pro I ₃₅₉ M	+
HC-Pro G ₃₄₃ D	HC-Pro G ₃₄₃ D	+
HC-Pro V ₃₄₅ E	HC-Pro V ₃₄₅ E	+
HC-Pro A ₃₄₆ H	HC-Pro A ₃₄₆ H	+
HC-Pro I ₃₄₈ D	HC-Pro I ₃₄₈ D	+
HC- Pro K ₃₅₈ N	HC- Pro K ₃₅₈ N	+
Antígeno T	P53	+
Lam C	P53	-

Para descartar algún fenómeno de activación espontánea de los promotores de los genes delatores en ausencia de interacción se transformó la levadura con cada uno de las construcciones de fusión junto con el vector vacío correspondiente al segundo vector de fusión. En ningún caso se observó crecimiento de la levadura en el medio de selección de la interacción, indicando que los genes delatores no se activaron espontáneamente.

Con el fin de cuantificar la fuerza de la interacción de cada proteína de fusión consigo misma se decidió emplear el tercer gen delator *lacZ*. Para ello se crecieron las levaduras en medio de selección de interacción líquido y posteriormente se hizo un ensayo de cuantificación de la actividad β -galactosidasa producida por la levadura. Teóricamente, cuanto más fuerte sea la interacción entre los productos de fusión estudiados, mayor cantidad de enzima se producirá, y en presencia de un sustrato colorimétrico mayor será la coloración del medio. Los extractos de las levaduras que portaban los plásmidos correspondientes mostraron niveles de activación del gen *lacZ* muy inferiores a las presentes en el control positivo de interacción pGAD-T/pGBK-p53 y en ocasiones incluso fueron inferiores al nivel basal detectado en el control negativo de interacción pGAD-lam/pGBK-p53 (figura 20). Este experimento se repitió tres veces y en todos los casos el valor cuantitativo de actividad β -galactosidasa se calculó a partir de 6 colonias independientes.

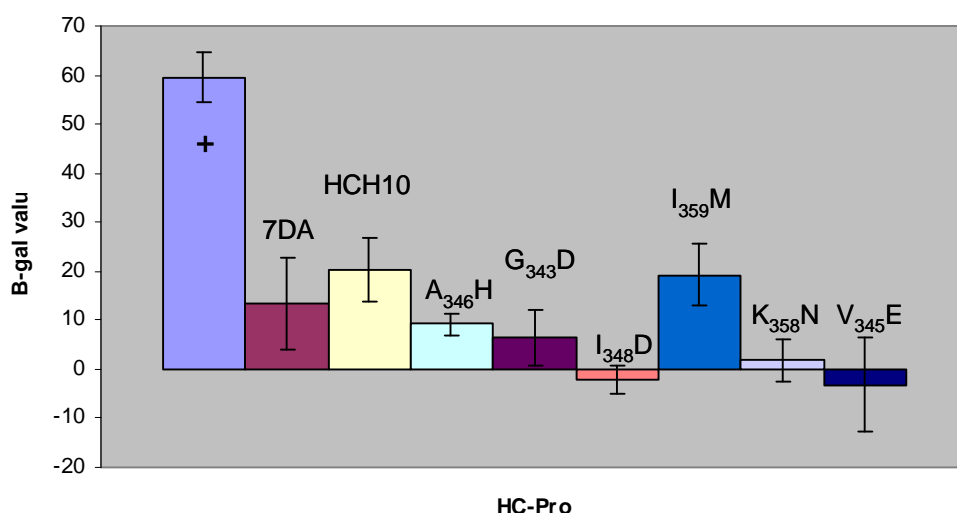


Figura 20. Representación en diagrama de barras del resultado del ensayo cuantitativo de actividad β -galactosidasa. Se consideró valor 0 de actividad β -galactosidasa al valor de absorbancia de los extractos de levadura transformada con el control negativo pGAD-lam/pGBK-p53. El control positivo procede de extractos de levadura transformada con los vectores pGAD-T/pGBK-p53.

Se puede observar una mayor activación del gen delator *lacZ* para el caso de las proteínas HC-Pro que son funcionalmente activas en transmisión. La activación del gen *lacZ* fue menor en todos los casos comparada con la producida en el control positivo del sistema pGAD-T/pGBK-p53.

IV.1.3.2 Estudio de interacción de HC-Pro de TEV consigo mismo por inmunoprecipitación de proteínas producidas *in vitro*.

Para analizar la interacción con un método alternativo al sistema de dos híbridos y poder comparar los resultados obtenidos se empleó de nuevo la técnica de coimmunoprecipitación. Como ya se ha indicado, los vectores de fusión generados para los estudios de dos híbridos permiten producir proteína en sistemas no celulares por transcripción y traducción *in vitro*, presentando una fusión en su extremo amino terminal que incorpora un epítipo para el reconocimiento de la proteína de fusión por parte de un anticuerpo específico (figura 15).

El análisis de interacción de cada uno de los factores HC-Pro consigo mismo dificulta el análisis puesto que ambas proteínas tienen el mismo tamaño, y no se pueden distinguir por electroforesis. Por este motivo el estudio se llevó a cabo empleando dos tipos de proteína marcada radiactivamente y sin marcar. Así, si empleamos el anticuerpo anti c-myc produciremos esta proteína de fusión sin marcaje radiactivo y sólo la que tiene el epítipo HA estará marcada radiactivamente. Si hay interacción entre ambas proteínas podremos detectar una banda del tamaño adecuado por SDS-PAGE (figura 21).

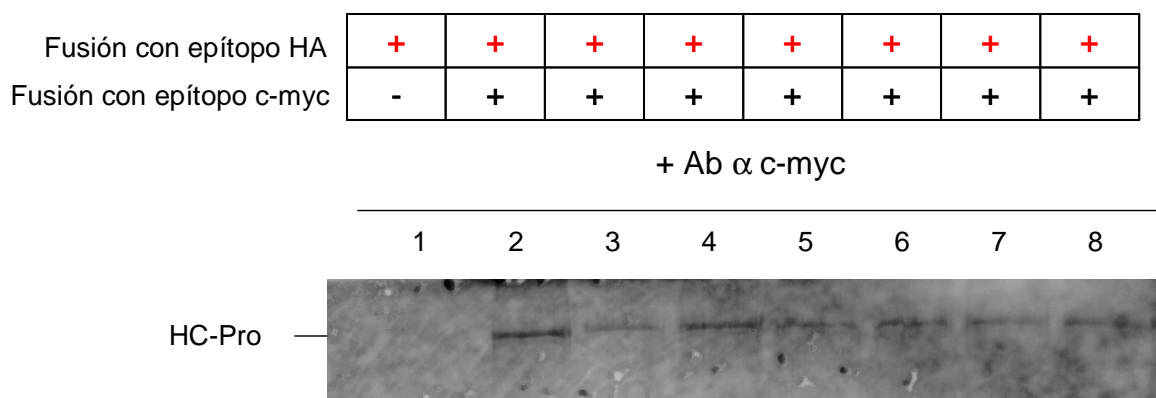


Figura 21. Inmunoprecipitación de la proteína HC-Pro. La proteína HC-Pro unida al epítipo HA fue marcada radiactivamente (en rojo). La proteína HC-Pro unida al epítipo c-myc se tradujo en ausencia de S³⁵-metionina (en negro). Para precipitar las proteínas se empleó el anticuerpo monoclonal α c-myc. 1.-Control de especificidad, inmunoprecipitación de la proteína HC-Pro 7DA fusionada a HA y anticuerpo a c-myc, en ausencia de proteína unida a c-myc. 2.-Inmunoprecipitación de proteína HC-Pro V₃₄₅E. 3.-Inmunoprecipitación de HC-Pro HCH10. 4.-Inmunoprecipitación de HC-Pro A₃₄₆H. 5.-Inmunoprecipitación de HC-Pro G₃₄₃D. 6.-Inmunoprecipitación de HC-Pro I₃₄₈D. 7.-Inmunoprecipitación de HC-Pro I₃₅₉M. 8.-Inmunoprecipitación de HC-Pro K₃₅₈N.

Los ensayos de inmunoprecipitación confirmaron la interacción de todos los factores HC-Pro estudiados consigo mismos. La proteína HC-Pro fue capaz de interactuar consigo misma en todos los casos, siendo una interacción específica ya que en ausencia de la proteína con el epítipo c-myc no hubo precipitación de la proteína unida al epítipo HA. Asimismo se hicieron controles adicionales que mostraron que las proteínas no precipitaban en ausencia del anticuerpo y que una pareja de proteínas no relacionadas (lamC y p53) tampoco mostraban interacción *in vitro*.

IV.2 DESARROLLO DE SISTEMAS EXPERIMENTALES ENFOCADOS AL ESTUDIO DE LA TRANSMISIÓN DEL POTYVIRUS PPV

Atendiendo a la importancia económica que el virus de la Sharka PPV tiene en todo el mundo, incluyendo nuestro país, y a las dificultades experimentales que el estudio de su transmisión ha presentado a lo largo de la historia, se abordó como un objetivo prioritario el desarrollo de herramientas de estudio del proceso en este virus.

IV.2.1 GENERACIÓN Y ANÁLISIS DE VARIANTES NO TRANSMISIBLES DE PPV POR MODIFICACIÓN EN LA REGION CODIFICANTE DE LA PROTEINA CP.

Para el estudio de la transmisión con PPV se precisaba de una variante viral no transmisible por presentar una CP defectiva, pero cuya proteína HC-Pro no estuviera modificada y fuese activa en transmisión. Para ello se generó un clon completo del virus cuya única diferencia con el clon completo pICPPV 5.15 (Martínez-García, 2000) es una deleción de 15 aminoácidos cerca del extremo amino terminal de la región codificante de la proteína CP del virus. La variante viral derivada de este clon completo se denominó PPV CP NAT.

La deleción en PPV CP NAT comienza en el tercer aminoácido del dominio DAG implicado en transmisión, con lo que la secuencia de la variante pasa a ser DAL. A través de este dominio DAG se produce la interacción entre el factor HC-Pro y la partícula viral en los potyvirus (Blanc *et al.*, 1997) y por tanto se esperaba que dicha deleción provocara la pérdida de transmisión de virus que, sin embargo, seguiría produciendo proteína HC-Pro funcional para transmisión. Existen aislados de PPV en la naturaleza que presentan una deleción equivalente (Maiss *et al.*, 1989, López-Moya *et al.*, 1994) y por tanto era de esperar

que el clon generado resultara infeccioso y su comportamiento fuera similar al del aislado PPV 5.15 excepto en transmisión.

IV.2.1.1 Infectividad y acumulación.

Se inocularon los plásmidos pICPPV 5.15 y pICPPV 5.15 CPNAT en plantas de *N. benthamiana*. A los 6-8 dpi se comenzaron a observar los síntomas característicos de la infección por PPV en aquellas plantas que resultaron infectadas (generalmente el 100% de las inoculadas). En ambos casos la aparición de síntomas se produjo simultáneamente, no habiendo ningún retraso entre la variante modificada CP NAT y la no modificada 5.15. La sintomatología observada fue similar en ambos casos (figura 22). Para comparar la acumulación viral entre ambos genotipos se llevó a cabo un ensayo *Western blot* con muestras tomadas a distintos tiempos de la infección del virus, utilizando un suero específico para la CP de PPV. Los resultados mostraron que la acumulación viral fue similar en todos los casos, observándose únicamente la esperada reducción en el tamaño de la proteína CPNAT correspondiente a la delección de 15 aminoácidos cerca de su extremo amino (figura 22).

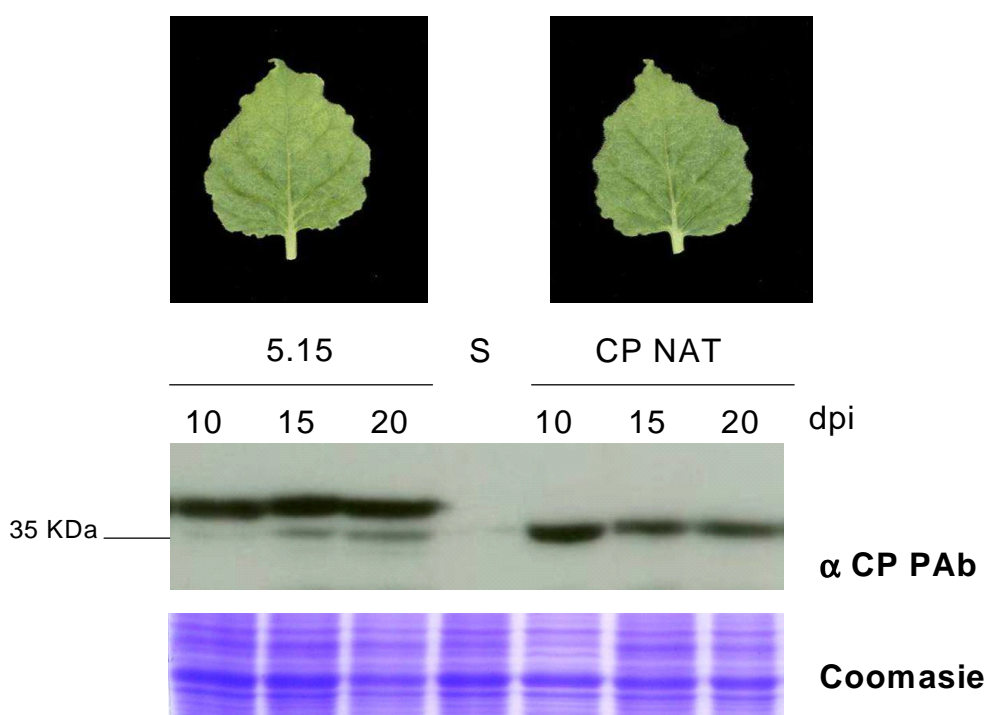


Figura 22. Sintomatología a 20 dpi y acumulación de las variantes virales PPV 5.15 y PPV CP NAT. Los niveles de acumulación se estudian a 10, 15 y 20 dpi. Como control negativo se empleó planta sin inocular (S). La normalización de la carga en cada caso se confirmó mediante tinción con azul de Coomasie en réplicas de los geles empleados para *Western blot*. Para la detección del virus se empleó el anticuerpo policlonal A1 específico de CP de PPV del kit para DASI-ELISA de Durviz. Se aprecia la disminución de tamaño de la proteína CP en CP NAT que posee una delección de 15 aminoácidos que reduce su peso molecular teórico de 36.6 KDa (5.15) a 35.3 KDa (CP NAT).

IV.2.1.2 Transmisibilidad de PPV CP NAT en ensayos planta a planta.

Para determinar si el clon infeccioso PPV 5.15 CPNAT era transmisible por pulgones se llevó a cabo un ensayo de transmisión a partir de plantas de *N. benthamiana* infectadas con este virus. En paralelo se utilizaron como control positivo de transmisión plantas inoculadas con el virus PPV 5.15. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Resultados del ensayo de transmisión planta a planta del virus PPV 5.15 CPNAT

Experimento	PPV 5.15 CP NAT ^b	PPV 5.15 ^b
1	0/24	10/25
2	0/23	10/25
3	0/25	8/24
4	0/24	7/24
Total^a	0/96 (0%)	35/98 (35.7%)

^a La transmisión se analizó en un total de cuatro ensayos independientes. Los resultados se muestran como número de plantas infectadas por el número total de plantas analizadas en el experimento. Entre paréntesis se refleja el valor porcentual de la transmisión.

^b Análisis estadísticos empleando el test de Fisher mostraron diferencias significativas entre los porcentajes de transmisión de las dos variantes de virus ($P < 0.0001$)

IV.2.2 GENERACIÓN Y ANÁLISIS DE VARIANTES NO TRANSMISIBLES DE PPV POR MODIFICACIÓN EN LA REGION CODIFICANTE DE LAS PROTEINA HC-Pro.

Se generaron también variantes del clon completo de PPV con modificaciones puntuales en los dominios implicados en transmisión de la secuencia de la proteína HC-Pro. El resultado esperado era, en caso de ser infectivos, generar clones no transmisibles por pulgón. Se modificaron los dos dominios conservados ya conocidos que han sido implicados en el proceso de transmisión de otros potyvirus: el dominio KITC situado cerca del extremo amino terminal de la proteína, y el dominio PTK, localizado en la zona central de la proteína, realizando en el primer caso el cambio K₃₆₀E que generaría un dominio EITC y realizando el cambio T₆₁₉A en el segundo caso, resultando un dominio PAK. Las variantes virales obtenidas se denominaron respectivamente PPV EITC y PPV PAK.

IV.2.2.1 Infectividad y acumulación.

Se inocularon plantas de *N. benthamiana* con plásmidos de las tres variantes virales pICPPV 5.15, pICPPV EITC y pICPPV PAK. La infectividad fue generalmente del 100%. La aparición de los primeros síntomas se produjo en todos los casos a tiempos similares, que variaron entre los 6 y 8 dpi según el experimento. La sintomatología fue similar en los tres casos, observándose una leve atenuación de los síntomas para el virus PPV PAK a tiempos largos de infección (1 mpi). En la figura 2 se muestran los resultados de la cinética

de acumulación viral y de HC-Pro en los tres casos así como la sintomatología mostrada por cada una de las variantes. La acumulación viral fue similar en los tres casos según se observa en los resultados por *Western blot* (figura 23). Los ensayos usando un anticuerpo específico para HC-Pro de PPV también mostraron una acumulación similar de HC-Pro en cada variante, demostrando que la acumulación y estabilidad de la proteína modificada no se veía reducida por introducir los cambios K₃₆₀E y T₆₁₉A.

Los datos de acumulación viral también se analizaron por DAS-ELISA para los mismos puntos temporales de la infección viral. La acumulación viral no aumentó con el tiempo para los datos analizados y las diferencias de acumulación viral entre los tres genotipos fueron mínimas (figura 24).

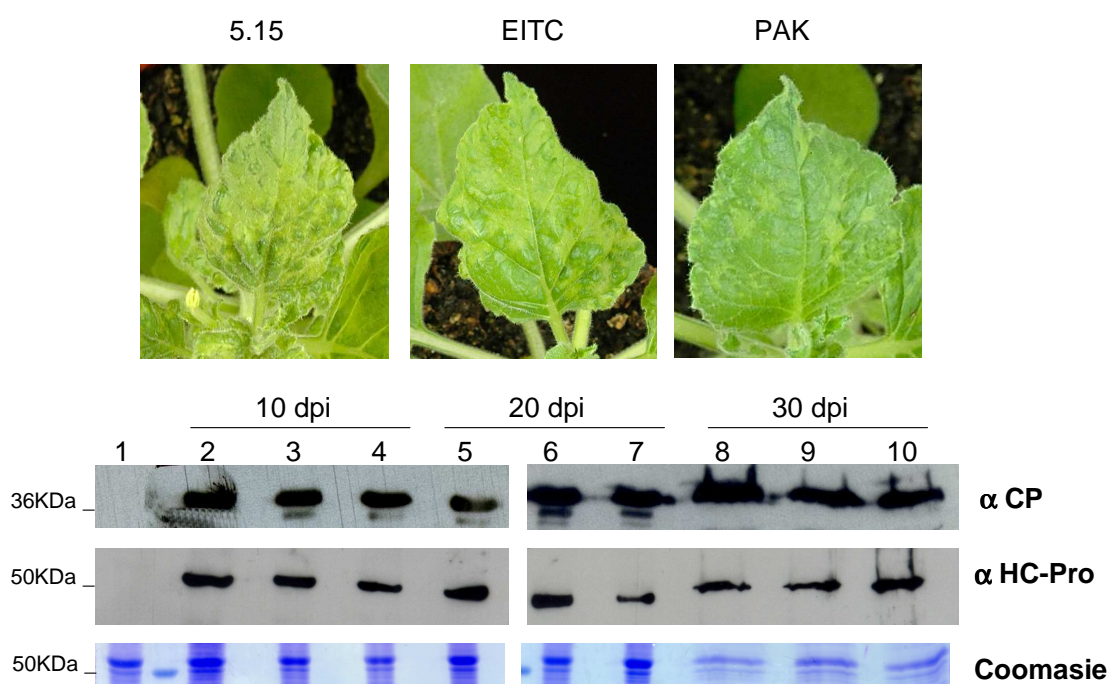


Figura 23. Sintomatología y acumulación de los tres virus estudiados a 20 dpi. Los niveles de acumulación se estudian a 10, 20 y 30 dpi. Como control negativo se empleó planta no inoculada (carril 1). En los carriles 2, 5 y 8 se cargaron las muestras procedentes de plantas infectadas con el virus PPV 5.15 a los tres tiempos. Las muestras de plantas infectadas con el virus PPV EITC en los carriles 3, 6 y 9 y con el virus PPV PAK en los carriles 4, 7 y 10. La normalización de la carga en cada caso se confirmó mediante tinción con azul de Coomasie de réplicas de los geles empleados para el ensayo *Western blot*.

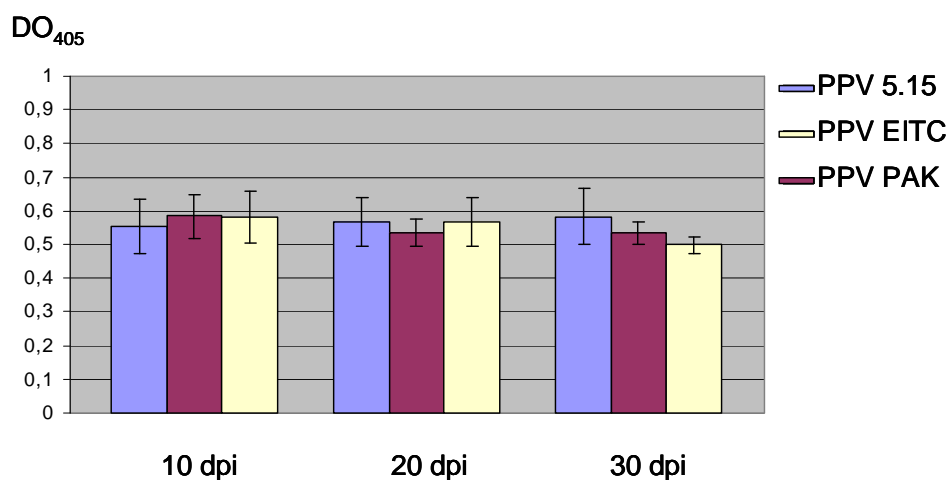


Figura 24. Análisis de la acumulación viral en *N. benthamiana* de los tres genotipos de PPV por ensayo ELISA. Los datos se tomaron a los 10, 20 y 30 días post inoculación. Cada barra representa la media de tres muestras independientes, con cada muestra procedente de una planta distinta. Además, cada muestra se preparó por duplicado en el ELISA, y el valor de absorbancia analizado corresponde a la media de estos dos datos. Todos los datos están corregidos con la absorbancia media producida a partir de muestras de plantas de *N. benthamiana* no infectadas.

IV.2.2.2 Transmisibilidad en ensayos planta a planta.

Para analizar la transmisibilidad de estos mutantes comparada con la de la variedad no mutada PPV 5.15, se realizaron varios ensayos independientes de transmisión planta a planta (tabla 14). El mutante PPV EITC perdió su transmisibilidad completamente. Sin embargo, el mutante PPV PAK, aún reduciendo su transmisibilidad, siguió siendo transmisible de forma ocasional. Los valores de transmisión por pulgón resultaron significativamente menores a los obtenidos con el virus silvestre según los análisis estadísticos. Para descartar fenómenos de reversión de la mutación en el caso de transmisión de la variante de PPV PAK, las plantas infectadas tras la transmisión fueron analizadas por inmunocaptura y posterior RT-PCR y secuenciación para confirmar la presencia del cambio T₆₁₉A. En ningún caso se observó reversión de la mutación.

Tabla 14. Resultados de los ensayos de transmisión de los mutantes PPV EITC y PAK.

Experimento	PPV EITC ^b	PPV PAK ^{b,c}	PPV 5.15 ^b
1	0/26	1/26	10/25
2	0/25	1/26	10/26
3	0/26	3/25	12/26
4	0/48	0/76	9/26
Total¹	0/125 (0%)	5/153 (3.2%)	41/103 (39.8%)

^a Los resultados se muestran como número de plantas infectadas por número total de plantas. Entre paréntesis se muestra el valor porcentual de la transmisión.

^b Análisis estadísticos usando el test de Fisher indicaron diferencias significativas ($P < 0.0001$) entre el virus 5.15 y los dos mutantes. No se observaron diferencias significativas entre los dos mutantes.

^c En los casos en los que hubo transmisión de virus PAK se confirmó el genotipo del virus presente por IC-RT-PCR y secuenciación. En ninguno de los casos se había producido reversión de la mutación, y el virus presente tras la transmisión fue PPV PAK.

IV.3 PRODUCCIÓN DE HC-Pro DE PPV MEDIANTE EXPRESIÓN TRANSITORIA EN *N. benthamiana* y *N. tabacum*.

Con el fin de desarrollar un sistema de expresión de HC-Pro funcional en transmisión fuera del contexto de la infección viral, se desarrolló un sistema de expresión transitoria de HC-Pro de PPV mediada por *Agrobacterium*. El desarrollo de esta tecnología permitirá implementar los estudios de funcionalidad en transmisión de la proteína, ya que permite aislar esta función del resto de funciones en que está implicada la proteína HC-Pro dentro del ciclo de infección viral (capítulo I.4).

IV.3.1 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA EN *N. benthamiana* y *N. tabacum*.

La expresión transitoria de HC-Pro de PPV se llevó a cabo en dos huéspedes distintos, *N. benthamiana* y *N. tabacum*, para poder así analizar los niveles de expresión en varios huéspedes y seleccionar posteriormente el más adecuado para su empleo en los ensayos de transmisión. El experimento se llevó a cabo infiltrando plantas de los huéspedes ya mencionados con cultivos de *A. tumefaciens* transformados con el vector pTRANS5'PPV. Como control negativo se emplearon plantas también agroinfiltradas, esta vez con cultivos transformados con el vector vacío. La infiltración se realizó en dos hojas por planta y dos plantas por construcción. Posteriormente se analizaron los niveles de acumulación de la proteína expresada a varios tiempos *post* infiltración por *Western blot*. El objetivo de este estudio era determinar el mejor huésped para la expresión y el tiempo óptimo de acumulación de la proteína para proseguir con los experimentos de transmisión. Los resultados del análisis por *Western blot* se muestran en la figura 25.

Los resultados de la cinética de expresión mostraron siempre una mayor acumulación en *N. benthamiana*, huésped sistémico para PPV. El experimento se repitió en varias ocasiones, siendo la expresión de HC-Pro en *N. tabacum* errática y en la mayor parte de los casos indetectable (figura 25). La acumulación de proteína aumentó con el tiempo en el caso de *N. benthamiana*, si bien las hojas agroinfiltradas se deterioraban tras

Resultados

la infiltración y aparecían cloróticas y dañadas a partir del sexto día aproximadamente. Los niveles de expresión de HC-Pro en *N. benthamiana* fueron comparables a partir de los 4 dpa con los detectados en plantas con infección sistémica del virus (figura 25).

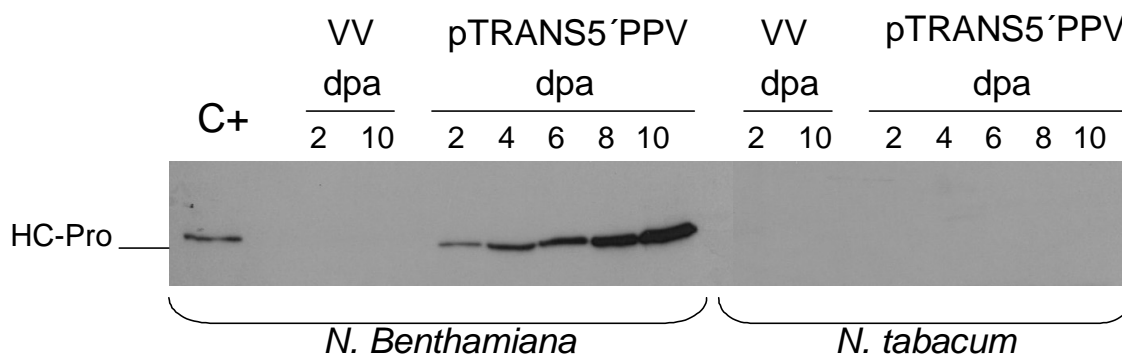


Figura 25. Análisis de expresión de proteína HC-Pro de PPV por *Western blot* en plantas agroinfiltradas con *A. tumefaciens* transformado con la construcción pTRANS5'PPV. Se evaluaron los niveles de proteína expresada por agroinfiltración a 2, 4, 6, 8 y 10 días post agroinfiltración. Se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* y *N. tabacum*. Como control de expresión se empleó tejido infectado sistémicamente con PPV 5.15 a los 15 días post inoculación (C+). Como control negativo se emplearon hojas agroinfiltradas con *A. tumefaciens* transformado con vector vacío (VV).

IV.3.2 ANÁLISIS DE RNA MENSAJERO Y RNAS DE PEQUEÑO TAMAÑO (sRNAS)

Con el fin de analizar si la casi total ausencia de expresión en *N. tabacum* se debía a algún problema de transcripción de la construcción, o alternatively a algún tipo de fenómeno de silenciamiento génico post transcripcional, se llevaron a cabo ensayos *Northern blot* para detectar el mensajero producido en ambos huéspedes, así como los RNAs de pequeño tamaño (sRNAs) derivados de dicha construcción. Como control negativo se emplearon de nuevo hojas agroinfiltradas con vector vacío.

IV.3.2.1 Análisis de mRNA.

El análisis de los niveles de RNA mensajero derivado de la construcción pTRANS5'PPV en las hojas agroinfiltradas se estudió por ensayos de *Northern blot* (figura 26). Los resultados mostraron que los niveles de mRNA eran muy superiores cuando se analizaron hojas agroinfiltradas con la construcción pTRANS5'PPV de *N. benthamiana*, que en el caso de *N. tabacum*, donde se produjeron niveles significativamente menores de RNA mensajero. Como control positivo de detección se empleó un fragmento de DNA correspondiente a la región codificante de HC-Pro amplificada por PCR y de tamaño 1374 nt.

Los RNA mensajeros producidos tras la agroinfiltración presentan un mayor tamaño que el control de detección porque corresponden al RNA mensajero que comprende la región 5' no traducible (5'UTR), P1, HC-Pro y un pequeño fragmento de P3 con un total de 3594 nt de longitud. En el caso de *N.benthamiana* se pudo asimismo observar un descenso en los niveles de mensajero con el transcurso del tiempo, lo que podría corresponder con un fenómeno de silenciamiento génico post transcripcional (PTGS).

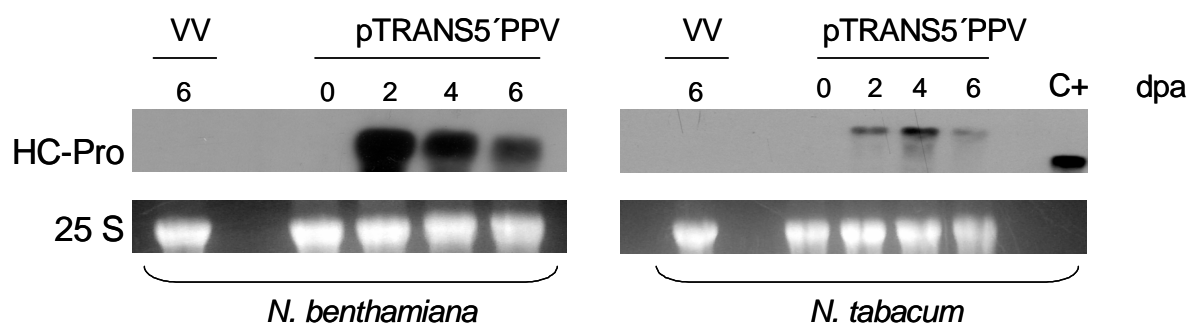


Figura 26. Análisis *Northern blot* de plantas agroinfiltradas con la construcción pTRANS5'PPV. Se evaluaron los niveles de mRNA a los 0, 2, 4 y 6 dpa. Como control positivo (C+) se usó un fragmento de DNA correspondiente únicamente a la región HC-Pro. Como control negativo se emplearon hojas agroinfiltradas con vector vacío (VV) a los 6 dpa. Para confirmar la normalización de carga de RNA total se fotografiaron los geles teñidos con EtBr antes de la transferencia señalándose en la figura el RNA correspondiente al ribosómico 25S.

IV.3.2.2 Análisis de sRNA.

Con el fin de analizar si el menor nivel de producción de mRNA en *N. tabacum* podía deberse a un efecto más pronunciado del PTGS en esta planta respecto al otro huésped, se analizaron también los niveles de sRNAs producidos en hojas agroinfiltradas con esta construcción (figura 27). Los resultados mostraron una mayor acumulación de sRNAs en hojas de *N. benthamiana*. En *N. tabacum* no se pudo detectar acumulación de sRNAs procedentes de la degradación del mensajero. Este resultado concuerda con el hecho de que hay mayores cantidades de mensajero en *N. benthamiana* y por tanto más RNA susceptible de ser degradado para producir sRNAs. En cambio, la menor cantidad de mRNA observada en *N. tabacum* no parece deberse a un efecto más acentuado de silenciamiento génico post transcripcional.

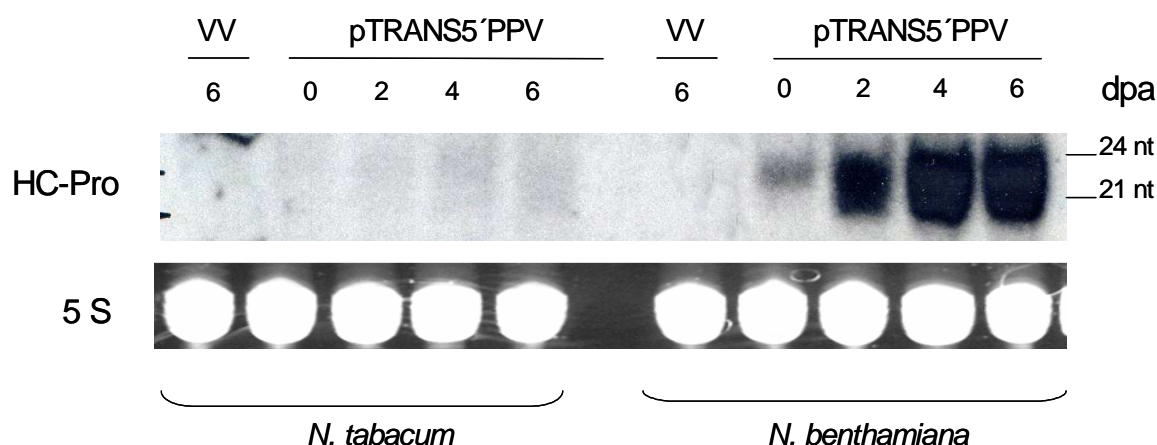


Figura 27. Análisis *Northern blot* de RNAs de pequeño tamaño en plantas agroinfiltradas con la construcción pTRANS5'PPV. Se evaluaron los niveles de RNA a los 0, 2, 4 y 6 dpa. Como control negativo se emplearon hojas agroinfiltradas con vector vacío (VV) a los 6 dpa. Para confirmar la normalización de carga de RNA total se fotografiaron los geles teñidos con EtBr antes de la transferencia señalándose en la figura el RNA correspondiente al RNA de transferencia 5S.

IV.4 ESTUDIOS DE FUNCIONALIDAD DE HC-PRO EXPRESADO TRANSITORIAMENTE EN ENSAYOS DE TRANSMISIÓN POR PULGONES.

Una vez confirmada la expresión de HC-Pro de PPV en *N. benthamiana*, y seleccionada esta especie para continuar los ensayos, se procedió al análisis de funcionalidad de la proteína producida por agroinfiltración en este huésped. Los estudios se llevaron a cabo con dos tipos de diseño experimental para las transmisiones que se describen a continuación.

IV.4.1 TRANSMISIÓN SECUENCIAL DE VIRUS PURIFICADO.

La primera aproximación para estudiar la funcionalidad del HC-Pro producido por agroinfiltración fue hacer ensayos de transmisión secuencial. En estos ensayos se alimenta en primer lugar a los pulgones en hojas agroinfiltradas que están produciendo HC-Pro. En una segunda alimentación los pulgones adquieren partículas de virus purificado a través de membranas de Parafilm®. Como es sabido, el virus purificado no es transmisible por sí mismo, y sólo si el factor HC-Pro expresado transitoriamente es activo y es retenido en el aparato bucal del pulgón se producirá la transmisión de PPV. Como control positivo se empleó el clon infeccioso pICPPV 5.15 CPNAT, que como hemos comprobado, no es transmisible por pulgones y se diferencia del clon transmisible pICPPV 5.15 únicamente por

una delección de 15 aminoácidos en el extremo amino de la CP. Esta delección modifica el dominio DAG de interacción con HC-Pro (capítulo IV.2.1).

Los resultados de este tipo de transmisiones (tabla 15) mostraron que el HC-Pro producido por agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* era funcional en transmisión: las partículas virales purificadas fueron transmitidas con la asistencia de la proteína HC-Pro expresada transitoriamente en hojas de *N. benthamiana*. Los experimentos de transmisión secuencial se repitieron varias veces, observándose una elevada variabilidad en los resultados de transmisión entre experimentos. Esta variabilidad ocurría tanto en las transmisiones control con una primera alimentación en plantas infectadas con PPV CP NAT como en aquellas transmisiones en las que la primera alimentación se producía sobre hojas que expresaban HC-Pro por agroinfiltración. En todos los experimentos se confirmó la expresión de HC-Pro en las hojas agroinfiltradas y empleadas en transmisión por *Western blot*.

Tabla 15. Ensayos de transmisión secuencial de PPV

<u>Adquisición</u>		Número de experimentos	<u>Transmisión</u>		
1ª Alimentación ^a	2ª Alimentación ^a		Total	Porcentaje ^b	Rango
Infección PPV CP NAT 15 dpi	PPV purificado 0.2 mg/ml	3	20/71	28.1%	8.3-65%
Agroinfiltración pTRANS5'PPV 4 dpa	PPV purificado 0.2 mg/ml	4	28/88	31.8%	12.5-50%
Agroinfiltración Vector Vacío 4 dpa	PPV purificado 0.2 mg/ml	2	0/48	0%	—

^a Los pulgones se alimentaron durante 5 minutos en hojas agroinfiltradas o infectadas con el virus PPV CP NAT. La expresión se confirmó posteriormente en ensayos *Western blot*. Tras la primera alimentación los pulgones fueron de nuevo alimentados una segunda vez a través de membrana con una solución que contenía partículas purificadas de PPV.

^b El análisis estadístico de los resultados mediante el test de Fisher no mostró diferencias significativas entre el control positivo (primera columna) y la transmisión empleando HC-Pro expresado transitoriamente. Sí se observaron diferencias significativas ($P < 0.0001$) entre el control negativo y los otros dos casos.

IV.4.2 TRANSMISIÓN DE VIRUS NO TRANSMISIBLES MEDIANTE COMPLEMENTACIÓN DEL FACTOR HC-PRO.

El sistema de transmisión secuencial ha permitido mostrar que la proteína HC-Pro producida por expresión transitoria es activa en transmisión. Este sistema permite expresar la proteína en plantas sanas y por tanto fuera del contexto de una infección viral. Sin

embargo es un sistema bastante laborioso, que requiere disponer de partículas virales purificadas y realizar ensayos de transmisión secuenciales en los que se manipula varias veces a los pulgones. Por este motivo se decidió diseñar una aproximación alternativa que permitiera analizar la actividad en transmisión del factor HC-Pro expresado transitoriamente en ensayos con menos manipulación. Para ello se han utilizado variantes virales con modificaciones en dos dominios conservados de la región codificante de la proteína HC-Pro que provocan una falta de transmisión del virus sin afectar el resto de su biología, y una construcción quimérica no transmisible.

IV.4.2.1 PPV Quimera.

El laboratorio disponía de un clon quimérico de PPV no transmisible denominado pICPPV HCPVY (Martínez-García *et al.*, 2001). Este virus posee el factor HC-Pro del aislado transmisible 0AT de PVY. Los síntomas y niveles de acumulación del virus son similares a los producidos por el virus PPV. Sin embargo, a pesar de que el factor HC-Pro se procesa adecuadamente y se acumula a niveles similares a los producidos en una infección de PVY, el virus no es transmitido por pulgones. Dado que la diferencia entre PPV 5.15 y PPV HCPVY es el cistrón correspondiente al factor HC-Pro sería lógico pensar que la falta de transmisión se debe a este factor HC-Pro en el contexto quimérico.

Así pues, se probaron ensayos de transmisión con hojas de plantas infectadas con el virus quimérico y a su vez agroinfiltradas con *Agrobacterium* transformado con la construcción pTRANS5'PPV. Como control negativo se emplearon hojas agroinfiltradas con *Agrobacterium* transformado con la construcción VV. Asimismo se agroinfiltraron hojas con una construcción pTRANS5'PPV HCPVY, que incluye la región 5' de la variante quimérica. Cuando se aportó HC-Pro de PPV desde la construcción pTRANS5'PPV se pudo transmitir el virus quimérico. Sin embargo, cuando se aportó HC-Pro de PVY desde la construcción pTRANS5'PPV HCPVY no se pudo observar transmisión del virus quimérico (tabla 16)

Tabla 16. Resultados de transmisión de PPV HC-PVY suplementado con HC-Pro de PPV por agroinfiltración.

<u>Adquisición</u>		<u>Transmisión</u>		
Virus	Agroinfiltración ^a	Número de experimentos	Total ^{b,c}	Rango
PPV HC PVY 15 dpi	pTRANS5'PPV 4dpa	7	41/186 (22%)	4.3-50
PPV HC PVY 15 dpi	pTRANS5'PPV HCPVY 4dpa	3	0/75	—

^a Las plantas se infectaron con el virus quimérico y a los 11 dpi se agroinfiltraron. La expresión de HC-Pro de PPV por agroinfiltración se confirmó en las hojas empleadas en transmisión por *Western blot*.

^b Las plantas infectadas se analizaron por IC-RT-PCR para confirmar su naturaleza quimérica.

^c Análisis estadísticos empleando el test de Fisher mostraron diferencias muy significativas entre los dos casos.

Las construcciones pTRANS5´PPV y pICPPV HCPVY tienen parte su secuencia de DNA en común. Por tanto cabía la posibilidad de que, coexistiendo transcritos de ambas especies en una misma célula, se hubiera producido un fenómeno de recombinación por homología de secuencia recuperándose el genotipo transmisible PPV 5.15 y que fuese esta forma la transmitida por los pulgones. Para descartar esta posibilidad, las plantas infectadas tras la transmisión se analizaron por IC-RT-PCR y se determinó su naturaleza quimérica usando un cebador en la secuencia de PPV y otro en la secuencia de HC-Pro de PVY. En todos los casos el virus detectado en las plantas infectadas por transmisión fue PPV HC-PVY descartándose por tanto el fenómeno de recombinación.

IV.4.2.2 PPV EITC y PAK.

El virus PPV HCPVY es una especie quimérica y se desconoce la causa de su no transmisibilidad dado que el HC-Pro de PVY aislado 0AT sí es funcional en transmisión en el contexto de su virus homólogo y además se ha descrito su interacción en ensayos *in vitro* con partículas purificadas de PPV así como su complementación en transmisión de partículas de PPV por membrana (Fernández-Calvino, 2006). Por este motivo se decidió emplear variantes de virus no transmisibles, o de transmisibilidad reducida, con mutaciones puntuales en los dominios implicados en el proceso derivados de las construcciones pICPPV EITC y pICPPV PAK (capítulo IV.1.2). En este caso se empleó el mismo protocolo que para las transmisiones de PPV HCPVY. Se inocularon plantas de *N. benthamiana* y a los 11 dpi se agroinfiltraron con cultivos de *Agrobacterium* transformado con pTRANS5´PPV y vector vacío (VV). Los experimentos de transmisión de planta a planta se llevaron a cabo a los 4dpa, cuando la infección se encontraba a 15 dpi. Como control positivo de transmisión se emplearon plantas infectadas con PPV 5.15 y agroinfiltradas con la construcción VV. En ambos casos se pudo recuperar la transmisión de los virus no transmisibles (tabla 17).

Resultados

Tabla 17. Ensayo de transmisión de virus PPV EITC y PPV PAK complementados con HC-Pro 5.15 expresado por agroinfiltración.

Virus	Adquisición		Transmisión		
	Agroinfiltración ^a	Número de experimentos	Total ^{b,c}	Porcentaje	Rango
PPV EITC 15dpi	pTRANS5' PPV 4dpa	6	32/140	22.8%	0-45.8
PPV EITC 15dpi	VV 4dpa	2	0/48	0%	—
PPV PAK 15dpi	pTRANS5' PPV 4dpa	1	10/24	40%	—
PPV PAK 15dpi	VV 4dpa	2	1/48	2.1%	0-4.1
PPV 5.15 15dpi	VV 4dpa	7	63/153	41%	20-60

^a Se inocularon los virus correspondientes en cada caso y a los 11dpi se agroinfiltraron hojas que mostraban síntomas sistémicos con la construcción correspondiente. A los 4dpa y por tanto 15dpi se realizaron los ensayos de transmisión.

^b Las plantas positivas para transmisión fueron analizadas por IC-RT-PCR y digestión o secuenciación, confirmando la presencia de la mutación correspondiente en cada caso.

^c Los análisis estadísticos empleando el test de Fisher mostraron diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los casos en que se suplementaba el virus no transmisible con pTRANS5' PPV o con VV.

Como se observa en la tabla, la variante PPV PAK es transmitida por si sola en una baja proporción, confirmando los datos anteriores. En este caso también se observa un claro aumento de la tasa de transmisión cuando se complementa la función con HC-Pro funcional no modificado a través de agroinfiltración.

Al igual que en el caso anterior, se podía producir un fenómeno de recombinación homóloga entre la construcción agroinfiltrada y el virus presente en las hojas infectadas. Para descartar dicha posibilidad se analizaron por IC-RT-PCR y posterior digestión con la enzima *Pst*I (para PPV EITC) o secuenciación (para PPV PAK) en todas las plantas en las que hubo transmisión de virus. En ningún caso se detectaron formas recombinantes en las que se hubiera recuperado el genotipo 5.15, detectándose únicamente las formas mutadas del virus.

IV.5 ENSAYOS DE INTERFERENCIA EN LA TRANSMISIÓN DE PPV.

La técnica de expresión transitoria de HC-Pro de PPV en plantas había permitido restaurar a niveles similares a los del virus no modificado la transmisión de aislados virales de baja transmisibilidad e incluso no transmisibles, demostrando la complementación de la

función. Sin embargo, la pregunta de si las variantes de HC-Pro podrían afectar la función de la proteína funcional en infecciones naturales de potyvirus no se había abordado. Por este motivo se decidió utilizar las herramientas desarrolladas y analizar una posible interferencia de moléculas de HC-Pro modificadas que pudieran interferir reduciendo la eficiencia del proceso de transmisión usando como modelo el virus PPV.

IV.5.1 ESTUDIOS DE INTERFERENCIA EMPLEANDO MOLÉCULAS DE HC-PRO MODIFICADAS EXPRESADAS POR AGROINFILTRACIÓN.

En un primer caso se empleó la expresión transitoria de moléculas de HC-Pro para intentar reducir la transmisión del virus PPV 5.15. Este tipo de ensayos se llevaron a cabo siguiendo dos metodologías distintas. En un primer caso se expresaron moléculas de HC-Pro modificadas en hojas de plantas infectadas con el virus y se alimentó los pulgones directamente sobre éstas. En una segunda aproximación se alimentó a los pulgones secuencialmente, primero en hojas expresando la molécula de HC-Pro no funcional y posteriormente en hojas de plantas infectadas con virus 5.15 transmisible.

IV.5.1.1 Ensayos de interferencia en experimentos con una única alimentación.

Se agroinfiltraron hojas sintomáticas de *N. benthamiana*, previamente infectadas por el virus PPV 5.15, con cultivos de *Agrobacterium* transformado con las construcciones pTRANS5'PPV EITC y PAK. La hipótesis inicial era que estos factores no funcionales en transmisión podían, bien interaccionar con moléculas nativas de HC-Pro entorpeciendo su función, bien bloquear los sitios de unión del estilete del pulgón (en el caso de la variante HC PAK) sin ser capaces al mismo tiempo de unir a su vez partículas virales de forma eficiente, o también unirse a partículas virales impidiendo su unión al estilete del pulgón (caso de la variante HC EITC). Los resultados de los distintos ensayos se muestran en la tabla 18. Se llevaron a cabo dos tipos de control positivo empleando el virus 5.15 agroinfiltrado con VV así como con pTRANS5'PPV.

Resultados

Tabla 18. Ensayo de interferencia en la transmisión de PPV 5.15 por moléculas de HC-Pro modificadas.

Virus	Adquisición		Transmisión		
	Agroinfiltración ^a	Número de experimentos	Total ^b	Porcentaje	Rango
PPV 5.15	pTRANS 5'PPV	3	41/73	55.8%	43.4-62.5
PPV 5.15	VV	3	46/73	62.9%	58.3-68
PPV 5.15	pTRANS5'PPV EITC	3	37/76	49.5%	36-66.6
PPV 5.15	pTRANS5'PPV PAK	3	36/75	48.2%	36-62.5

^a Se inocularon los virus correspondientes en cada caso y a los 11dpi se agroinfiltraron hojas que mostraban síntomas sistémicos con la construcción correspondiente. A los 4dpa, y por tanto 15dpi, se realizaron los ensayos de transmisión.

^b Los análisis estadísticos empleando el test de Fisher determinaron que no había diferencias significativas entre los distintos casos.

Los resultados de los ensayos de transmisión mostraron valores ligeramente menores en los casos en los que se agroinfiltraron los factores HC-Pro EITC y PAK. Sin embargo, los análisis estadísticos realizados sobre estos datos indicaron que las diferencias en los valores de transmisión entre los casos comparados eran no significativas.

IV.5.1.2 Ensayos de interferencia en experimentos con dos alimentaciones.

Estos ensayos buscaban proporcionar al pulgón la proteína HC-Pro modificada en un primer paso de alimentación sobre hojas agroinfiltradas, intentando saturar los sitios de unión del estilete del pulgón, y posteriormente alimentar al pulgón en plantas infectadas con virus transmisible (PPV 5.15) y analizar si la adquisición de virus en estas plantas se veía reducida. El dominio PTK de la proteína HC-Pro ha sido implicado en la unión de esta proteína a la partícula viral a través de la interacción HC-Pro/CP. La idea era en este caso intentar saturar en la primera alimentación los sitios de unión de HC-Pro en el estilete del pulgón con moléculas de HC-Pro que tuvieran inhabilitada la capacidad de unión de partículas virales pudiendo así disminuir la tasa de transmisión. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 19. No se observó una reducción en la tasa de transmisión por alimentación previa con HC-Pro PAK.

Tabla 19. Resultados de los ensayos de transmisión con alimentación secuencial en dos plantas.

<u>Adquisición</u>		<u>Transmisión</u>			
1 ^a Alimentación ^a	2 ^a Alimentación	Número de experimentos	Total ^b	Porcentaje	Rango
Agroinfiltración VV 4dpa	Infección PPV 5.15 15dpi	4	44/91	48.3%	25-66.6
Agroinfiltración pTRANS5'PPV 4dpa	Infección PPV 5.15 15dpi	4	28/92	30.4%	20.8-45.8
Agroinfiltración pTRANS5'PPV PAK 4dpa	Infección PPV 5.15 15dpi	4	36/96	37.5%	12.5-50

^a Se confirmó la expresión transitoria de los distintos factores HC-Pro mediante ensayo *Western blot* tras el uso de las hojas en la transmisión.

^b El análisis estadístico empleando el test de Fisher no encontró diferencias significativas entre el caso en el que se alimentó primero con HC-Pro PAK comparado con los dos controles positivos.

IV.5.2 ESTUDIOS DE INTERFERENCIA EMPLEANDO VIRUS NO TRANSMISIBLES.

Los resultados obtenidos empleando la coexpresión transitoria de variantes de factores de transmisión no mostraron ningún descenso significativo en los niveles de transmisión del virus PPV. Dado que se disponía de clones completos infecciosos en los que la molécula HC-Pro contenía cambios que abolían o reducían drásticamente la transmisión del virus, se trató de analizar si, en infecciones mixtas en las que se inocularan dos variedades distintas de virus (mutado y no mutado), observábamos tasas de transmisión menores a las resultantes de infecciones sencillas con la variante PPV 5.15.

Las inoculaciones de clones completos de pICPPV no son siempre un 100% infectivas por inoculación manual (capítulo IV.2.1.1 y IV.2.2.1). Por este motivo se decidió preparar los inóculos a partir de tejido fresco infectado sistémicamente con las diferentes variantes virales. Estudios previos habían demostrado que la acumulación viral es comparable entre los diferentes clones (capítulo IV.1.2.1) por tanto, se considera que la cantidad de inóculo por gramo de tejido fresco debía ser aproximadamente del mismo orden de magnitud. Se inocularon plantas con una mezcla 1:1 de tejido infectado con virus PPV 5.15 y una de las dos variantes PPV EITC o PAK. Se esperó al desarrollo de síntomas y se llevaron a cabo ensayos de transmisión de planta a planta al cabo de 15 dpi. Las hojas empleadas para la transmisión se analizaron posteriormente por IC-RT-PCR y digestión con la enzima de restricción *SpeI* para confirmar la presencia de los dos tipos virales. Las

Resultados

variantes virales PPV EITC y PAK proceden del clon pICPPV *SpeI* y por tanto disponen de un sitio de restricción adicional que permite diferenciarlos molecularmente del clon no modificado (figura 28).

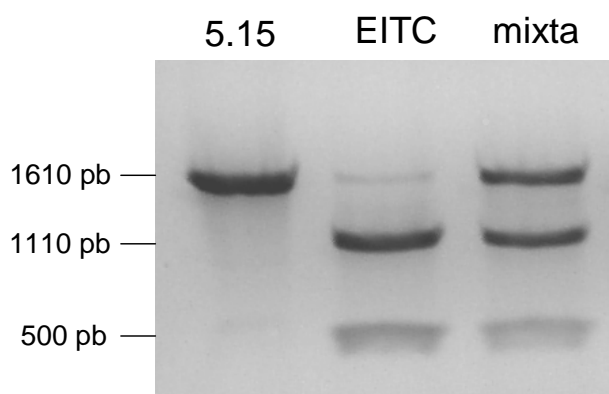


Figura 28. Gel de agarosa donde se separan los fragmentos de DNA producidos por IC-RT-PCR a partir de extracto de planta infectada y posterior digestión del DNA amplificado con la enzima de restricción *SpeI*. El fragmento amplificado a partir de RNA procedente de virus EITC y también del virus PAK tiene un sitio de restricción adicional del que el virus 5.15 carece. Por tanto la digestión del genotipo 5.15 no produce fragmentos adicionales. Por el contrario, la digestión en el caso de genotipos EITC (en la figura) y PAK produce la escisión del producto de la PCR en dos fragmentos de distinto tamaño. En el caso de que la planta esté infectada con los dos genotipos se producirá una mezcla entre ambos patrones de digestión (mixta en la figura).

Los resultados de las transmisiones se muestran en la tabla 20. Las tasas de transmisión fueron en general muy altas y no se apreciaron diferencias significativas en los casos en los que la infección era mixta respecto al control de infección simple.

Tabla 20. Resultados de los ensayos de transmisión de planta a planta a partir de hojas con infección mixta.

Mezcla infección	Adquisición ^a	Transmisión		
		Número de experimentos	Total	Porcentaje ^b
5.15 + EITC	8	104/190	54.7%	25-79.1
5.15 + PAK	8	106/192	55.2%	4.2-83.3
5.15	8	110/176	62.5%	37.5-95.6

^a Los pulgones se alimentaron sobre hojas infectadas con las distintas variedades de PPV que correspondieron a cada caso. Para las infecciones mixtas se confirmó su naturaleza tras la transmisión por IC-RT-PCR y digestión con la enzima de restricción *SpeI*.

^b El análisis de la varianza de estos resultados con un post-test de Tukey mostró diferencias no significativas entre los tres casos analizados.

Estudios previos de un grupo de investigación alemán sobre infecciones mixtas con variantes de PPV marcadas con dos moléculas fluorescentes diferentes habían demostrado

que las dos poblaciones de PPV generadas para el estudio estaban separadas físicamente en la mayoría de la planta (Dietrich & Maiss, 2003). Estos resultados cuestionan en cierta medida la explicación de fenómenos como la frecuente aparición de recombinantes entre potyvirus, la heteroencapsidación o la complementación viral en transmisión. Teniendo en cuenta este precedente analizamos si en nuestro caso se podía dar la coexistencia de los dos tipos virales en una misma célula. El aislado EITC no es transmitido por pulgones. La tasa de transmisión del aislado PAK sin estar por completo abolida es muy baja. Por tanto, si al analizar el genotipo de la población resultante de la transmisión encontrásemos plantas únicamente infectadas por el virus EITC o PAK, la explicación más sencilla a su presencia es que su transmisión hubiese sido mediada por el factor HC-Pro del virus no modificado 5.15.

Analizamos el genotipo de las plantas infectadas con la transmisión en tres experimentos seleccionados, uno a partir de una infección mixta 5.15 + EITC y otros dos para infecciones de 5.15 + PAK. Los datos se muestran en la tabla 21.

Tabla 21. Análisis del genotipo de las plantas infectadas por transmisión a partir de infecciones mixtas con dos poblaciones de PPV.

<u>Adquisición</u>	<u>Transmisión: Genotipo plantas positivas por transmisión</u>			
	Fuente virus ^a	5.15 ^b	EITC o PAK ^b	mixta ^b
5.15 + EITC	16/24 (66.6%)	1/24 (4.1%)	—	17/24 (70.8%)
5.15 + PAK	13/24 (54.2%)	—	4/24 (16.6%)	17/24 (70.8%)
5.15 + PAK	6/23 (26%)	8/23 (34.8%)	5/23 (21.7%)	19/23 (82.6%)

^a Las plantas se infectaron con una mezcla 1:1 de tejido infectado con cada virus. A los 14 dpi se tomó una hoja para realizar los ensayos de transmisión. La mezcla de la infección se confirmó posteriormente por IC-RT-PCR y digestión y secuenciación.

^b Las plantas infectadas tras la transmisión se analizaron por IC-RT-PCR y digestión con SpeI para analizar su genotipo.

^c Se muestra el total de plantas infectadas frente a las totales en cada experimento de transmisión. Entre paréntesis el porcentaje de transmisión de cada caso.

Dos de los casos analizados mostraron plantas con infecciones sencillas del genotipo no transmisible. En el primer caso, una planta presentó una infección con virus PPV EITC. Este virus no es transmisible (capítulo IV.1.2.2) y sin embargo es transmitido a partir de una infección mixta, en la que está presente el factor HC-Pro 5.15. Por otra parte, en un segundo caso el virus mayoritariamente transmitido es PAK, incluso por delante de la transmisión de 5.15. Dada su baja tasa de transmisión en infección simple (2.5%, véase tabla 14) es lógico pensar que en este caso, en el que el porcentaje de transmisión es bastante superior, también tiene que haber habido una asistencia por parte de proteína HC-Pro 5.15.

V. Discusión

V.1 ESTUDIO DE INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS EN VARIANTES NO TRANSMISIBLES DEL POTYVIRUS TEV.

V.1.1 ESTUDIO DE INTERACCIÓN DE HC-Pro DE TEV CONSIGO MISMO Y CON LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA MEDIANTE ENSAYOS FAR WESTERN BLOT.

La técnica de *Far Western blot* ha sido ampliamente utilizada en el estudio de interacciones de proteínas implicadas en transmisión por pulgones (Blanc *et al.*, 1997, Peng *et al.*, 1998, Ruíz-Ferrer *et al.*, 2004). Por este motivo decidimos emplearla como primera aproximación para analizar la interacción entre las distintas proteínas derivadas de variantes de virus TEV no transmisibles (Llave *et al.*, 2002). Este sistema permite detectar la interacción de proteína hisHC-Pro purificada con proteína HC-Pro presente en extractos procedentes de plantas infectadas, así como la interacción con la CP del virus en los mismos extractos (Fernández-Calvino, 2006). Cuando empleamos esta técnica con los mutantes de HC-Pro y con la variante no modificada 7DA-CIB, se observó que la esperada interacción no tenía lugar. Este resultado era sorprendente puesto que la variante de virus 7DA sí es transmisible por pulgones, según trabajos publicados anteriormente (López-Moya *et al.*, 1999) incluyendo ensayos realizados en nuestro propio laboratorio (Llave *et al.*, 2002). La falta de interacción de la proteína hisHC-Pro con la CP del virus cuestionaba su transmisibilidad, ya que se considera que la interacción entre HC-Pro y CP es esencial para el proceso. Procedimos a analizar la transmisibilidad del virus producido por el clon completo infeccioso 7DA, mediante ensayos de transmisión planta a planta. Los resultados de estos ensayos mostraron que la variante de TEV que derivaba del clon completo que denominamos 7DA-CIB no era transmisible por pulgones. En este ensayo se utilizó como control transmisible tejido infectado con el clon completo HCH10 para el que la interacción entre HC-Pro y CP sí se había detectado por *Far Western blot*. La confirmación de que la no transmisibilidad del virus 7DA-CIB se debía a defectos en su proteína de la cápsida vino dada por los ensayos de transmisión con partículas purificadas de este virus. En este tipo de ensayos la partícula viral purificada es transmitida gracias a la asistencia por parte de factor HC-Pro purificado. Posteriormente la secuenciación de la región codificante de la proteína CP tanto del virus 7DA-CIB como del virus que sí resultó transmitido por pulgones HCH10, y su comparación con las publicadas para este virus, ha permitido detectar un cambio en el clon 7DA-CIB del que dispone nuestro laboratorio respecto a la secuencia descrita ya por

López-Moya y colaboradores (López-Moya *et al.*, 1999) y a la publicada recientemente por el grupo del Dr. Santiago Elena (Carrasco *et al.*, 2006). Curiosamente, la secuencia presente en el clon completo infeccioso disponible en nuestro laboratorio no corresponde a la publicada para los aislados transmisibles 7DA o HAT, diferenciándose de la presente en los aislados HAT por un único cambio en la región amino terminal generando un dominio VDAGVDAG, que no coincide con ninguna de las variantes ya estudiadas (López-Moya *et al.*, 1999). Se confirma así la importancia del contexto molecular que rodea al motivo conservado DAG cerca del extremo amino terminal de la CP en transmisibilidad, ya que los experimentos realizados permiten afirmar que dicho cambio anula la interacción entre la partícula viral y proteína hisHC-Pro purificada. Previsiblemente esa falta de interacción es responsable de la ausencia de transmisión, como confirman los resultados de los ensayos de transmisión por membrana de partículas purificadas asistidas con hisHC-Pro de TEV purificado.

Una cuestión difícil de resolver la plantea el origen de esta variante que hemos denominado 7DA-CIB para diferenciarla de otras variantes de TEV. En nuestro laboratorio se recibió originalmente el clon completo denominado 7DA, proporcionado amablemente por el Dr. J.C. Carrington, y con el que se realizaron numerosos trabajos experimentales. Es posible que en algún momento posterior, durante sucesivas multiplicaciones y almacenamientos, apareciera una variante diferente que es la que ahora mantenemos como 7DA-CIB. Tampoco se podría descartar que la preparación original contuviera una mezcla de secuencias y que ésta se hubiera terminado imponiendo durante alguna reamplificación en bacteria.

V.1.2 ESTUDIO DE INTERACCIÓN DE HC-Pro DE TEV CON LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DEL VIRUS.

Para profundizar en el estudio de las proteínas HC-Pro modificadas por mutagénesis en la región rica en cisteínas se decidió analizar su capacidad de interacción con la proteína CP, interacción que se considera necesaria para que se produzca la transmisión. Trabajos en nuestro laboratorio muestran que la proteína HC-Pro expresada en levaduras es activa en transmisión (Ruíz-Ferrer *et al.*, 2004) y por este motivo decidimos utilizar un sistema basado en este tipo de organismos que permite analizar en detalle las interacciones entre proteínas: el sistema de dos híbridos de levaduras (YTHS). Aunque esta metodología se ha empleado para estudiar interacciones entre proteínas virales, y en concreto en potyvirus (Guo *et al.*, 1999, Urcuqui-Inchima *et al.*, 1999a,

Urcuqui-Inchima *et al.*, 2000, Guo *et al.*, 2001, Kang *et al.*, 2004), nuestros resultados con TEV no han sido los esperados, resultando no detectables las interacciones en las que esté implicada la proteína de la cápsida de TEV. La proteína CP de potyvirus debe interactuar consigo misma durante el proceso de encapsidación de la partícula viral, y asimismo se dispone de información sobre su capacidad de interactuar también con la proteína HC-Pro, según se ha descrito en varios trabajos que empleaban diversas técnicas como son el *Far Western blot* (Blanc *et al.*, 1997), métodos basados en el uso de anticuerpos específicos que detectan esta interacción *in planta* (Roudet-Tavert *et al.*, 2002), o técnicas que emplean electroforesis nativa y posterior análisis por *Western blot* (Manoussopoulos *et al.*, 2000). Por este motivo se puede pensar que la no detección por YTHS de la interacción de la proteína CP consigo misma ni con proteína HC-Pro activa en transmisión, podría deberse a algún tipo de fenómeno artefactual que esté afectando a la técnica. Además el problema parece estar afectando únicamente a la proteína CP y no a HC-Pro, puesto que la interacción de la proteína HC-Pro consigo misma sí fue detectada. Existen varios motivos que podrían resultar en este tipo de artefactos que impedirían ver una interacción entre proteínas. Un primer motivo sería la falta de expresión, pero en nuestro caso se ha comprobado que todas las proteínas se expresan de forma correcta con el tamaño esperado y en una cantidad detectable (resultados no mostrados), por lo que este motivo se ha descartado. Sin embargo, pueden existir otras causas que explicarían la incapacidad de detección de la interacción. Por ejemplo, ya que las proteínas cuya capacidad de interacción se quiere estudiar se producen como proteínas de fusión unidas en su extremo amino terminal a los dominios encargados posteriormente de activar la transcripción de los genes delatores, es posible que sufran cambios conformacionales respecto a la proteína nativa que no tiene esta fusión en su extremo amino terminal, y como consecuencia enmascarar la interacción que de otro modo sí se produciría.

En lo que respecta a la proteína de la cápsida de potyvirus, existen varios estudios sobre su estructura tridimensional que sitúan la región amino terminal, donde por otra parte se localiza el dominio DAG implicado en la transmisión del virus, expuesto hacia el exterior de la estructura (Shukla *et al.*, 1988, Baratova *et al.*, 2001, Voloudakis *et al.*, 2004). El hecho de añadir una fusión en esta región podría afectar drásticamente su estructura y si esta región estuviera implicada en la interacción con la proteína HC-Pro, como sugiere la presencia del dominio DAG, interferir con dicha interacción.

Por otra parte, cabe también la posibilidad de que en la proteína de fusión se altere la conformación de la región necesaria para la activación transcripcional de los

genes delatores. Esto podría anular la funcionalidad del dominio de unión a DNA y del dominio de activación, e imposibilitar la detección de la interacción entre las proteínas estudiadas. Otro de los posibles factores que pueden impedir la obtención de resultados es el hecho de que las proteínas de fusión deben ser traslocadas al núcleo. Para ello existen señales de localización nuclear, pero si estas señales no se encuentran accesibles en la estructura de las proteínas de fusión, las mismas no serían capaces de alcanzar el núcleo de la célula y no se podría activar la transcripción de los genes delatores necesaria para estudiar la interacción. A menudo estos casos en los que, ya sea la señal de localización nuclear o bien los dominios de activación y unión a DNA, no están accesibles en la estructura global de la proteína de fusión, se han relacionado con proteínas de elevado tamaño (Fields & Sternglanz, 1994, Golemis *et al.*, 1997).

La proteína de la cápsida de TEV tiene 263 residuos y un peso molecular aproximado de unos 30-35 KDa. Aunque no es una proteína que pueda considerarse grande, no obstante no se puede descartar que algún factor estructural estuviera afectando las interacciones de la proteína CP consigo misma así como con otras proteínas. Por tanto se decidió producir una serie de variantes truncadas de la proteína y repetir los estudios de dos híbridos con éstas. Puesto que no está resuelta la estructura de esta proteína, para decidir la extensión de las deleciones se llevó a cabo un estudio previo de predicción de estructura secundaria considerando los resultados obtenidos con el programa JPRED. Las regiones en las que se decidió truncar la proteína se escogieron porque estaban poco estructuradas según la predicción, por lo que se intentaba minimizar el riesgo de que ninguna estructura funcional se viera afectada. Los nuevos ensayos de dos híbridos se llevaron a cabo con los diferentes fragmentos de la proteína CP interaccionando consigo mismos entre si, con la proteína CP completa y con la proteína HC-Pro activa en transmisión, observándose que ninguna de las variantes generadas fue capaz de interaccionar con la proteína HC-Pro, lo que indica que los problemas para analizar la interacción de la proteína CP con HC-Pro se mantienen en las variantes truncadas de la CP. Además, ninguno de los fragmentos de CP interaccionaron con la CP entera, y en las pruebas de interacción entre los fragmentos consigo mismos, únicamente en un caso la variante R2 fue capaz de interaccionar consigo misma. Este fragmento representa aproximadamente los dos tercios amino terminales, e incluye la región central o núcleo de la CP (Shukla *et al.*, 1988) donde se presume deben residir los dominios de interacción de la proteína consigo misma, como han confirmado resultados experimentales con expresión en bacteria de deleciones de la CP de TEV (Voloudakis *et al.*, 2004). En cambio los extremos amino (variante R1) y carboxilo (variante F2) no interaccionan consigo mismos. La ausencia de interacción entre fragmentos F2 contrasta

con un trabajo reciente en otro potyvirus que describe la importancia en interacción de la región carboxilo (Kang *et al.*, 2006). Es interesante que el fragmento F1 que incluye el extremo carboxilo y la región central no muestre interacción consigo mismo. Una posible explicación a este hecho podría ser que la presencia del extremo carboxilo fuese la responsable de la falta de interacción, pero tampoco se puede descartar que el plegamiento de los fragmentos sea incorrecto. Serían necesarios más datos para poder concluir cuáles son los motivos que dificultan en el sistema de dos híbridos de levaduras la observación de interacciones en las que presumiblemente participa la CP de TEV. El disponer de un modelo estructural de la proteína podría arrojar luz sobre este hecho, pero desgraciadamente no se ha comunicado hasta el momento la resolución de la estructura de la CP de ningún potyvirus que nos permita ni siquiera modelizar tridimensionalmente la CP de TEV.

Otros grupos han estudiado previamente la interacción entre las proteínas HC-Pro y CP de otros potyvirus mediante el sistema de dos híbridos (Choi *et al.*, 2000, Guo *et al.*, 2001, Kang *et al.*, 2004). En algunos de estos casos, como para PSbMV o PVA, tampoco se ha logrado detectar la interacción entre CP y HC-Pro, por lo que este problema podría no estar afectando únicamente al potyvirus TEV.

A la vista de las dificultades para obtener datos mediante el sistema empleado, alternativamente se pensó en utilizar los plásmidos generados para los ensayos de dos híbridos en estudios de inmunoprecipitación, y se llevaron a cabo una serie de experimentos preliminares para evaluar si era posible detectar interacciones entre las proteínas de interés. Sin embargo los resultados tampoco fueron informativos en este caso, puesto que los anticuerpos complementarios a los epítomos presentes en las distintas proteínas de fusión no se comportaron como específicos de las proteínas que presentaban el mismo epítomo. En consecuencia, la interpretación de las observaciones no permite concluir si la aparición en las fracciones inmunoprecipitadas de las distintas proteínas se debe a su interacción con otros productos o a artefactos de la técnica.

La proteína CP de potyvirus sufre modificaciones post traduccionales como la fosforilación y glicosilación (Ivanov *et al.*, 2001, Fernández-Fernández *et al.*, 2002). Este tipo de fenómenos dependen de enzimas del huésped en el que se produce la infección por el virus (Chen *et al.*, 2005) y no tienen por qué producirse del mismo modo en un sistema experimental como *S. cerevisiae*. Si este tipo de modificaciones fueran necesarias para que se produjera la interacción entre las proteínas HC-Pro y CP, el

YTHS no sería adecuado entonces para estudiarlas y esta podría ser otra causa para la no detección de la interacción entre las proteínas CP y HC-Pro de TEV con ese sistema.

V.1.3 ESTUDIO DE INTERACCIÓN DE LA PROTEÍNA HC-PRO DE TEV CONSIGO MISMA.

Puesto que la interacción de hisHC-Pro de TEV consigo misma sí había sido detectada por YTHS, se decidió profundizar en este caso, analizando si los mutantes disponibles en la región rica en cisteínas mantenían la capacidad de interaccionar, o si quizá la presencia de mutaciones en esta región estaba alterando la interacción. Los resultados de los experimentos realizados han mostrado que se mantiene la capacidad de interacción de la proteína HC-Pro consigo misma en todos los casos, tanto para variantes funcionales como no funcionales en transmisión. Sin embargo, cuando se empleó el gen delator de la β -galactosidasa para cuantificar la fortaleza de la interacción, los niveles de esta enzima fueron superiores en los casos en los que el HC-Pro era activo para transmisión (figura 20), si bien las diferencias con los valores obtenidos en el resto de los mutantes no fueron significativas para todos los casos. Esta tendencia observada podría sugerir una interacción más débil en el caso de las variantes no transmisibles. Aunque la correlación no es completa, los datos apuntan en la dirección de que las variantes transmisibles poseen proteínas HC-Pro capaces de interaccionar consigo mismas con más fuerza que en el caso de las variantes no transmisibles. Actualmente no se tiene suficiente información sobre cómo ocurre la dimerización u oligomerización de la proteína HC-Pro de potyvirus, y existen ciertas discrepancias entre los estudios disponibles en diferentes virus y con distintas metodologías de análisis. Una hipótesis que ayudaría a explicar las discrepancias entre los trabajos disponibles, sería la presencia de múltiples zonas de interacción, es decir que sean necesarios varios puntos de interacción en la estructura de la proteína para que se produzca la estructura multimérica activa en transmisión. Podría entonces darse el caso de que en las proteínas no activas en transmisión se perdiera algún punto de interacción, aunque ésta no quedara abolida completamente, por lo que el estudio por YTHS seguiría detectando la interacción en la levadura, y únicamente reduciría la fuerza de la interacción en términos cuantitativos, como se observa en nuestros resultados.

Existen estudios en la literatura que han analizado la interacción de la proteína HC-Pro consigo misma empleando el sistema de dos híbridos. Esta interacción ha sido detectada en numerosos potyvirus tales como PVA (Guo *et al.*, 1999), PSbMV (Guo *et al.*, 2001), LMV y PVY (Urcuqui-Inchima *et al.*, 1999b), SMV (Kang *et al.*, 2004) o el

tritimovirus WSMV (Choi *et al.*, 2000). Además, algunos de estos trabajos analizan los dominios mínimos de dimerización de esta proteína. Sin embargo, los resultados de estos trabajos no son coincidentes. En el caso de PVA, Guo y colaboradores (Guo *et al.*, 1999) describieron los dominios mínimos necesarios para que se produzca la interacción de HC-Pro consigo mismo por YTHS: éstos se localizaban entre los residuos 112 y 135 de la región amino terminal y los últimos 120 residuos en el extremo carboxilo de la proteína. Por tanto, según este trabajo la región rica en cisteínas incluyendo el dominio KITC es prescindible para detectar interacción de HC-Pro de PVA consigo mismo por YTHS. Sin embargo, Urcuqui-Inchima y colaboradores (Urcuqui-Inchima *et al.*, 1999a, Urcuqui-Inchima *et al.*, 2000) observaron que, para los casos de LMV y PVY, únicamente la región amino terminal, y en concreto los primeros 72 y 83 residuos respectivamente, son esenciales para que se produzca la interacción lo que sí incluiría la región rica en cisteínas y el dominio KITC. Asimismo describen cómo la mutación de determinados dominios de la región rica en cisteínas es capaz de abolir la capacidad de interacción de HC-Pro consigo mismo. La secuencia de la proteína HC-Pro de TEV se parece más a la de PVA que a la de LMV o PVY (Adams *et al.*, 2005) por lo que quizá no es de extrañar que se comporte en YTHS de manera similar a PVA, y que mutaciones en la región rica en cisteínas (prescindible para la interacción de HC-Pro de PVA consigo misma) no anulen la interacción de la proteína consigo misma.

Como ya hemos mencionado en numerosas ocasiones la forma activa en transmisión de la proteína HC-Pro de potyvirus es al menos un dímero (Thornbury *et al.*, 1985, Plisson *et al.*, 2003, Ruíz-Ferrer *et al.*, 2005). Trabajos previos de nuestro laboratorio sugerían la posibilidad de que la pérdida de transmisión en todos estos mutantes de TEV se debía quizá a defectos en la dimerización de la proteína (Llave *et al.*, 2002). Los resultados muestran que la proteína HC-Pro estudiada en todos los casos interacciona consigo misma. Los análisis cuantitativos parecen indicar una mayor activación del gen de la β -galactosidasa en el caso de las variantes transmisibles que en las no transmisibles aunque las diferencias no son claramente significativas. En el caso de PVY, mutaciones en residuos conservados en esta región abolían la capacidad de interacción (Urcuqui-Inchima *et al.*, 1999a). Nuestro trabajo no analiza las posiciones equivalentes en TEV por lo que quizá el efecto no sea el mismo aunque en nuestro caso sí que parece observarse un “debilitamiento” en la fuerza de la interacción en el caso de los mutantes no transmisibles por pulgón. Por otra parte nos gustaría destacar que el trabajo de Urcuqui-Inchima y colaboradores no realiza ningún estudio del efecto de estas mutaciones en el contexto del genoma viral, y genera los mutantes únicamente en los plásmidos para el estudio de las interacciones por YTH sin estudiar el efecto que puedan

tener estas modificaciones sobre el ciclo viral, ni en concreto sobre el proceso de transmisión. En cualquier caso los resultados obtenidos para un potyvirus en este tipo de estudios no tiene por qué coincidir con los obtenidos para otro potyvirus empleando el mismo sistema como ya se ha podido observar en la literatura, y otros factores como el plegamiento de las proteínas de fusión generadas podrían estar afectando los resultados (Choi *et al.*, 2000, Guo *et al.*, 2001, Kang *et al.*, 2004).

Los resultados de interacción fueron confirmados mediante un sistema *in vitro* con traducción de las proteínas en un sistema no celular y ensayos de inmunoprecipitación empleando anticuerpos específicos de epítomos añadidos a la secuencia proteica. En todos los casos se confirmó la interacción de la proteína HC-Pro consigo misma.

V.2 GENERACIÓN Y ANÁLISIS DE VARIANTES NO TRANSMISIBLES DE PPV POR MODIFICACIONES EN LAS REGIONES CODIFICANTES DE LAS PROTEINAS CP Y HC-Pro.

El presente trabajo se ha llevado a cabo usando como virus modelo el virus de la Sharka, PPV. Se disponía de un clon completo infeccioso de una variante transmisible de este virus, pero al iniciar el trabajo no se disponía de clones completos infecciosos de variantes no transmisibles. Uno de los objetivos de este trabajo fue desarrollar un sistema de expresión heterólogo para producir proteína HC-Pro fuera del contexto de la infección viral por expresión transitoria basada en *A. tumefaciens* y estudiar su actividad en transmisión. Para llevar a cabo este objetivo fue necesario en primer lugar generar varios clones infecciosos de PPV que dieran lugar a variantes en las que se hubiera perdido su capacidad de transmisión. Para ello se diseñaron mutantes con modificaciones en distintos dominios de las proteínas que intervienen en el proceso de transmisión, y se caracterizaron sus propiedades.

Para los ensayos de transmisión secuencial empleando partículas virales purificadas y con asistencia de proteína HC-Pro producida por expresión transitoria se precisaba de un control de proteína HC-Pro activa en transmisión y procedente de infección viral. Para ello se generó un clon completo con una delección de 15 aminoácidos en el extremo amino terminal de la región codificante de la proteína de la cápsida CP. El clon obtenido se denominó pICPPV CPNAT. La delección generada ya fue descrita en

aislados naturales no transmisibles (Maiss *et al.*, 1989, López-Moya *et al.*, 1995), por tanto era previsible que el clon generado no tuviera problemas de infectividad ni de acumulación viral al menos en el huésped experimental empleado en este trabajo. En efecto, el virus producido con la delección se acumuló a niveles similares al virus no modificado, y tal y como cabía esperar perdió su transmisibilidad por pulgones. Según resultados previos con otros potyvirus, la pérdida del dominio DAG en este mutante debería inhabilitar la interacción entre la proteína HC-Pro y la proteína CP (Blanc *et al.*, 1997). El resultado es que plantas infectadas con este virus deberían ser fuente de HC-Pro funcionalmente activo aunque el virus no pueda ser transmitido a causa de esta delección en la región codificante de su proteína de la cápsida. Los ensayos de transmisión secuencial de partículas purificadas con alimentación previa en plantas infectadas con este virus han demostrado la actividad en transmisión de dicho HC-Pro, confirmando las previsiones anteriores.

La actividad de la proteína HC-Pro expresada transitoriamente también se analizó en transmisiones con una única alimentación en planta de los pulgones. Para realizar este tipo de ensayos era preciso obtener clones infecciosos no transmisibles por causa de modificaciones en la región HC-Pro. De este modo, expresando transitoriamente proteína HC-Pro en plantas infectadas con estos clones, se podría analizar su actividad en transmisión. Así se produjeron los clones pICPPV EITC y pICPPV PAK. Ambos cambios aminoacídicos han sido descritos en aislados naturales no transmisibles de otros potyvirus (Thornbury *et al.*, 1990, Granier *et al.*, 1993, Canto *et al.*, 1995) así como en clones generados por mutagénesis que resultaron infecciosos y no transmitidos por pulgón (Atreya & Pirone, 1993, Huet *et al.*, 1994, Blanc *et al.*, 1998, Peng *et al.*, 1998). Dado que estos dominios alterados se encuentran ya en aislados no transmisibles en la naturaleza, era de esperar que al analizar la sintomatología y niveles de acumulación de estos virus no se observaran diferencias con el virus transmisible, como en efecto ocurrió en nuestro caso.

En ensayos de transmisión el clon pICPPV EITC perdió completamente su capacidad de transmisión, tal y como ocurre para otros potyvirus (Atreya & Pirone, 1993, Blanc *et al.*, 1998). Sin embargo, en el caso del mutante pICPPV 5.15 PAK, aunque se produjo una drástica reducción en la tasa de transmisión por pulgones, ésta no fue total. Este resultado coincide con los estudios de mutagénesis realizados con el potyvirus ZYMV (Huet *et al.*, 1994, Peng *et al.*, 1998). En principio el dominio PTK ha sido implicado en la interacción entre la proteína HC-Pro y la partícula viral pero parece razonable pensar que, tal y como ocurre en el caso de dos dominios KITC de HC-Pro

(Llave *et al.*, 2002) y DAG de la CP (López-Moya *et al.*, 1999), no sólo este dominio esté implicado en esta interacción sino que todo el contexto en el que se encuentra el mismo participa de algún modo en el proceso. Además, el cambio de treonina, un aminoácido polar sin carga en PTK, por alanina, un aminoácido apolar en PAK, no tendría la misma trascendencia estructural que por ejemplo el cambio de KITC por EITC, por lo que se puede pensar que no sea suficiente para abolir la función por completo. Tampoco se pueden descartar diferencias estructurales entre las proteínas HC-Pro de distintos potyvirus que explicaran comportamientos distintos para la misma mutación puntual.

V.3 PRODUCCIÓN DE HC-Pro DE PPV MEDIANTE EXPRESIÓN TRANSITORIA EN *N. benthamiana* y *N. tabacum*.

Para realizar la expresión transitoria de HC-Pro de PPV en plantas se decidió emplear dos plantas huésped con el fin de determinar en cual de ambas la expresión era más estable y la acumulación de proteína mayor. Durante el diseño de la estrategia de clonaje en el vector de expresión pCAMBIA 2300 se tuvieron en cuenta datos disponibles en la literatura; por ejemplo se decidió introducir la región 5' no traducible, el cistrón correspondiente a la proteína P1, el correspondiente a la proteína de nuestro interés HC-Pro y un pequeño fragmento de la región codificante de la proteína P3. La construcción así diseñada dará lugar a proteínas P1 y HC-Pro liberadas por autoproteólisis, y por tanto con extremos N y C idénticos a los producidos en la infección viral. La inclusión de un fragmento pequeño de P3 buscaba que el procesamiento autoproteolítico de HC-Pro ocurriera con la misma eficiencia que en la poliproteína viral.

Los elementos genéticos virales incluidos en la construcción se introdujeron buscando una optimización de la expresión. La región 5' no traducible de potyvirus ha sido descrita en diferentes trabajos como un elemento potenciador de la traducción, siendo capaz de actuar como sistema de traducción independiente de cap (Carrington & Freed, 1990, Simon-Buela *et al.*, 1997, Zeenko & Gallie, 2005) y por tanto su presencia podría aumentar los niveles de acumulación de la proteína HC-Pro. El descubrimiento de la acción supresora del PTGS de la proteína HC-Pro en varios laboratorios de forma simultánea (Anandalakshmi *et al.*, 1998, Brigneti *et al.*, 1998, Kasschau & Carrington, 1998) marcó un hito en la historia de la virología vegetal, y ya desde estos trabajos pioneros se menciona la actividad potenciadora que posee la proteína P1 de la función supresora de HC-Pro (Anandalakshmi *et al.*, 1998, Kasschau & Carrington, 1998). Por este motivo se decidió incorporar en la misma construcción la región codificante de la

proteína P1 que se produce como proteína activa por procesamiento autocatalítico. En el caso de PPV, recientemente Valli y colaboradores (Valli *et al.*, 2006) han descrito el efecto potenciador que la presencia de la proteína P1 tiene en la función de supresión de PTGS por parte de HC-Pro. En este trabajo se ha demostrado la ausencia de actividad supresora de la proteína P1 *per se*, y cómo ésta es capaz de potenciar el efecto supresor de la proteína HC-Pro de PPV en *cis* cuando ambas proteínas se producen a partir de una misma construcción, y no cuando se producen en *trans* a partir de dos vectores de expresión distintos. En consecuencia, nuestra construcción debería mostrar un efecto potenciado en cuanto a la capacidad intrínseca de HC-Pro de suprimir silenciamiento génico, y por tanto cabría esperar una mejor expresión comparada con construcciones que no incluyeran la proteína P1. Los altos niveles de expresión conseguidos en plantas de *N. benthamiana*, que llegan a superar la acumulación obtenida en plantas infectadas por el virus, confirman esta predicción.

Al analizar los niveles de acumulación de proteína HC-Pro madura en plantas agroinfiltradas se pudo observar claramente como la expresión de la proteína era mucho mayor en *N. benthamiana* que en *N. tabacum*. En el caso de este segundo huésped, en la mayoría de los ensayos repetidos que se realizaron ni siquiera fue posible la detección de la proteína. Esta observación abre aspectos interesantes que es necesario considerar. Primero, el virus PPV causa infección sistémica en *N. benthamiana* y no así en *N. tabacum*, lo que podría sugerir una relación entre el movimiento sistémico del virus y los niveles de expresión de la proteína HC-Pro. Trabajos previos sugerían que quizá en *N. tabacum* la falta de movimiento sistémico del virus PPV podía estar relacionada con la capacidad supresora de esta proteína en dicho huésped (Saenz *et al.*, 2002). Por este motivo se decidió analizar los niveles de mRNA así como la acumulación de sRNAs en ambos huéspedes. El objetivo era estudiar si en el caso de *N. tabacum* se produce un fenómeno de PTGS más acusado que en *N. benthamiana*, y que esto pudiera explicar los bajos niveles de expresión en *N. tabacum*. Sin embargo, se observó una menor acumulación de mRNA en *N. tabacum* que en *N. benthamiana*, y que no se correspondía con un fenómeno de PTGS más exacerbado, puesto que apenas se detectaban sRNAs procedentes de la construcción en las plantas de *N. tabacum* agroinfiltradas. Por el contrario, siendo la acumulación de mRNA mayor en *N. benthamiana*, sí se encontraron sRNAs homólogos a la construcción agroinfiltrada. Este último resultado está en consonancia con el reciente descubrimiento de un mecanismo que se asocia a la capacidad de supresión de HC-Pro (Lakatos *et al.*, 2006). La proteína HC-Pro actúa secuestrando las moléculas inductoras del silenciamiento, los dúplex de siRNA, impidiendo el progreso del PTGS, aunque al estabilizarlos también permite su detección en ensayos tipo *Northern blot*. En el caso de *N. benthamiana*, en ausencia de proteína

HC-Pro, el RNA mensajero de construcciones agroinfiltradas es degradado por el mecanismo de silenciamiento génico. En el caso de nuestra construcción, en cuanto se produce una pequeña cantidad de proteína HC-Pro activa, esta proteína actúa como supresor de silenciamiento, impidiendo que el mensajero sea degradado, y contribuyendo a retroalimentar la expresión de la construcción. Por el contrario, en plantas de *N. tabacum* agroinfiltradas con la misma construcción, se observa que los niveles de mRNA son menores desde el comienzo. Una posible explicación para la falta de acumulación en esta especie es que al ser la transcripción menor desde un principio en *N. tabacum*, no se produce suficiente proteína supresora HC-Pro que pueda contrarrestar el efecto del silenciamiento, y los niveles de mRNA se mantienen bajos sin producirse niveles detectables de sRNAs ni de proteína. La menor eficiencia inicial en transcripción y por tanto traducción vendría condicionada por características desconocidas, específicas de tabaco. Especulativamente, la existencia de por ejemplo factores del huésped diferentes entre *N. benthamiana* y *N. tabacum* podría afectar al correcto procesamiento proteolítico de la construcción traducida, impidiendo de esa forma la producción de proteína HC-Pro activa. Asimismo tampoco se puede descartar algún efecto que la proteína P1 también expresada a partir de la construcción pTRANS5'PPV pueda tener en todo el sistema.

En cualquier caso, a la luz de los ensayos de *Northern blot* en los que a tiempos inferiores al desencadenamiento del PTGS ya se observan menores niveles de mRNA en *N. tabacum* que en *N. benthamiana*, parece claro que la menor acumulación inicial de mRNA en *N. tabacum* comparado con *N. benthamiana* está reflejando un fenómeno que ya actuaría en la transcripción, condicionando después toda la evolución posterior. Este resultado podría estar en consonancia con los ya publicados para la producción de otras proteínas distintas al HC-Pro, en los que se observan diferencias de expresión en distintos huéspedes, incluso entre diferentes miembros del género *Nicotiana* (Andrews & Curtis, 2005, Marillonnet *et al.*, 2005, Sheludko *et al.*, 2006).

La conclusión práctica que debemos derivar de nuestras observaciones es la necesidad de probar más de un huésped potencial para poder escoger en cada caso el más adecuado.

V.4 ESTUDIOS DE FUNCIONALIDAD DE HC-PRO EXPRESADO TRANSITORIAMENTE EN ENSAYOS DE TRANSMISIÓN.

Durante el desarrollo de esta tesis se ha podido demostrar por primera vez la actividad en transmisión de la proteína HC-Pro expresada transitoriamente. Para ello se llevaron a cabo dos tipos de ensayos: ensayos en los que los pulgones adquirieron e inocularon partículas virales purificadas tras dos alimentaciones secuenciales, y ensayos en los que los pulgones adquirieron simultáneamente partículas virales y proteína HC-Pro expresada transitoriamente.

En el primer tipo de ensayo los pulgones tuvieron acceso secuencialmente a dos tipos de fuentes de alimentación. En la primera alimentación se utilizaron hojas de *N. benthamiana* que expresaban HC-Pro de PPV transitoriamente. Así el aparato bucal de los pulgones podría cargarse de proteína activa necesaria para transmitir virus adquirido en una segunda alimentación. La segunda alimentación se produjo a través de membranas artificiales de Parafilm® en una solución conteniendo únicamente partículas de virus purificadas en ausencia de proteína HC-Pro. Posteriormente los pulgones se traspasaron a pequeñas plántulas de *N. benthamiana* para la inoculación del virus. El hecho de que el virus fuera inoculado en estas plantas demuestra la funcionalidad de la proteína expresada transitoriamente en *N. benthamiana*.

Además se diseñó un control experimental generando el clon pICPPV 5.15 CPNAT. Durante la infección sistémica inducida por este virus se produce proteína HC-Pro activa que procede de la propia infección viral. El virus presente en estas plantas no puede, sin embargo, ser transmitido porque presenta una delección en el extremo amino de la proteína de la cápsida que anula el dominio DAG y por tanto se considera que no tiene capacidad de interaccionar con la proteína HC-Pro, interacción necesaria para que el virus sea transmitido por el pulgón. Los ensayos de alimentación secuencial empleando plantas infectadas con pICPPV 5.15 CPNAT resultaron ser un control positivo óptimo para analizar la actividad en transmisión de la proteína HC-Pro producida por expresión transitoria.

No obstante, hay que mencionar una elevada variabilidad en los resultados de transmisión entre los distintos ensayos independientes (la tasa de transmisión osciló entre un 12.5 y un 50% para la proteína producida por expresión transitoria y entre un 8.3 y un 65% para el control positivo con PPV CPNAT). Este hecho podría estar ocasionado

por diversos motivos: en primer lugar, la complejidad del ensayo con varias manipulaciones de los pulgones podrían modificar su comportamiento alimenticio, y por tanto influir en la transmisión del virus. Otro posible motivo sería el hecho de estar trabajando con partículas virales purificadas. La experiencia previa de nuestro laboratorio sugiere que en efecto la estabilidad de las partículas virales purificadas es una posible causa para la reducción de la tasa de transmisión de potyvirus en determinados casos (Fernández-Calvino, 2006). Además cabe destacar que la bajada en la tasa de transmisión en determinados ensayos ocurría simultáneamente tanto para el control positivo con PPV CPNAT como para las hojas agroinfiltradas con pTRANS5'PPV. En todos los casos se utilizó en cada repetición la misma preparación de partículas purificadas para ambas transmisiones, lo que explicaría la bajada simultánea en la tasa de transmisión en los dos casos si ésta se debiera a un deterioro en la calidad de las partículas purificadas.

Con el doble fin de simplificar el ensayo y evitar la variabilidad que parece introducir la diferente calidad de las preparaciones de viriones purificados, se buscó analizar la actividad de la proteína HC-Pro expresada transitoriamente desde otra aproximación experimental. Para ello se diseñó un segundo tipo de experimento en el que la transmisión se realizase únicamente en una alimentación. En este tipo de ensayos se necesitaba disponer de algún clon de PPV no transmisible a causa de modificaciones en la región HC-Pro. Se utilizó inicialmente un clon quimérico de PPV disponible en el laboratorio (Martínez-García, 2000). Este clon posee la región codificante de la proteína HC-Pro del virus PVY en el contexto genético de PPV. A pesar de que la proteína HC-Pro de PVY puede asistir la transmisión de partículas de PPV (López-Moya *et al.* 1995, Fernández-Calvino, 2006) la quimera no es transmisible en ensayos de transmisión de planta a planta. Esta quimera posee dos cambios aminoacídicos en la región amino terminal del factor HC-Pro para posibilitar el procesamiento proteolítico por parte de la proteína P1 de PPV (figura 6), y esta modificación podría ser la causa para la pérdida de transmisión por pulgones de esta quimera, aunque tampoco se podrían descartar otros motivos, como por ejemplo una diferente localización intracelular de las proteínas HC-Pro de PPV y de PVY.

Los ensayos de transmisión planta a planta han demostrado que también de esta manera la proteína HC-Pro de PPV producida por agroinfiltración fuera del contexto de la infección viral es activa en transmisión, ya que permitía recuperar la transmisibilidad de la quimera no transmisible. Sin embargo, la construcción que expresaba transitoriamente HC-Pro de PVY en el contexto de PPV no fue capaz de asistir la transmisión del propio

virus quimérico. Este dato confirma la pérdida de función del HC-Pro de PVY producido en un contexto quimérico y hace menos probable de que esta pérdida de función se debiera a una distinta localización en el contexto de la célula infectada puesto que la proteína HC-Pro de PPV expresada transitoriamente sí que asiste la transmisión del virus quimérico. Por tanto, y como ya he mencionado antes, las modificaciones efectuadas en el extremo amino terminal de la proteína HC-Pro de PVY para permitir su procesamiento proteolítico por parte de la proteasa P1 de PPV es muy posible que estén afectando la actividad en transmisión de esta proteína.

La transmisión de virus quimérico no transmisible por parte de HC-Pro de PPV producido transitoriamente fue inferior comparada con la transmisión de la variante silvestre 5.15. Para estudiar si esta menor eficiencia de la proteína HC-Pro de PPV en transmisión se debía únicamente a la proteína así expresada, o si el uso del virus quimérico podía estar teniendo algún efecto negativo en la transmisión por pulgones, utilizamos los clones pICPPV EITC y pICPPV PAK para los que la transmisión había sido completamente anulada o drásticamente reducida a consecuencia de modificaciones realizadas en los dominios conservados KITC y PTK de la región codificante de la proteína HC-Pro, mientras que el resto de la secuencia del virus era idéntica a la presente en el clon transmisible pICPPV 5.15.

Los resultados obtenidos en los ensayos de transmisión fueron de nuevo menores a los observados en un control positivo de transmisión utilizando el virus PPV 5.15. Además, este efecto no se puede explicar por una menor acumulación de la proteína producida en las agroinfiltraciones puesto que los ensayos previos de acumulación de proteína demostraron que la acumulación de proteína HC-Pro en hojas agroinfiltradas era similar e incluso superior a la presente en una infección viral. Tampoco parece plausible que la proteína expresada transitoriamente tenga una actividad menor que la producida en una infección viral, puesto que en los ensayos de transmisión secuencial ya mencionados no se apreciaron diferencias significativas entre las transmisiones realizadas con PPV 5.15 CPNAT como fuente de HC-Pro activo y las realizadas con hojas agroinfiltradas con pTRANS5'PPV. Cabe la posibilidad de que la distribución celular de la proteína expresada tras la agroinfiltración no sea la misma que la distribución de las partículas virales. Podría suceder que la proteína expresada transitoriamente y las partículas virales se acumularan en regiones e incluso compartimentos subcelulares distintos dentro de la misma célula y por tanto, la adquisición de ambos componentes simultáneamente fuera menos probable que en el caso de una infección natural con un aislado viral transmisible. En esta línea cabe

mencionar el trabajo publicado recientemente por Torrance y colaboradores (Torrance *et al.*, 2006) en el que los autores postulaban una posible adquisición conjunta del HC-Pro y del virus formando parte de un complejo preformado, por parte del pulgón. Esta hipótesis de todos modos resulta un tanto controvertida, puesto que las partículas virales purificadas que poseían moléculas de HC-Pro unidas en su extremo 5' deberían poder ser transmitidas por pulgón, y sin embargo la experiencia acumulada indica que los viriones purificados nunca son transmitidos, por lo que el hipotético papel en transmisión de ese complejo preformado no sería suficiente. Es posible, por tanto, que dado que la proteína HC-Pro es una proteína multifuncional implicada en numerosas funciones, la que se encuentra unida a las partículas virales esté implicada en una función distinta a la de transmisión. Sin embargo tampoco se puede descartar un papel en el proceso, de forma que fuera necesaria pero no suficiente. Por ejemplo, que el estado de oligomerización en que se encuentra cuando se une al extremo 5' de la partícula viral no sea el óptimo para que se produzca la transmisión por pulgones, y necesite interactuar con otras moléculas de HC-Pro para alcanzar su plena funcionalidad.

Otra posible explicación a la reducción observada en los ensayos de transmisión con proteína agroinfiltrada sobre planta infectada con variantes virales no transmisibles sería la de que la proteína HC-Pro inactiva procedente de la infección viral pudiera estar interfiriendo de algún modo con la proteína expresada transitoriamente, disminuyendo así la capacidad de actuación de ésta o alterando de algún modo la interacción entre el virus y la molécula de HC-Pro activa. Esta hipótesis, de confirmarse, abriría la puerta a la posibilidad de interferir en el proceso.

V.5 ENSAYOS DE INTERFERENCIA EN LA TRANSMISIÓN DE PPV.

En la línea de la última hipótesis mencionada en el anterior capítulo, se plantearon una serie de experimentos en los que diferentes moléculas de HC-Pro inactivas en transmisión se expresaron transitoriamente para intentar disminuir la tasa de transmisión del virus PPV. Para ello se generaron dos variantes del plásmido pTRANS5'PPV: pTRANS5'PPV EITC y pTRANS5'PPV PAK. Ambos procedían de los clones completos generados previamente pICPPV EITC (no transmisible) y pICPPV PAK (con transmisibilidad muy reducida). En un primer ensayo se empleó el mismo esquema que para asistir la transmisión de variantes no transmisibles. Las plantas fueron infectadas con el clon transmisible pICPPV 5.15 y agroinfiltradas con las construcciones que expresaban las proteínas HC-Pro no funcionales EITC y PAK. Estas hojas se usaron

para alimentar pulgones y la tasa de transmisión se comparó con la resultante de ensayos en los que no se expresó proteína HC-Pro adicional o, si se expresó, ésta era funcional en transmisión. Los resultados indicaron un ligero descenso en la tasa de transmisión, si bien los análisis estadísticos mostraron que estas diferencias no eran significativas. Este resultado tiene varias posibles explicaciones. Siguiendo la hipótesis planteada en el capítulo anterior acerca de la posible distinta localización subcelular de la proteína producida a partir de la infección viral y la producida por expresión transitoria mediada por *A. tumefaciens*, podría suceder que si la proteína alterada no se encuentra físicamente próxima a las partículas virales la interferencia se ve dificultada. Esto explicaría el leve descenso en la tasa de transmisión sin llegar a ser significativo.

Los ensayos de interacción se han realizado con dos tipos moléculas interferentes: HC-Pro EITC y HC-Pro PAK. En los ensayos en los que se empleó HC-Pro EITC se buscaba “secuestrar” las partículas virales mediante la interacción con esta proteína modificada. En el caso de que la transmisión se produjera a partir de complejos preformados de HC-Pro y partícula viral, la interacción de las partículas virales con moléculas HC-Pro EITC estaría bloqueando las partículas virales puesto que la proteína HC-Pro EITC no interaccionaría después con el lugar de unión del pulgón. Sin embargo, los resultados no mostraron una interferencia significativa. En este hecho pueden estar interviniendo varios factores: en primer lugar se desconoce la estabilidad de la interacción HC-Pro partícula viral. Tampoco se sabe si la partícula viral interacciona con una o varias moléculas de HC-Pro que medien a su vez la interacción con el sitio de unión en el canal alimenticio del pulgón. Si los puntos de interacción entre la partícula viral y distintas proteínas HC-Pro son numerosos, y no todos son necesarios para que se produzca la unión al estilete del pulgón, resultaría muy difícil, en presencia de una cantidad suficiente de HC-Pro funcional procedente de la infección viral, bloquear todos los sitios de unión con HC-Pro EITC, y únicamente un elevado desequilibrio en la relación de formas funcionales y no funcionales llegaría a traducirse en una disminución de la tasa de transmisión. En lo que respecta a los ensayos empleando proteína HC-Pro PAK, en este caso, la proteína tiene inhabilitada la interacción con la partícula viral. El objetivo era entonces que esta proteína compitiera con el HC-Pro funcional procedente de la infección viral por los sitios de unión en el canal alimenticio del pulgón, disminuyendo el número de sitios disponibles. Nuevamente se desconoce si el número de lugares de unión en el aparato bucal del pulgón es elevado, o si son varias las moléculas de HC-Pro necesarias para que la partícula viral sea retenida. Tampoco se sabe si la hipótesis de la adquisición mediada por complejos preformados es acertada, y de serlo las posibilidades de interferir

con variantes no funcionales de HC-Pro podrían venir muy condicionadas por factores como la diferente localización y la concentración local dentro de la célula.

No obstante, dado el interés aplicado de la interferencia con el mecanismo de transmisión de potyvirus, se buscaron nuevas estrategias intentado agotar todas las posibilidades para producir una interferencia en el proceso. Se emplearon nuevos ensayos de transmisión secuencial en los que los pulgones fueron prealimentados en hojas en las que se expresó transitoriamente HC-Pro PAK. El objetivo fue anular el efecto que pudiera tener la presencia simultánea de la proteína HC-Pro funcional procedente de la infección viral y la proteína expresada transitoriamente. Estos ensayos se llevaron a cabo únicamente con proteína HC-Pro PAK puesto que se considera que la proteína HC-Pro EITC no interacciona con los receptores del pulgón. Los pulgones tuvieron entonces la posibilidad de adquirir en la primera alimentación HC-Pro PAK y posteriormente se alimentaron sobre plantas infectadas con el virus transmisible PPV 5.15. En este caso tampoco se observó una reducción significativa en la tasa de transmisión. Estudios realizados en nuestro laboratorio (Fernández-Calvino, 2006) parecen apuntar al hecho de que en los casos en los que el pulgón se alimenta consecutivamente sobre dos plantas infectadas con dos aislados distintos de PPV el aislado transmitido es casi siempre el segundo, encontrándose evidencias además que parecen indicar que en la segunda alimentación se liberan tanto el primer virus como su molécula HC-Pro homóloga, puesto que en los ensayos en los que la segunda alimentación se daba sobre plantas infectadas con el virus PPV EITC los valores de transmisión se veían prácticamente anulados. Esta hipótesis explicaría la falta de interferencia en este tipo de ensayos, puesto que si la proteína HC-Pro PAK se libera durante la segunda alimentación de los pulgones, no se observaría ningún fenómeno de interferencia.

Por último se llevaron a cabo experimentos con los clones completos infecciosos disponibles. Se realizaron infecciones mixtas con mezclas de virus PPV transmisible y no transmisible y se analizó si se producía algún fenómeno de competencia entre ambas variantes y la transmisión por pulgones se veía reducida. En ningún caso se observó una reducción significativa en la tasa de transmisión. Existen numerosos trabajos realizados con infecciones mixtas de potyvirus. Sin embargo, los resultados no son concluyentes en lo que se refiere a los posibles efectos de las infecciones mixtas en procesos como la transmisión. Son numerosos los ejemplos descritos en la literatura de heteroencapsidación de virus, complementación y fenómenos de recombinación en poblaciones mixtas (Lecoq & Pitrat, 1985, Bourdin & Lecoq, 1991, Taliansky & García-

Arenal, 1995, Froissart *et al.*, 2005) que favorecen la hipótesis de que en infecciones mixtas con dos poblaciones virales, ambas están presentes en las mismas células. Sin embargo también existen trabajos publicados cuyos resultados van en contra de esta hipótesis. Dietrich y Maiss (Dietrich & Maiss, 2003) sugieren en un trabajo realizado con clones de potyvirus marcados con moléculas fluorescentes que los puntos en los que se encuentran mezclados los dos virus dentro de la misma célula son pocos, y que en general las poblaciones virales se encuentran separadas físicamente en distintas regiones de la planta a la que infectan. Las infecciones mixtas realizadas en nuestros ensayos de transmisión son muy similares a las descritas por Dietrich y Maiss, siendo posible que el patrón de distribución de las dos poblaciones virales sea similar al descrito en este trabajo.

Los niveles de transmisión no fueron menores en plantas con infecciones mixtas que en plantas únicamente infectadas con el virus no modificado. Sin embargo, la infección mixta fue confirmada en todos los casos en la hoja empleada en los experimentos de transmisión. Para ello se realizó IC-RT-PCR y posterior digestión con la enzima de restricción *SpeI* que permite distinguir el virus no modificado de las variantes modificadas. El hecho de que la tasa de transmisión no se viera disminuida significativamente puede deberse a varios motivos. En primer lugar la técnica por la que se realizan las transmisiones utilizando 10 pulgones para cada planta en la que se ensaya la inoculación del virus impide aislar el fenómeno de inoculación. El uso de este número de vectores obedece a la baja tasa de transmisión con pulgones individuales, que obligaría a realizar un gran número de repeticiones para obtener resultados. Puesto que se utilizan en cada caso 10 pulgones, habiéndose alimentado cada uno de ellos en una región distinta de la planta ya que se recogen al azar, no se puede descartar que cada uno haya adquirido variantes diferentes. Éste es el principal problema para el análisis de los resultados, puesto que la inoculación del virus puede provenir de cualquiera de los pulgones empleados o incluso de varios de ellos. Existe sin embargo una tecnología que podría utilizarse para realizar un seguimiento individualizado de la actividad de cada vector: la monitorización mediante gráficas de penetración eléctrica (EPG), disponible por ejemplo en el grupo del Dr. Alberto Fereres (ICA, CSIC). Aunque este trabajo excede los objetivos de la presente tesis, sería muy interesante abordarlo en un futuro estudio.

Incluso suponiendo que ambos virus estuvieran presentes en las mismas células, otros factores podrían estar impidiendo un efecto interferente por parte de las moléculas de HC-Pro modificadas. La proteína HC-Pro se produce a partir de la poliproteína viral acumulándose en el citoplasma de las células infectadas, lo que resulta en la formación

en ocasiones de cuerpos de inclusión denominados amorfos (Rubio-Huertos, 1978, Edwarson, 1992,). De este hecho se deduce que debe haber una gran acumulación de la proteína en el citoplasma de las células infectadas y por tanto es posible que este exceso impida en parte la interferencia por parte de moléculas de HC-Pro modificadas puesto la proteína funcional también se expresa a altos niveles. En otras palabras, la función de asistencia de la transmisión no se vería limitada por la cantidad de factor ayudante disponible, y por tanto sería muy difícil competir en una situación de partida en saturación. Nuevamente sería posible analizar esta hipótesis en un futuro mediante la experimentación con diluciones adecuadas de los factores implicados que nos alejaran de la zona de saturación. En cualquier caso, este sistema artificial no reflejaría las condiciones naturales en las que ocurre la transmisión.

Durante el desarrollo de los experimentos de transmisión a partir de infecciones mixtas se decidió analizar también el genotipo de los virus transmitidos en los ensayos. En el caso de las infecciones mixtas estudiadas, no se apreció ninguna tendencia en cuanto a las infecciones presentes en las plantas inoculadas, y se encontraron tanto infecciones mixtas como sencillas. Si las poblaciones virales estuvieran espacialmente separadas en la superficie foliar y asumimos que, puesto que el tiempo de adquisición no supera los cinco minutos, los pulgones se alimentan en una única región de la hoja de *N. benthamiana*, cabría esperar que los casos de infecciones mixtas fueran poco frecuentes, cosa que no sucede. Por el mismo motivo, si existiera una separación física entre las dos poblaciones en la mayoría de la superficie foliar sería de esperar que la transmisión de las variantes de virus no transmisibles no se produjera. Sin embargo, estas consideraciones no tienen suficiente apoyo para considerarse concluyentes, puesto que al realizarse las transmisiones con 10 pulgones por planta la inoculación del virus no tiene por qué provenir de un único pulgón, e incluso si se utilizara un único vector, éste podría realizar más de una inserción de prueba en distintas zonas de la hoja. De nuevo, el sistema de monitorización EPG sería el más adecuado para abordar estas cuestiones, ya que permitiría asegurar en cada caso la actividad de adquisición. El interés de estas preguntas hace que diversos grupos con sistemas experimentales diferentes estén dedicando esfuerzos para contestarlas en colaboración con el grupo del Dr. Fereres (Blanc, 2006, Touriño *et al.*, 2006) y es posible que en los próximos años nuestra comprensión del fenómeno se beneficie de los nuevos datos que previsiblemente se irán obteniendo.

El proceso de transmisión está mediado por tres elementos: el insecto vector, la proteína HC-Pro y la partícula viral. Se conocen las bases del mecanismo de la

transmisión, sin embargo aún se desconocen muchos aspectos concretos de este proceso. Poco se sabe acerca de los posibles sitios de unión de la molécula HC-Pro en el canal alimenticio del pulgón. Nuestro laboratorio ha realizado importantes esfuerzos en el estudio y búsqueda de los sitios de unión de la proteína HC-Pro en el estilete del pulgón (Fernández-Calvino, 2006) si bien aún queda mucho por estudiar en esta parte de la interacción. Se desconoce, también, el número de puntos de unión de proteína HC-Pro (receptores) en el canal alimenticio del pulgón como tampoco se sabe si la unión entre la proteína HC-Pro y la partícula viral se produce en un único punto o en varios dentro de la partícula. No se tienen datos acerca de la estabilidad de la interacción entre los lugares de unión en el canal alimenticio del pulgón y la proteína HC-Pro, como tampoco se tienen datos sobre la estabilidad de la interacción de esta última proteína con la partícula viral en las distintas situaciones y ambientes (insecto, planta) donde ocurren. Por todos estos motivos se piensa que para poder diseñar una estrategia de interferencia del mecanismo sería necesario aumentar el conocimiento de toda la red de interacciones que están implicadas en el proceso de la transmisión por pulgones.

Finalmente hay que resaltar que todos estos estudios de interferencia han sido realizados sobre un organismo modelo, *N. benthamiana*, y no sobre el huésped natural del virus que en el caso de PPV serían árboles frutales tales como melocotoneros, ciruelos y otras especies del género *Prunus*.

N. benthamiana es una planta ampliamente utilizada en el laboratorio por su rápido crecimiento y facilidad de manejo. Además esta planta es huésped sistémico de numerosos virus, siendo además su sintomatología muy acusada. Se ha propuesto que existan razones genéticas para esta susceptibilidad, por ejemplo porque una de las RNA polimerasas dependientes de RNA necesaria para que se produzca una respuesta de defensa por parte de la planta está truncada (Yang *et al.*, 2004). Por tanto, es posible que esta u otras carencias defensivas que pueda tener este huésped estén enmascarando la interferencia de modo que no hayamos podido apreciar diferencias estadísticamente significativas. Así, se requiere de una mayor profundización en este sentido que nos permita determinar si tampoco existe interferencia en otros huéspedes para PPV, como también ensayar este mecanismo de interferencia con otros potyvirus distintos a PPV.

Pese a ser objeto de numerosos estudios por parte de distintos grupos científicos, aún existen importantes lagunas en el conocimiento de los mecanismos moleculares que median la transmisión de potyvirus por pulgones. Aún existen importantes retos para el

futuro en esta línea de investigación, como la identificación de las moléculas implicadas en la retención del virus en los estiletes del pulgón, o la caracterización estructural de la proteína HC-Pro, por lo que se seguirán dedicando esfuerzos para la consecución de estos objetivos y otros nuevos que vayan planteándose, hasta conseguir diseñar nuevos métodos que permitan mejorar el control de estas virosis.

VI. Conclusiones

El estudio de los mecanismos de transmisión por pulgones de potyvirus, y de los factores virales implicados en dicho proceso, nos ha permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1. Experimentos de *Far Western blot* utilizando diversos aislados virales nos han permitido identificar una modificación en la secuencia aminoacídica de la región amino terminal de la proteína CP del clon completo infeccioso TEV 7DA-CIB disponible en nuestro laboratorio que inhabilita su interacción con la proteína HC-Pro, siendo la causa más probable de la pérdida de transmisión de dicha variante.
2. El sistema de los dos híbridos de levaduras ha permitido estudiar las interacciones de mutantes de la proteína HC-Pro de TEV. La proteína HC-Pro interacciona consigo misma en todos los casos estudiados, no obstante los análisis semi-cuantitativos empleando el gen delator β -galactosidasa indican que la interacción es más fuerte en las proteínas procedentes de variantes virales transmisibles por pulgón. La interacción consigo misma de HC-Pro se confirma por inmunoprecipitación de las proteínas producidas *in vitro*. En cambio, el análisis de interacciones en las que presuntamente participa la proteína de la cápsida CP de TEV no ha sido posible mediante ninguno de los dos sistemas anteriores.
3. La proteína HC-Pro de PPV ha sido expresada transitoriamente mediante agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana*, alcanzando una acumulación comparable a la de una infección viral. Por el contrario, la expresión en *N. tabacum* de la misma proteína resultó indetectable por *Western blot*. El estudio de acumulación de mRNA y sRNA indica que los niveles de mRNA son menores en *N. tabacum* que en *N. benthamiana*, pero no parece que este hecho se deba a un proceso de silenciamiento génico post transcripcional, ya que no se observa un aumento de los sRNAs.
4. La proteína HC-Pro de PPV expresada transitoriamente en *N. benthamiana* es funcional en transmisión. En ensayos de transmisión de partículas purificadas, la proteína expresada transitoriamente es capaz de asistir su transmisión al mismo nivel que proteína HC-Pro procedente de infección viral. En ensayos de transmisión de variantes de PPV no transmisibles, se recupera la transmisibilidad de los mismos por complementación de función gracias a la proteína agroinfiltrada, si bien los niveles de transmisión son más bajos que los observados para virus transmisibles.

Conclusiones

5. Se han ensayado diversos métodos para interferir en la transmisión de PPV por pulgones. La expresión de variantes no funcionales de HC-Pro en hojas infectadas con virus transmisible reduce ligeramente la transmisión del virus si bien las diferencias no son significativas cuando se comparan con experimentos control. En ensayos de transmisión con alimentación previa en hojas expresando HC-Pro no funcional, tampoco se redujo significativamente la tasa de transmisión del virus.

6. Ensayos de transmisión con infecciones mixtas de dos variantes de PPV, una transmisible y otra no transmisible por modificaciones en la proteína HC-Pro, no mostraron una reducción significativa de la tasa de transmisión. Las variantes virales transmitidas fueron tanto la transmisible como la no transmisible, indicando posiblemente una asistencia por parte de la proteína HC-Pro del virus transmisible en la transmisión del no transmisible.

VII. Bibliografía

- Adams, M. J., Antoniw, J. F. & Fauquet, C. M. (2005).** Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Archives of Virology* **150**, 459-479.
- Allison, R. F., Dougherty, W. G., Parks, T. D., Johnson, R. E., Kelly, M. & Armsrong, F. B. (1985).** Biochemical analysis of the capsid protein gene and capsid protein of tobacco etch virus: N-terminal amino acids are located on the virion's surface. *Virology* **147**, 309-316.
- 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.
- Ammar, E. D., Jarlfors, U. & Pirone, T. P. (1994).** Association of potyvirus helper component protein with virions and the cuticle lining the maxillary food canal and foregut of an aphid vector. *Phytopathology* **84**, 1054-1060.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G. J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A. C., Smith, T. H. & Vance, V. B. (1998).** A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13079-84.
- Andrews, L. B. & Curtis, W. R. (2005).** Comparison of transient protein expression in tobacco leaves and plant suspension culture. *Biotechnol Prog* **21**, 946-52.
- Atreya, C. D., Raccach, B. & Pirone, T. P. (1990).** A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. *Virology* **178**, 161-5.
- Atreya, P. L., Atreya, C. D. & Pirone, T. P. (1991).** Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7887-91.
- Atreya, C. D., Atreya, P. L., Thornbury, D. W. & Pirone, T. P. (1992).** Site-directed mutations in the potyvirus HC-Pro gene affect helper component activity, virus accumulation, and symptom expression in infected tobacco plants. *Virology* **191**, 106-11.
- Atreya, C. D. & Pirone, T. P. (1993).** Mutational analysis of the helper component-proteinase gene of a potyvirus: effects of amino acid substitutions, deletions, and gene replacement on virulence and aphid transmissibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11919-23.
- Atreya, P. L., López-Moya, J. J., Chu, M., Atreya, C. D. & Pirone, T. P. (1995).** Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. *J Gen Virol* **76 (Pt 2)**, 265-70.
- Badenes, M. L. & Llacer, G. (2006).** Breeding for resistance: breeding for Plum pox virus resistant apricots (*Prunus armeniaca* L.) in Spain. *EPPO Bulletin* **36**, 323-326.
- Barajas, D., Tenllado, F., González-Jara, P., Martínez-García, B., Atencio, F. A. & Díaz-Ruiz, J. R. (2004).** Resistance to Plum Pox Virus (PPV) in *Nicotiana benthamiana* plants transformed with the PPV HC-Pro silencing suppressor gene. *Journal of Plant Pathology* **86**, 239-248.
- Barajas, D., Tenllado, F. & Díaz-Ruiz, J. R. (2006).** Characterization of the recombinant forms arising from a Potato virus X chimeric virus infection under RNA silencing pressure. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 904-13.
- Baratova, L. A., Efimov, A. V., Dobrov, E. N., Fedorova, N. V., Hunt, R., Badun, G. A., Ksenofontov, A. L., Torrance, L. & Jarvekulg, L. (2001).** In situ spatial organization of Potato virus A coat protein subunits as assessed by tritium bombardment. *J Virol* **75**, 9696-702.
- Bartel, P., Chien, C. T., Sternglanz, R. & Fields, S. (1993).** Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* **14**, 920-4.
- Berger, P. H. & Pirone, T. P. (1986).** The effect of helper component on the uptake and localization of potyviruses in *Myzus persicae*. *Virology* **153**, 256-261.
- Berger, P. H., Hunt, A. G., Domier, L. L., Hellmann, G. M., Stram, Y., Thornbury, D. W. & Pirone, T. P. (1989).** Expression in transgenic plants of a viral gene product that mediates insect transmission of potyviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8402-6.
- Blanc, S., López-Moya, J. J., Wang, R., García-Lampasona, S., Thornbury, D. W. & Pirone, T. P. (1997).** A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology* **231**, 141-7.
- Blanc, S., Ammar, E., García-Lampasona, S., Dolja, V., Llave, C., Baker, J. & Pirone, T. (1998).** Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *J Gen Virol* **79**, 3119-22.
- Blanc, S., Dolja, V., Llave C & Pirone, T. (1999).** Histidine-tagging and purification of tobacco etch potyvirus helper component protein. *J Virol Methods* **77**, 11-5.
- Blanc, S., Hébrard, E., Drucker, M. & Froissart, R. (2001).** Molecular basis of vector transmission: caulimoviruses. In *Virus-INsect-Plant Interactions*, pp. 143-166. Edited by K. Harris, S. O.P. & D. J.E. San Diego: Academic Press.
- Blanc, S. (2006).** Single or multiple infections on host cells: causes and consequences for plant viruses. In *EMBO Workshop in Plant Virology 2006*. Edited by EMBO. Helsinki, July 2006.

- Bourdin, D. & Lecoq, H. (1991).** Evidence that heteroencapsidation between two potyviruses is involved in aphid transmission of a non-aphid-transmissible isolate from mixed infections. *Phytopathology* **81**, 1459-1464.
- Brault, V., Perigon, S., Reinbold, C., Erdinger, M., Scheidecker, D., Herrbach, E., Richards, K. & Ziegler-Graff, V. (2005).** The polerovirus minor capsid protein determines vector specificity and intestinal tropism in the aphid. *J Virol* **79**, 9685-93.
- Brault, V., Herrbach, E. & Reinbold, C. (2007).** Electron microscopy studies on luteovirid transmission in aphids. *Micron* **38**, 302-12.
- Brent, R. & Ptashne, M. (1985).** A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* **43**, 729-736.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W. X., Ji, L. H., Ding, S. W. & Baulcombe, D. C. (1998).** Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Embo J* **17**, 6739-46.
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A.J. & Watson, L. (1996).** Viruses of plants. Cambridge, UK: CAB International.
- Bryan, G. T., Gardner, R. C. & Forster, R. L. (1992).** Nucleotide sequence of the coat protein gene of a strain of clover yellow vein virus from New Zealand: conservation of a stem-loop structure in the 3' region of potyviruses. *Arch Virol* **124**, 133-46.
- Budnik, K., Laing, M. D. & da Graca, J. V. (1996).** Reduction of yield losses in pepper crops caused by potato virus Y in KwaZulu-Natal, South Africa, using plastic mulch and yellow sticky traps. *Phytoparasitica* **24**, 119-124.
- Cambra, M., Capote, N., Myrta, A. & Llácer, G. (2006).** Plum pox virus and the estimated costs associated with sharka disease. *Bulletin OEPP/EPPO* **36**, 202-204.
- Canto, T., López-Moya, J. J., Serra-Yoldi, M. T., Díaz Ruíz, J. R. & López-Abella, D. (1995).** Different helper component mutations associated with lack of aphid transmissibility in two isolates of potato virus Y. *Phytopathology* **85**, 1519-1524.
- Carrasco, P., Daros, J. A., Agudelo-Romero, P. & Elena, S. F. (2006).** A real-time RT-PCR assay for quantifying the fitness of tobacco etch virus in competition experiments. *J Virol Methods*.
- Carrington, J. C. & Dougherty, W. G. (1987).** Small Nuclear Inclusion Protein Encoded by a Plant Potyvirus Genome Is a Protease. *J Virol* **61**, 2540-2548.
- Carrington, J. C., Cary, S. M., Parks, T. D. & Dougherty, W. G. (1989a).** A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *Embo J* **8**, 365-70.
- Carrington, J. C., Freed, D. D. & Sanders, T. C. (1989b).** Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in *Escherichia coli* and in vitro. *J Virol* **63**, 4459-63.
- Carrington, J. C. & Freed, D. D. (1990).** Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. *J Virol* **64**, 1590-7.
- Carrington, J. C., Freed, D. D. & Oh, C. S. (1990).** Expression of potyviral polyproteins in transgenic plants reveals three proteolytic activities required for complete processing. *Embo J* **9**, 1347-53.
- Carrington, J. C., Jensen, P. E. & Schaad, M. C. (1998).** Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *Plant J* **14**, 393-400.
- Cronin, S., Verchot, J., Haldeman-Cahill, R., Schaad, M. C. & Carrington, J. C. (1995).** Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell* **7**, 549-59.
- Chen, D., Juarez, S., Hartweck, L., Alamillo, J. A., Simon-Mateo, C., Perez, J. J., Fernández-Fernández, M. R., Olszewski, N. E. & García, J. A. (2005).** Identification of secret agent as the O-GlcNAc transferase that participates in Plum Pox virus infection. *Journal of Virology* **79**, 9381-9387.
- Choi, I. R., Stenger, D. C. & French, R. (2000).** Multiple interactions among proteins encoded by the mite-transmitted wheat streak mosaic tritimovirus. *Virology* **267**, 185-98.
- de Assis Filho, F. M., Naidu, R. A., Deom, C. M. & Sherwood, J. L. (2002).** Dynamics of *Tomato Spotted wilt virus* Replication in the Alimentary Canal of Two Thrips Species. *Phytopathology* **92**, 729-733.
- Dietrich, C. & Maiss, E. (2003).** Fluorescent labelling reveals spatial separation of potyvirus populations in mixed infected *Nicotiana benthamiana* plants. *J Gen Virol* **84**, 2871-6.
- Dolja, V. V., McBride, H. J. & Carrington, J. C. (1992).** Tagging of plant potyvirus replication and movement by insertion of beta-glucuronidase into the viral polyprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10208-12.
- Dolja, V. V., Haldeman, R., Robertson, N. L., Dougherty, W. G. & Carrington, J. C. (1994).** Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *Embo J* **13**, 1482-91.

- Dombrovsky, A., Huet, H., Chejanovsky, N. & Raccah, B. (2005).** Aphid transmission of a potyvirus depends on suitability of the helper component and the N terminus of the coat protein. *Arch Virol* **150**, 287-98.
- Dougherty, W. G., Willis, L. & Johnston, R. E. (1985).** Topographic analysis of tobacco etch virus capsid protein epitopes. *Virology* **144**, 66-72.
- Dougherty, W. G. & Parks, T. D. (1989).** Molecular genetic and biochemical evidence for the involvement of the heptapeptide cleavage sequence in determining the reaction profile at two tobacco etch virus cleavage sites in cell-free assays. *Virology* **172**, 145-55.
- Dougherty, W. G., Parks, T. D., Cary, S. M., Bazan, J. F. & Fletterick, R. J. (1989).** Characterization of the catalytic residues of the tobacco etch virus 49-kDa proteinase. *Virology* **172**, 302-10.
- Drucker, M., Froissart, R., Hebrard, E., Uzest, M., Ravallec, M., Esperandieu, P., Mani, J. C., Pugniere, M., Roquet, F., Fereres, A. & Blanc, S. (2002).** Intracellular distribution of viral gene products regulates a complex mechanism of cauliflower mosaic virus acquisition by its aphid vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2422-7.
- Edwarson, J. R. (1992).** Inclusion bodies. In *Potyvirus Taxonomy*, pp. 25-30. Edited by O. W. Barnett. Wien & New York: Springer-Verlag.
- Edwarson, J. R. & Christie, R. G. (1996).** Cylindrical Inclusions. In *Agricultural Experimental Station bulletin no. 894*. Edited by U. o. Florida. Gainesville, FL: University of Florida.
- Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. & Ball, L. A. (2004).** Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Elsevier Academic Press.
- Fernández-Calvino, L. (2006).** Estudio del proceso de transmisión por pulgones: Análisis de la complementariedad de las proteínas implicadas y de la interacción del factor HC-Pro con estructuras del pulgón. In *Departamento de Genética*, pp. 179. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Fernández-Fernández, M. R., Camafeita, E., Bonay, P., Méndez, E., Albar, J. P. & García, J. A. (2002).** The capsid protein of a plant single-stranded RNA virus is modified by O-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem* **277**, 135-40.
- Fields, S. & Sternglanz, R. (1994).** The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet* **10**, 286-92.
- Filichkin, S. A., Brumfield, S., Filichkin, T. P. & Young, M. J. (1997).** In vitro interactions of the aphid endosymbiotic SymL chaperonin with barley yellow dwarf virus. *J Virol* **71**, 569-77.
- Flasinski, S. & Cassidy, B. G. (1998).** Potyvirus aphid transmission requires helper component and homologous coat protein for maximal efficiency. *Arch Virol* **143**, 2159-72.
- Froissart, R., Roze, D., Uzest, M., Galibert, L., Blanc, S. & Michalakakis, Y. (2005).** Recombination every day: abundant recombination in a virus during a single multi-cellular host infection. *PLoS Biol* **3**, e89.
- Fuchs, M., Ferreira, S. & Gonsalves, D. (1997).** Management of Virus Diseases by Classical and Engineered Protection. *Molecular Plant Pathology Online* **1997**.
- Gal-On, A., Antignus, Y., Rosner, A. & Raccah, B. (1992).** A zucchini yellow mosaic virus coat protein gene mutation restores aphid transmissibility but has no effect on multiplication. *J Gen Virol* **73** (Pt 9), 2183-7.
- Gallie, D. R., Tanguay, R. L. & Leathers, V. (1995).** The tobacco etch viral 5' leader and poly(A) tail are functionally synergistic regulators of translation. *Gene* **165**, 233-8.
- Gallie, D. R. (2001).** Cap-independent translation conferred by the 5' leader of tobacco etch virus is eukaryotic initiation factor 4G dependent. *J Virol* **75**, 12141-52.
- García, J. A., Riechmann, J. L., Martin, M. T. & Lain, S. (1989).** Proteolytic activity of the plum pox potyvirus NIa-protein on excess of natural and artificial substrates in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **257**, 269-73.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A. & Schiestl, R. H. (1992).** Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**, 1425.
- Gildow, F. E. (1999).** Luteovirus transmission and mechanisms regulating vector specificity. In *The Luteoviridae*, pp. 88-113. Edited by H. Smith, Barker, H. Oxon, UK: CAB International.
- Goldbach, R. & Wellink, J. (1988).** Evolution of plus-strand RNA viruses. *Intervirology* **29**, 260-7.
- Goldbach, R., Eggen, R., de Jager, C., van Kammen, A., van Lent, R., Rezelman, G. & Wellink, J. (1990).** Genetic organization, evolution and expression of plant viral RNA genomes. In *Recognition and Response in plant-virus interactions*. NATO ASI series, pp. 147-162. Edited by F. R.S.S. Berlin & Heidelberg: Springer-Verlag.

- Golemis, E. A., Serebriiskii, I. & Law, S. F. (1997).** Adjustment of parameters in the yeast two-hybrid system: criteria for detecting physiologically significant protein-protein interactions. In *Gene Cloning and Analysis*. Edited by B. C. Schaefer. Wymondham, UK.: Horizon Scientific Press.
- González-Jara, P., Tenllado, F., Martínez-García, B., Atencio, F. A., Barajas, D., Vargas, M., Díaz-Ruíz, J. & Díaz-Ruíz, J. R. (2004).** Host-dependent differences during synergistic infection by Potyviruses with potato virus X. *Molecular Plant Pathology* **5**, 29-35.
- González-Jara, P., Atencio, F. A., Martínez-García, B., Barajas, D., Tenllado, F. & Díaz-Ruíz, J. R. (2005).** A single amino acid mutation in the Plum pox virus helper component-proteinase gene abolishes both synergistic and RNA silencing suppression activities. *Phytopathology* **95**, 894-901.
- Govier, D. A. & Kassanis, B. (1974a).** Evidence that a component other than the virus particle is needed for aphid transmission of potato virus Y. *Virology* **57**, 285-6.
- Govier, D. A. & Kassanis, B. (1974b).** A virus-induced component of plant sap needed when aphids acquire potato virus Y from purified preparations. *Virology* **61**, 420-6.
- Govier, D. A., Kassanis, B. & Pirone, T. P. (1977).** Partial purification and characterization of the potato virus Y helper component. *Virology* **78**, 306-14.
- Goytia, E., Fernández-Calvino, L., Martínez-García, B., López-Abella, D. & López-Moya, J. J. (2006).** Production of plum pox virus HC-Pro functionally active for aphid transmission in a transient-expression system. *J Gen Virol* **87**, 3413-23.
- Granier, F., Durand-Tardif, M., Casse-Delbart, F., Lecoq, H. & Robaglia, C. (1993).** Mutations in zucchini yellow mosaic virus helper component protein associated with loss of aphid transmissibility. *J Gen Virol* **74 (Pt 12)**, 2737-42.
- Guo, D., Merits, A. & Saarma, M. (1999).** Self-association and mapping of interaction domains of helper component-proteinase of potato A potyvirus. *J Gen Virol* **80 (Pt 5)**, 1127-31.
- Guo, D., Rajamaki, M. L., Saarma, M. & Valkonen, J. P. (2001).** Towards a protein interaction map of potyviruses: protein interaction matrixes of two potyviruses based on the yeast two-hybrid system. *J Gen Virol* **82**, 935-9.
- Guo, H. S., López-Moya, J. J. & García, J. A. (1998).** Susceptibility to recombination rearrangements of a chimeric plum pox potyvirus genome after insertion of a foreign gene. *Virus Res* **57**, 183-95.
- Hari, V., Siegel, A., Rozek, C. & Timberlake, W. E. (1979).** The RNA of tobacco etch virus contains poly(A). *Virology* **92**, 568-71.
- Harrison, B. D. & Robinson, D. J. (1988).** Molecular variation in vector-borne plant viruses: epidemiological significance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **321**, 447-62.
- Herron, C. M., Mirkov, T. E., da Graca, J. V. & Lee, R. F. (2006).** Citrus tristeza virus transmission by the Toxoptera citricida vector: in vitro acquisition and transmission and infectivity immunoneutralization experiments. *J Virol Methods* **134**, 205-11.
- Hogenhout, S. A., van der Wilk, F., Verbeek, M., Goldbach, R. W. & van den Heuvel, J. F. (2000).** Identifying the determinants in the equatorial domain of Buchnera GroEL implicated in binding Potato leafroll virus. *J Virol* **74**, 4541-8.
- Hollings, H. & Brunt, A. A. (1981).** Potyviruses. In *Handbook of plant virus infections: comparative diagnosis*, pp. 731-807: CMI/AAB.
- Hong, Y. & Hunt, A. G. (1996).** RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* **226**, 146-51.
- Hooks, C. R. R. & Fereres, A. (2006).** Protecting crops from non-persistently aphid transmitted viruses: A review on the use of barrier plants as a management tool. *Virus Research* **120**, 1-16.
- Huet, H., Gal-On, A., Meir, E., Lecoq, H. & Raccah, B. (1994).** Mutations in the helper component protease gene of zucchini yellow mosaic virus affect its ability to mediate aphid transmissibility. *J Gen Virol* **75 (Pt 6)**, 1407-14.
- Hull, R. (2002).** Matthews' Plant Virology 4th Edition. San Diego: Academic Press.
- Ivanov, K. I., Puustinen, P., Merits, A., Saarma, M. & Mäkinen, K. (2001).** Phosphorylation down-regulates the RNA binding function of the coat protein of potato virus A. *J Biol Chem* **276**, 13530-40.
- Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P. & Fields, S. (1993).** Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* **8**, 1693-6.
- Janssen, D., Martín, G., Velasco, L., Gómez, P., Segundo, E., Ruíz, L. & Cuadrado, I. M. (2005).** Absence of a coding region for the helper component-proteinase in the genome of cucumber vein yellowing virus, a whitefly-transmitted member of the Potyviridae. *Arch Virol* **150**, 1439-47.

- Johansen, I. E., Dougherty, W. G., Keller, K. E., Wang, D. & Hampton, R. O. (1996). Multiple viral determinants affect seed transmission of pea seedborne mosaic virus in *Pisum sativum*. *J Gen Virol* **77** (Pt 12), 3149-54.
- Johansen, L. K. & Carrington, J. C. (2001). Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Physiol* **126**, 930-8.
- Johnson, D. D., Walker, G. P. & Creamer, R. (2002). Stylet penetration behavior resulting in inoculation of a semipersistently transmitted closterovirus by the whitefly *Bemisia argentifolii*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **102**, 115-123.
- Kadouri, D., Peng, Y., Wang, Y., Singer, S., Huet, H., Raccach, B. & Gal-On, A. (1998). Affinity purification of HC-Pro of potyviruses with Ni²⁺-NTA resin. *J Virol Methods* **76**, 19-29.
- Kang, B. C., Yeam, I. & Jahn, M. M. (2005). Genetics of plant virus resistance. *Annual Review of Phytopathology* **43**, 581-621.
- Kang, S. H., Lim, W. S. & Kim, K. H. (2004). A protein interaction map of soybean mosaic virus strain G7H based on the yeast two-hybrid system. *Mol Cells* **18**, 122-6.
- Kang, S. H., Lim, W. S., Hwang, S. H., Park, J. W., Choi, H. S. & Kim, K. H. (2006). Importance of the C-terminal domain of soybean mosaic virus coat protein for subunit interactions. *Journal of General Virology* **87**, 225-229.
- Kassanis, B. & Govier, D. A. (1971a). New evidence on the mechanism of aphid transmission of potato C and potato aucuba mosaic viruses. *J Gen Virol* **10**, 99-101.
- Kassanis, B. & Govier, D. A. (1971b). The role of the helper virus in aphid transmission of potato aucuba mosaic virus and potato virus C. *J Gen Virol*. **13**, 221-228.
- Kasschau, K. D., Cronin, S. & Carrington, J. C. (1997). Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology* **228**, 251-62.
- Kasschau, K. D. & Carrington, J. C. (1998). A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* **95**, 461-70.
- Keegan, L., Gill, G. & Ptashne, M. (1986). Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukariotic regulatory protein. *Science* **231**, 699-704.
- Klingler, J., Kovalski, I., Silberstein, L., Thompson, G. A. & Perl-Treves, R. (2001). Mapping of cotton-melon aphid resistance in melon. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **126**, 56-63.
- Klingler, J., Creasy, R., Gao, L., Nair, R. M., Calix, A. S., Jacob, H. S., Edwards, O. R. & Singh, K. B. (2005). Aphid resistance in *Medicago truncatula* involves antixenosis and phloem-specific, inducible antibiosis, and maps to a single locus flanked by NBS-LRR resistance gene analogs. *Plant Physiology* **137**, 1445-1455.
- Lain, S., Riechmann, J. L., Mendez, E. & García, J. A. (1988). Nucleotide sequence of the 3' terminal region of plum pox potyvirus RNA. *Virus Res* **10**, 325-342.
- Lain, S., Riechmann, J. L. & García, J. A. (1989). The complete nucleotide sequence of plum pox potyvirus RNA. *Virus Res* **13**, 157-72.
- Lain, S., Riechmann, J. L. & García, J. A. (1990). RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucleic Acids Res* **18**, 7003-6.
- Lain, S., Martin, M. T., Riechmann, J. L. & García, J. A. (1991). Novel catalytic activity associated with positive-strand RNA virus infection: nucleic acid-stimulated ATPase activity of the plum pox potyvirus helicase-like protein. *J Virol* **65**, 1-6.
- Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E. J., Carrington, J. C., Liu, Y. P., Dolja, V. V., Calvino, L. F., López-Moya, J. J. & Burgyn, J. (2006). Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *Embo J*.
- Laughon, A. & Gesteland, R. F. (1984). Primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* GAL4 gene. *Molecular Cell Biology* **2**, 260-267.
- Lecoq, H., Cohen, S., Pitrat, M. & Labonne, G. (1979). Resistance to cucumber mosaic virus transmission by aphids in *Cucumis melo*. *Phytopathology* **69**, 1223-1225.
- Lecoq, H., Labonne, G. & Pitrat, M. (1980). Specificity of resistance to virus transmission by aphids in *Cucumis melo*. *Annales de Phytopathologie* **12**, 139-144.
- Lecoq, H. & Pitrat, M. (1985). Specificity of the helper-component-mediated aphid transmission of three potyviruses infecting muskmelon. *Phytopathology* **75**, 890-893.
- Lecoq, H., Bourdin, D., Raccach, B., Hiebert, E. L. & Purcifull, D. (1991). Characterization of a zucchini yellow mosaic virus isolate with a deficient helper component. *Phytopathology* **81**, 1087-1091.

- Lecoq, H., Moury, B., Desbiez, C., Palloix, A. & Pitrat, M. (2004).** Durable virus resistance in plants through conventional approaches: a challenge. *Virus Res* **100**, 31-9.
- Legavre, T., Maia, I. G., Casse-Delbart, F., Bernardi, F. & Robaglia, C. (1996).** Switches in the mode of transmission select for or against a poorly aphid-transmissible strain of potato virus Y with reduced helper component and virus accumulation. *J Gen Virol* **77 (Pt 7)**, 1343-7.
- Leh, V., Jacquot, E., Geldreich, A., Haas, M., Blanc, S., Keller, M. & Yot, P. (2001).** Interaction between the open reading frame III product and the coat protein is required for transmission of cauliflower mosaic virus by aphids. *J Virol* **75**, 100-6.
- Li, B. & Fields, S. (1993).** Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *Faseb J* **7**, 957-63.
- Liu, S., Bedford, I. D., Briddon, R. W. & Markham, P. G. (1997).** Efficient whitefly transmission of African cassava mosaic geminivirus requires sequences from both genomic components. *J Gen Virol* **78 (Pt 7)**, 1791-4.
- Liu, S., Briddon, R. W., Bedford, I. D., Pinner, M. S. & Markham, P. G. (1999).** Identification of genes directly and indirectly involved in the insect transmission of African cassava mosaic geminivirus by *Bemisia tabaci*. *Virus Genes* **18**, 5-11.
- López-Moya, J. J., Canto, T., Díaz Ruíz, J. R. & López-Abella, D. (1994).** Differentiation of mediterranean plum pox virus isolates by coat protein analysis. *Plant Pathology* **43**, 164-171.
- López-Moya, J. J., Canto, T., Díaz-Ruíz, J. R. & López-Abella, D. (1995).** Transmission by aphids of a naturally non-transmissible plum pox virus isolate with the aid of potato virus Y helper component. *J Gen Virol* **76 (Pt 9)**, 2293-7.
- López-Moya, J. J., Wang, R. Y. & Pirone, T. P. (1999).** Context of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids. *J Gen Virol* **80 (Pt 12)**, 3281-8.
- López-Moya, J. J., Fernández-Fernández, M. R., Cambra, M. & García, J. A. (2000).** Biotechnological aspects of plum pox virus. *J Biotechnol* **76**, 121-36.
- López-Moya, J. J. & García, J. A. (2000).** Construction of a stable and highly infectious intron-containing cDNA clone of plum pox potyvirus and its use to infect plants by particle bombardment. *Virus Res* **68**, 99-107.
- Llácer, G., Cambra, M. & Laviña, A. (1985).** Detección y primeros estudios del virus de la Sharka en España. *Anales INIA, Serie Agrícola* **28**, 157-166.
- Llácer, G. & Cambra, M. (2006).** Hosts and symptoms of Plum pox virus: fruiting Prunus species. *EPPO Bulletin* **36**, 219-221.
- Llave, C. (1999).** Análisis molecular de los mecanismos de transmisión de Potyvirus por pulgones. Madrid: Universidad Complutense.
- Llave, C., Martínez, B., Díaz-Ruíz, J. R. & López-Abella, D. (1999).** Helper component mutations in nonconserved residues associated with aphid transmission efficiency of a pepper isolate of potato virus Y. *Phytopathology* **89**, 1176-1181.
- Llave, C., Martínez-García, B., Díaz-Ruíz, J. R. & López-Abella, D. (2002).** Amino acid substitutions within the Cys-rich domain of the tobacco etch potyvirus HC-Pro result in loss of transmissibility by aphids. *Arch Virol* **147**, 2365-75.
- Ma, J. & Ptashne, M. (1987).** Deletion analysis in GAL4 defines two transcriptional activating segments. *Cell* **48**, 847-853.
- Ma, J. & Ptashne, M. (1988).** Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell* **55**, 443-446.
- Mahajan, S., Dolja, V. V. & Carrington, J. C. (1996).** Roles of the sequence encoding tobacco etch virus capsid protein in genome amplification: requirements for the translation process and a cis-active element. *J Virol* **70**, 4370-9.
- Maiss, E., Timpe, U., Brisske, A., Jelkmann, W., Casper, R., Himmler, G., Mattanovich, D. & Katinger, H. W. (1989).** The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA. *J Gen Virol* **70 (Pt 3)**, 513-24.
- Manoussopoulos, I. N., Maiss, E. & Tsagris, M. (2000).** Native electrophoresis and Western blot analysis (NEWeB): a method for characterization of different forms of potyvirus particles and similar nucleoprotein complexes in extracts of infected plant tissues. *J Gen Virol* **81**, 2295-8.
- Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V. & Gleba, Y. (2005).** Systemic Agrobacterium tumefaciens-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat Biotechnol* **23**, 718-23.
- Martínez-García, B. (2000).** Análisis molecular de las proteínas implicadas en la transmisión por pulgones del virus de la Sharka (Plum Pox Virus). In *Departamento de Biología Vegetal I*, pp. 114. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.

- Martínez-García, B., LLave, C., Atencio, F. A., Díaz-Ruíz, J. R. & López-Abella, D. (2001). La transmisión de los potyvirus por pulgones. *Investigación Agraria* **16**, 149-167.
- Merai, Z., Kerényi, Z., Kertesz, S., Magna, M., Lakatos, L. & Silhavy, D. (2006). Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J Virol* **80**, 5747-56.
- Merits, A., Rajamaki, M. L., Lindholm, P., Runeberg-Roos, P., Kekarainen, T., Puustinen, P., Makelainen, K., Valkonen, J. P. & Saarma, M. (2002). Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells. *J Gen Virol* **83**, 1211-21.
- Moreno, A., Hebrard, E., Uzest, M., Blanc, S. & Fereres, A. (2005). A single amino acid position in the helper component of cauliflower mosaic virus can change the spectrum of transmitting vector species. *J Virol* **79**, 13587-93.
- Morin, S., Ghanim, M., Zeidan, M., Czosnek, H., Verbeek, M. & van den Heuvel, J. F. (1999). A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus. *Virology* **256**, 75-84.
- Moustafa, T. A., Badenes, M. L., Martínez-Calvo, J. & Llácer, G. (2001). Studies on Plum pox (Sharka) resistance in apricot. *Acta hortic.* **550**, 117-120.
- Murphy, J. F., Rhoads, R. E., Hunt, A. G. & Shaw, J. G. (1990). The VPg of tobacco etch virus RNA is the 49-kDa proteinase or the N-terminal 24-kDa part of the proteinase. *Virology* **178**, 285-8.
- Nagata, T., Inoue-Nagata, A. K., Smid, H. M., Goldbach, R. & Peters, D. (1999). Tissue tropism related to vector competence of *Frankliniella occidentalis* for tomato spotted wilt tospovirus. *J Gen Virol* **80** (Pt 2), 507-15.
- Nault, L. R. (1997). Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. In *Annals of the Entomological Society of America*, pp. 521-541.
- Ng, J. C., Josefsson, C., Clark, A. J., Franz, A. W. & Perry, K. L. (2005). Virion stability and aphid vector transmissibility of Cucumber mosaic virus mutants. *Virology* **332**, 397-405.
- Ng, J. C. & Falk, B. W. (2006a). *Bemisia tabaci* transmission of specific Lettuce infectious yellows virus genotypes derived from in vitro synthesized transcript-inoculated protoplasts. *Virology* **352**, 209-15.
- Ng, J. C. & Falk, B. W. (2006b). Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* **44**, 183-212.
- Nombela, G., Williamson, V. M. & Muniz, M. (2003). The root-knot nematode resistance gene Mi-1.2 of tomato is responsible for resistance against the whitefly *Bemisia tabaci*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**, 645-649.
- Oh, C. S. & Carrington, J. C. (1989). Identification of essential residues in potyvirus proteinase HC-Pro by site-directed mutagenesis. *Virology* **173**, 692-9.
- Oruetxebarria, I., Guo, D., Merits, A., Mäkinen, K., Saarma, M. & Valkonen, J. P. (2001). Identification of the genome-linked protein in virions of Potato virus A, with comparison to other members in genus Potyvirus. *Virus Res* **73**, 103-12.
- Palacios, I., Drucker, M., Blanc, S., Leite, S., Moreno, A. & Fereres, A. (2002). Cauliflower mosaic virus is preferentially acquired from the phloem by its aphid vectors. *J Gen Virol* **83**, 3163-71.
- Peng, Y. H., Kadoury, D., Gal-On, A., Huet, H., Wang, Y. & Raccach, B. (1998). Mutations in the HC-Pro gene of zucchini yellow mosaic potyvirus: effects on aphid transmission and binding to purified virions. *J Gen Virol* **79** (Pt 4), 897-904.
- Perring, T. M., Gruenhagen, N. M. & Farrar, C. A. (1999). Management of plant viral diseases through chemical control of insect vectors. *Annu Rev Entomol* **44**, 457-81.
- Perry, K. L. & Francki, R. I. (1992). Insect-mediated transmission of mixed and reassorted cucumovirus genomic RNAs. *J Gen Virol* **73** (Pt 8), 2105-14.
- Perry, K. L., Zhang, L., Shintaku, M. H. & Palukaitis, P. (1994). Mapping determinants in cucumber mosaic virus for transmission by *Aphis gossypii*. *Virology* **205**, 591-5.
- Perry, K. L., Zhang, L. & Palukaitis, P. (1998). Amino acid changes in the coat protein of cucumber mosaic virus differentially affect transmission by the aphids *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. *Virology* **242**, 204-10.
- Plisson, C., Drucker, M., Blanc, S., German-Retana, S., Le Gall, O., Thomas, D. & Bron, P. (2003). Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. *J Biol Chem* **278**, 23753-61.
- Plisson, C., Uzest, M., Drucker, M., Froissart, R., Dumas, C., Conway, J., Thomas, D., Blanc, S. & Bron, P. (2005). Structure of the mature P3-virus particle complex of cauliflower mosaic virus revealed by cryo-electron microscopy. *J Mol Biol* **346**, 267-77.

- Powell, G., Hardie, J. & Pickett, J. A. (1998).** The effects of antifeedant compounds and mineral oil on stylet penetration and transmission of potato virus Y by *Myzus persicae* (Sulz.)(Hom., Aphidae). *Journal of Applied Entomology* **122**, 331-333.
- Powell, G. & Hardie, J. (2000).** Host-selection behaviour by genetically identical aphids with different plant preferences. *Physiological entomology* **25**, 54-62.
- Pruss, G., Ge, X., Shi, X. M., Carrington, J. C. & Bowman Vance, V. (1997).** Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* **9**, 859-68.
- Quemada, H., L'Hostis, B., Gonsalves, D., Reardon, I. M., Heinrikson, R., Hiebert, E. L., Sieu, L. C. & Slightom, J. L. (1990a).** The nucleotide sequences of the 3'-terminal regions of papaya ringspot virus strains W and P. *J Gen Virol* **71 (Pt 1)**, 203-10.
- Quemada, H., Sieu, L. C., Siemieniak, D. R., Gonsalves, D. & Slightom, J. L. (1990b).** Watermelon mosaic virus II and zucchini yellow mosaic virus: cloning of 3'-terminal regions, nucleotide sequences, and phylogenetic comparisons. *J Gen Virol* **71 (Pt 7)**, 1451-60.
- Raccah, B., Huet, H. & Blanc, S. (2001).** Molecular basis of vector transmission: Potyvirus. In *Virus-Insect-Plant Interactions*, pp. 181-206. Edited by K. F. Harris, O. P. Smith & J. E. Duffus. New York: Academic Press.
- Rankovic, M., Ogasanovic, D. & Paunovic, S. (1994).** Breeding of plum cultivars resistant to Sharka (plum pox) disease. *Acta hort.* **359**, 69-74.
- Rankovic, M. & Ogasanovic, D. (2000).** Plum cultivars and hybrids resistant to sharka. *Acta hort.* **522**, 135-139.
- Ravelonandro, M., Scorza, R. & Dunez, J. (1998).** Characterization of phenotype resistance to plum pox of transgenic plums expressing plum pox virus capsid gene. *Acta Virol* **42**, 270-2.
- Ravelonandro, M., Scorza, R., Callahan, A., Levy, L., Jacquet, C., Monsion, M. & Damsteegt, V. (2000).** The use of transgenic fruit trees as a resistance strategy for virus epidemics: the plum pox (sharka) model. *Virus Res* **71**, 63-9.
- Riechmann, J. L., Lain, S. & García, J. A. (1992).** Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J Gen Virol* **73 (Pt 1)**, 1-16.
- Riechmann, J. L., Cervera, M. T. & García, J. A. (1995).** Processing of the plum pox virus polyprotein at the P3-6K1 junction is not required for virus viability. *J Gen Virol* **76 (Pt 4)**, 951-6.
- Riedel, D., Lesemann, D. E. & Maiss, E. (1998).** Ultrastructural localization of nonstructural and coat proteins of 19 potyviruses using antisera to bacterially expressed proteins of plum pox potyvirus. *Arch Virol* **143**, 2133-58.
- Rodriguez-Cerezo, E., Klein, P. G. & Shaw, J. G. (1991).** A determinant of disease symptom severity is located in the 3'-terminal noncoding region of the RNA of a plant virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9863-7.
- Rodriguez-Cerezo, E., Ammar, E. D., Pirone, T. P. & Shaw, J. G. (1993).** Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *J Gen Virol* **74 (Pt 9)**, 1945-9.
- Rojas, M. R., Zerbini, F. M., Allison, R. F., Gilbertson, R. L. & Lucas, W. J. (1997).** Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* **237**, 283-95.
- Rossi, M., Goggin, F. L., Milligan, S. B., Kaloshian, I., Ullman, D. E. & Williamson, V. M. (1998).** The nematode resistance gene Mi of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 9750-9754.
- Roudet-Tavert, G., German-Retana, S., Delaunay, T., Delecalle, B., Candresse, T. & Le Gall, O. (2002).** Interaction between potyvirus helper component-proteinase and capsid protein in infected plants. *J Gen Virol* **83**, 1765-70.
- Rubio-Huertos, M. & López-Abella, D. (1966).** Ultraestructura de las células de pimiento infectadas con un virus y su localización en las mismas. *Microbiología Española* **19**, 7-86.
- Rubio-Huertos, M. (1978).** Atlas of Ultrastructure of Plant Tissues infected with viruses. Edited by CSIC. Madrid: CSIC.
- Ruden, D. M., Ma, J., Li, Y., Wood, K. & Ptashne, M. (1991).** Generating yeast transcriptional activators containing no yeast protein sequences. *Nature* **350**, 250-252.
- Ruiz-Ferrer, V., Goytia, E., Martínez-García, B., López-Abella, D. & López-Moya, J. J. (2004).** Expression of functionally active helper component protein of Tobacco etch potyvirus in the yeast *Pichia pastoris*. *J Gen Virol* **85**, 241-9.
- Ruiz-Ferrer, V., Boskovic, J., Alfonso, C., Rivas, G., Llorca, O., López-Abella, D. & López-Moya, J. J. (2005).** Structural analysis of tobacco etch potyvirus HC-pro oligomers involved in aphid transmission. *J Virol* **79**, 3758-65.

- Saenz, P., Cervera, M. T., Dallot, S., Quiot, L., Quiot, J. B., Riechmann, J. L. & García, J. A. (2000). Identification of a pathogenicity determinant of Plum pox virus in the sequence encoding the C-terminal region of protein P3+6K(1). *J Gen Virol* **81**, 557-66.
- Saenz, P., Salvador, B., Simon-Mateo, C., Kasschau, K., Carrington, J. & García, J. (2002). Host-specific involvement of the HC protein in the long-distance movement of potyviruses. *J Virol* **76**, 1922-31.
- Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sasaya, T., Torrance, L., Cowan, G. & Ziegler, A. (2000). Aphid transmission studies using helper component proteins of potato virus Y expressed from a vector derived from potato virus X. *J Gen Virol* **81**, 1115-9.
- Scorza, R. & Ravelonandro, M. (2006). Control of Plum pox virus through the use of genetically modified plants. *EPPO Bulletin* **36**, 337-340.
- Schaad, M. C., Jensen, P. E. & Carrington, J. C. (1997a). Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *Embo J* **16**, 4049-59.
- Schaad, M. C., Lellis, A. D. & Carrington, J. C. (1997b). VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *J Virol* **71**, 8624-31.
- Schaad, M. C., Anderberg, R. J. & Carrington, J. C. (2000). Strain-specific interaction of the tobacco etch virus NIa protein with the translation initiation factor eIF4E in the yeast two-hybrid system. *Virology* **273**, 300-6.
- Schmidt, I., Blanc, S., Esperandieu, P., Kuhl, G., Devauchelle, G., Louis, C. & Cerutti, M. (1994). Interaction between the aphid transmission factor and virus particles is a part of the molecular mechanism of cauliflower mosaic virus aphid transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8885-9.
- Seddas, P., Boissinot, S., Strub, J. M., Van Dorselaer, A., Van Regenmortel, M. H. & Pattus, F. (2004). Rack-1, GAPDH3, and actin: proteins of *Myzus persicae* potentially involved in the transcytosis of beet Western yellows virus particles in the aphid. *Virology* **325**, 399-412.
- Seddas, P. & Boissinot, S. (2006). Glycosylation of beet Western yellows virus proteins is implicated in the aphid transmission of the virus. *Arch Virol* **151**, 967-84.
- Sheludko, Y. V., Sindarovska, Y. R., Gerasymenko, I. M., Bannikova, M. A. & Kuchuk, N. V. (2006). Comparison of several Nicotiana species as hosts for high-scale Agrobacterium-mediated transient expression. *Biotechnol Bioeng*.
- Shukla, D. D., Strike, P. M., Tracy, S. L., Gough, K. H. & Ward, C. W. (1988). 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. & Ward, C. W. (1989). Structure of potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the potyvirus group. *Adv Virus Res* **36**, 273-314.
- Simon-Buela, L., Guo, H. S. & García, J. A. (1997). Long sequences in the 5' noncoding region of plum pox virus are not necessary for viral infectivity but contribute to viral competitiveness and pathogenesis. *Virology* **233**, 157-62.
- Simon-Buela, L., Osaba, L., García, J. A. & López-Moya, J. J. (2000). Preservation of 5'-end integrity of a potyvirus genomic RNA is not dependent on template specificity. *Virology* **269**, 377-82.
- Sin, S. H., McNulty, B. C., Kennedy, G. G. & Moyer, J. W. (2005). Viral genetic determinants for thrips transmission of Tomato spotted wilt virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 5168-73.
- Soosaar, J. L. M., Burch-Smith, T. M. & Dinesh-Kumar, S. P. (2005). Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nature Reviews Microbiology* **3**, 789-798.
- Stenger, D. C., French, R. & Gildow, F. E. (2005). Complete deletion of Wheat streak mosaic virus HC-Pro: a null mutant is viable for systemic infection. *J Virol* **79**, 12077-80.
- Stenger, D. C., Young, B. A. & French, R. (2006). Random mutagenesis of wheat streak mosaic virus HC-Pro: non-infectious interfering mutations in a gene dispensable for systemic infection of plants. *J Gen Virol* **87**, 2741-7.
- Takami, N. (1901). On dwarf disease of rice plant and "tsumaguro-yokabai". *Journal Japan Agriculture society* **241**, 22-30.
- Taliansky, M. E. & García-Arenal, F. (1995). Role of cucumovirus capsid protein in long-distance movement within the infected plant. *J Virol* **69**, 916-22.
- Thornbury, D. W. & Pirone, T. P. (1983). Helper component of two potyviruses are serologically distinct. *Virology* **125**, 487-490.
- Thornbury, D. W., Hellman, G. M., Rhodes, R. E. & Pirone, T. P. (1985). Purification and characterization of potyvirus helper component. *Virology* **144**, 260-267.

- Thornbury, D. W., Patterson, C. A., Dessens, J. T. & Pirone, T. P. (1990).** Comparative sequence of the helper component (HC) region of potato virus Y and a HC-defective strain, potato virus C. *Virology* **178**, 573-8.
- Thornbury, D. W., van den Heuvel, J. F., Lesnaw, J. A. & Pirone, T. P. (1993).** Expression of potyvirus proteins in insect cells infected with a recombinant baculovirus. *J Gen Virol* **74 (Pt 12)**, 2731-5.
- Thresh, J. M. (2006).** Plant Virus Epidemiology: The Concept of Host Genetic Vulnerability. In *Advances in Virus Research*, pp. 89-125. Edited by K. Maramorosch, A. J. Shatkin & J. M. Thresh.
- Tian, T., Rubio, L., Yeh, H. H., Crawford, B. & Falk, B. W. (1999).** Lettuce infectious yellows virus: in vitro acquisition analysis using partially purified virions and the whitefly *Bemisia tabaci*. *J Gen Virol* **80 (Pt 5)**, 1111-7.
- Torrance, L., Andreev, I. A., Gabrenaitė-Verhovskaya, R., Cowan, G., Makinen, K. & Taliansky, M. E. (2006).** An unusual structure at one end of potato potyvirus particles. *J Mol Biol* **357**, 1-8.
- Touriño, A., Fereres, A., Ponz, F. & Sanchez, F. (2006).** Determinantes moleculares que controlan la transmisibilidad del virus del mosaico del nabo (TuMV) por pulgones. In *XIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Edited by SEF. Murcia, Septiembre 06: SEF.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4.
- Turpen, T. (1989).** Molecular cloning of a potato virus Y genome: nucleotide sequence homology in non-coding regions of potyviruses. *J Gen Virol* **70 (Pt 8)**, 1951-60.
- Ullman, D. E., German, T. L., Sherwood, J. L., Westcot, D. M. & Cantone, F. A. (1993).** Tospovirus replication in insect vector cells: immunocytochemical evidence that the nonstructural protein encoded by the S RNA of tomato spotted wilt tospovirus is present in thrips vector cells. *Phytopathology* **83**, 456-463.
- Urcuqui-Inchima, S., Maia, I. G., Dugeon, G., Haenni, A. L. & Bernardi, F. (1999a).** Effect of mutations within the cys-rich region of potyvirus helper component-proteinase on self-interaction. *J Gen Virol* **80 (Pt 11)**, 2809-12.
- Urcuqui-Inchima, S., Walter, J., Dugeon, G., German-Retana, S., Haenni, A. L., Candresse, T., Bernardi, F. & Le Gall, O. (1999b).** Potyvirus helper component-proteinase self-interaction in the yeast two-hybrid system and delineation of the interaction domain involved. *Virology* **258**, 95-9.
- Urcuqui-Inchima, S., Maia, I. G., Arruda, P., Haenni, A. L. & Bernardi, F. (2000).** Deletion mapping of the potyviral helper component-proteinase reveals two regions involved in RNA binding. *Virology* **268**, 104-11.
- Valli, A., Martín-Hernández, A. M., López-Moya, J. J. & García, J. A. (2006).** RNA silencing suppression by a second copy of the P1 serine protease of Cucumber vein yellowing ipomovirus, a member of the family Potyviridae that lacks the cysteine protease HCPro. *J Virol* **80**, 10055-63.
- Valli, A., López-Moya, J. J. & García, J. A. (2007).** Recombination and gene duplication in the evolutionary diversification of P1 proteins in the family Potyviridae. *Journal of General Virology* **88**, 1016-1028.
- Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L. & Rocha-Sosa, M. (1990).** Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol Gen Genet* **220**, 245-50.
- Vargas, M. (2005).** Análisis de nuevas estrategias basadas en silenciamiento génico para el control de enfermedades virales en plantas. Madrid: Universidad Politécnica de Madrid.
- Verchot, J. & Carrington, J. C. (1995a).** Debilitation of plant potyvirus infectivity by P1 proteinase-inactivating mutations and restoration by second-site modifications. *J Virol* **69**, 1582-90.
- Verchot, J. & Carrington, J. C. (1995b).** Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. *J Virol* **69**, 3668-74.
- Voinnet, O., Pinto, Y. M. & Baulcombe, D. C. (1999).** Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14147-52.
- Voinnet, O. (2001).** RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet* **17**, 449-59.
- Voloudakis, A. E., Malpica, C. A., Aleman-Verdaguer, M. E., Stark, D. M., Fauquet, C. M. & Beachy, R. N. (2004).** Structural characterization of Tobacco etch virus coat protein mutants. *Arch Virol* **149**, 699-712.
- Volland, C., Urban-Grimal, D., Geraud, G. & Haguenaer-Tsapis, R. (1994).** Endocytosis and degradation of the yeast uracil permease under adverse conditions. *J Biol Chem* **269**, 9833-41.

- Vos, P., Simons, G., Jesse, T., Wijbrandi, J., Heinen, L., Hogers, R., Frijters, A., Groenendijk, J., Diergaarde, P., Reijans, M., Fierens-Onstenk, J., de Both, M., Peleman, J., Liharska, T., Hontelez, J. & Zabeau, M. (1998). The tomato Mi-1 gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. *Nature Biotechnology* **16**, 1365-1369.
- Waltermann, A. & Maiss, E. (2006). Detection of 6K1 as a mature protein of 6 kDa in plum pox virus-infected *Nicotiana benthamiana* 10.1099/vir.0.81873-0. *J Gen Virol* **87**, 2381-2386.
- Wang, R. Y. & Pirone, T. (1996a). Mineral oil interferes with retention of tobacco etch potyvirus in the stylets of *Myzus persicae*. *Phytopathology* **86**, 820-823.
- Wang, R. Y. & Pirone, T. P. (1996b). Potyvirus transmission is not increased by pre-acquisition fasting of aphids reared on artificial diet. *J Gen Virol* **77 (Pt 12)**, 3145-8.
- Wang, R. Y., Ammar, E. D., Thornbury, D. W., López-Moya, J. J. & Pirone, T. P. (1996). Loss of potyvirus transmissibility and helper-component activity correlate with non-retention of virions in aphid stylets. *J Gen Virol* **77 (Pt 5)**, 861-7.
- Wang, D. & Pirone, T. P. (1999). Purification and characterization of turnip mosaic virus helper component protein. *Phytopathology* **89**, 564-567.
- Watson, M. A. & Roberts, F. M. (1939). A comparative study of the transmission of *Hyocymus* virus 3, potato virus Y and cucumber mosaic virus by the vector *Myzus persicae* (Sulz), *M. circumflexus* (Buckton) and *Macrosiphum geri* (Koch). *Proceedings of the Royal Society of London B* **127**, 543-576.
- Yang, S. J., Carter, S. A., Cole, A. B., Cheng, N. H. & Nelson, R. S. (2004). A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 6297-6302.
- Zeenko, V. & Gallie, D. R. (2005). Cap-independent translation of tobacco etch virus is conferred by an RNA pseudoknot in the 5'-leader. *J Biol Chem* **280**, 26813-24.