

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL I



* 5 3 0 9 5 3 9 3 0 7 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**ESTUDIOS DE LA RESISTENCIA Y PROTECCIÓN MEDIADA POR
LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA FRENTE A TOBAMOVIRUS, EN
PLANTAS DE LOS GÉNEROS *Capsicum* Y *Nicotiana*.**

Memoria presentada para
optar al grado de Doctor por

JOSÉ MARÍA TOSTADO ALVAREZ

V^o B^o del Director de la Tesis

Dra. María Teresa Serra Yoldi

MADRID, 1995

A mi hija Raquel.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| - AGRADECIMIENTOS | V |
| ABREVIATURAS | VII |
| RESUMEN | IX |
| INTRODUCCIÓN GENERAL | 1 |
| 1.- EL VIRUS DEL MOTEADO SUAVE DEL PIMIENTO: CARACTERÍSTICAS GENERALES. | 2 |
| 2.- MECANISMOS DE RESISTENCIA Y PROTECCIÓN EN PLANTAS FRENTE A VIRUS. | 9 |
| 2.1.- Resistencia constitutiva. | 9 |
| 2.2.- Resistencia inducida. | 11 |
| 2.3.- Inducción de proteínas relacionadas con la patogénesis. | 12 |
| 2.4. Mecanismos de protección frente a virus en plantas transgénicas. | 17 |
| 3.- OBJETIVOS. | 28 |
| I.- CAPÍTULO PRIMERO | 30 |
| CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA PATOGÉNESIS (PRs) INDUCIDAS EN LA REACCIÓN HIPERSENSIBLE (HR) FRENTE A TMV, EN PLANTAS DE <i>Capsicum annuum</i> PORTADORAS DEL GEN DE RESISTENCIA L¹. | |
| I.1.- INTRODUCCIÓN. | 31 |
| I.2.- MATERIALES Y MÉTODOS. | 33 |
| I.2.1.- Plantas y virus. | 33 |
| I.2.2.- Purificación de TMV-U1. | 33 |
| I.2.3.- Extracción y cuantificación de proteínas. | 34 |
| I.2.4.- Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). | 34 |
| I.2.5.- Electroforesis bidimensional. | 35 |
| I.2.6.- Electrotransferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa. | 37 |
| I.2.7.- Inmunodetección de proteínas sobre filtros de nitrocelulosa. | 37 |
| I.3.- RESULTADOS. | 40 |
| I.3.1.- Cuantificación de proteínas en los extractos obtenidos de las hojas inoculadas con TMV y tampón y de las hojas no inoculadas. | 40 |
| I.3.2. Análisis electroforético de los extractos proteicos en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). | 40 |

| | | |
|-----------|---|----|
| I.3.3.- | Análisis electroforético bidimensional de los extractos proteicos en geles de poliacrilamida. | 42 |
| I.3.4.- | Inmunodetección de proteínas PRs sobre filtros de nitrocelulosa. | 42 |
| I.3.4.1.- | PRs del grupo 1. | 42 |
| I.3.4.2.- | PRs del grupo 2: β -1,3-glucanasas (EC 3.2.1.39). | 42 |
| I.3.4.3.- | PRs del grupo 3: quitinasas (EC 3.2.1.14). | 45 |
| I.3.4.4.- | PRs del grupo 5. | 48 |
| I.4. | DISCUSIÓN. | 50 |

II.- CAPÍTULO SEGUNDO 56

ACUMULACIÓN LOCAL Y SISTÉMICA DE PRs EN PLANTAS DE *Capsicum annuum* PORTADORAS DEL GEN DE RESISTENCIA L¹ TRAS LA INFECCIÓN POR TMV Y PMMoV-S. POSIBLE RELACIÓN CON LA RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA (SAR).

| | | |
|----------|--|----|
| II.1.- | INTRODUCCIÓN. | 57 |
| II.2.- | MATERIALES Y MÉTODOS. | 59 |
| II.2.1.- | Plantas y virus. | 59 |
| II.2.2.- | Extracción y cuantificación de proteínas. | 60 |
| II.2.3.- | Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). | 60 |
| II.2.4.- | Electrotransferencia de proteínas a filtros de nitrocelulosa. | 60 |
| II.2.5.- | Inmunodetección de proteínas sobre filtros de nitrocelulosa. | 61 |
| II.2.6.- | Isoelectroenfoque (IEF) de las proteínas. | 61 |
| II.2.7.- | Detección de actividad de isoenzimas β -1,3-glucanasas sobre geles de IEF. | 62 |
| II.2.8.- | Detección de actividad de isoenzimas quitinasas sobre geles de IEF. | 62 |
| II.2.9.- | Análisis de la resistencia sistémica adquirida. | 63 |
| II.3. | RESULTADOS. | 64 |
| II.3.1.- | Cuantificación de proteínas en los extractos obtenidos de las hojas inoculadas y de las hojas superiores de plantas de <i>C. annuum</i> (L ¹ L ¹) inoculadas con TMV, PMMoV-S y tampón. | 64 |
| II.3.2.- | Análisis de los extractos proteicos en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). | 64 |
| II.3.3.- | Inmunodetección de proteínas con inmunoseros específicos de PRs. | 65 |
| II.3.4.- | Análisis de la actividad de isoenzimas β -1,3-glucanasas y quitinasas. | 69 |
| II.3.5.- | Análisis de la resistencia sistémica adquirida. | 71 |

| | |
|---|-----|
| II.4.- DISCUSIÓN. | 74 |
| III.- CAPÍTULO TERCERO | 79 |
| TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS DE <i>Nicotiana clevelandii</i> GRAY CON LA SECUENCIA COMPLETA DEL GEN DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE PMMoV-S Y ANÁLISIS DE LA PROTECCIÓN FRENTE A LA INFECCIÓN POR PMMoV-S. | |
| III.1.- INTRODUCCIÓN. | 80 |
| III.2.- MATERIALES Y MÉTODOS. | 82 |
| III.2.1.- Plantas y virus. | 82 |
| III.2.2.- Purificación de PMMoV-S y del RNA viral. | 82 |
| III.2.3.- Preparación de un suero frente a PMMoV-S: purificación de las IgG y conjugación con fosfatasa alcalina. | 83 |
| III.2.4.- ELISA-DAS (Ensayo inmunoenzimático-doble sandwich de anticuerpos) para la detección y cuantificación de PMMoV-S. | 83 |
| III.2.5.- Clonaje e inserción de un DNA complementario al RNA del gen de la proteína de la cápsida de PMMoV-S en dos vectores de expresión en plantas. | 84 |
| III.2.6.- Transformación de plantas de <i>Nicotiana clevelandii</i> Gray con el gen quimérico de la proteína de la cápsida de PMMoV-S. | 88 |
| III.2.7.- Análisis de la presencia en el genoma y de la expresión constitutiva del gen quimérico de la proteína de la cápsida de PMMoV-S en plantas transgénicas de la generación Ro. | 89 |
| III.2.8.- Selección de plantas transgénicas de la generación R ₁ . | 92 |
| III.2.9.- Análisis de la protección mediada por la proteína de la cápsida de PMMoV-S. | 92 |
| III.3.- RESULTADOS. | 93 |
| III.3.1.- ELISA-DAS para la detección y cuantificación de PMMoV S. | 93 |
| III.3.2.- Transformación y regeneración de <i>Nicotiana clevelandii</i> Gray. | 93 |
| III.3.3.- Detección en el genoma y expresión del gen quimérico de la proteína de la cápsida de PMMoV-S en plantas transgénicas R ₀ . | 96 |
| III.3.4.- Herencia del gen NPTII. Detección y expresión del gen de la proteína de la cápsida en plantas transgénicas R ₁ . | 96 |
| III.3.5.- Análisis de la protección mediada por la proteína de la cápsida de PMMoV-S frente a la infección por este virus. | 100 |
| III.4.- DISCUSIÓN. | 111 |

| | |
|---|------------|
| IV.- CAPÍTULO CUARTO | 116 |
| | |
| ANÁLISIS DE LA PROTECCIÓN FRENTE A LA INFECCIÓN POR TMV, PaMMV Y PMMoV-I EN PLANTAS DE <i>N. Clevelandii</i> TRANSFORMADAS CON EL GEN DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE PMMoV-S. | |
| | |
| IV.1.- INTRODUCCIÓN. | 117 |
| IV.2.- MATERIALES Y MÉTODOS. | 119 |
| IV.2.1.- Plantas y virus. | 119 |
| IV.2.2.- Purificación de TMV, PaMMV y PMMoV-I. | 119 |
| IV.2.3.- Preparación de inmunoseros específicos de las proteínas de la cápsida de TMV y PaMMV, purificación de las IgG y conjugación con fosfatasa alcalina. Establecimiento de un sistema ELISA-DAS para la detección de TMV, PaMMV y PMMoV-I. | 119 |
| IV.2.4.- Análisis de la protección mediada por la proteína de la cápsida de PMMoV S frente a TMV, PaMMV y PMMoV-I. | 120 |
| IV.3.- RESULTADOS. | 121 |
| IV.3.1.- ELISA-DAS para la detección y cuantificación de TMV, PaMMV y PMMoV-I. | 121 |
| IV.3.2.- Protección mediada por la proteína de la cápsida de PMMoV-S frente a TMV en plantas transgénicas de <i>N. clevelandii</i> . | 121 |
| IV.3.3.- Protección mediada por la proteína de la cápsida de PMMoV-S frente a PaMMV en plantas transgénicas de <i>N. clevelandii</i> . | 126 |
| IV.3.4.- Protección mediada por la proteína de la cápsida de PMMoV-S frente a PMMoV-I en plantas transgénicas de <i>N. clevelandii</i> . | 130 |
| IV.3.5.- Protección mediada por la proteína de la cápsida de PMMoV-S frente a infecciones mixtas de PMMoV-S con TMV y con PaMMV en plantas transgénicas de <i>N. clevelandii</i> . | 134 |
| IV.4.- DISCUSIÓN. | 138 |
| | |
| CONCLUSIONES. | 143 |
| | |
| BIBLIOGRAFÍA. | 148 |

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis doctoral ha sido realizada en el Departamento de Biología de Plantas del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), bajo la dirección de la Dra. María Teresa Serra Yoldi, a quien quiero manifestar mi gratitud y aprecio, no solo por las valiosas enseñanzas recibidas y su constante dedicación a mi formación científica, sino además por su gran calidad humana que ha hecho que el trabajo sea más fácil.

Asimismo, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que de una forma u otra han contribuido a que esta tesis se haya podido realizar:

A la Dra. Pilar Estévez, tutora y ponente de esta tesis, por su amabilidad y disposición en todo momento.

Al Dr. M. Legrand por la cesión de los inmunosueros específicos de las PRs PRO y chi32,34.

A los Doctores Vicente Conejero, Pablo Vera y Concha Domínguez por la cesión de los inmunosueros específicos de las PRs, p14, P23, P29, P35 y P36. Agradezco también su buena disposición en todas las ocasiones en las que se requirieron sus conocimientos sobre estas proteínas.

Al Dr. Fernando García Arenal por la cesión de la estirpe U1 de TMV.

A la Dra. Carmen Castresana por sus valiosos comentarios y consejos durante el desarrollo del trabajo, así como por la cesión de un inmunosuero específico de la PR glucb de tabaco.

A la Dra. Isabel García-Luque por la cesión del clon pUC174 y por el gran interés mostrado en este trabajo, ofreciéndome en todo momento una valiosa ayuda, tanto en los aspectos técnicos, como en la interpretación y discusión de los resultados.

A los Doctores José Ramón Díaz Ruíz y Dionisio López Abella por la atención, apoyo y estímulo prestados durante el trabajo.

A la Dra. Ana Mínguez por su colaboración en la realización de las electroforesis bidimensionales.

A la Dra. Elena Alonso por sus enseñanzas en las técnicas moleculares y por ser una excelente compañera de trabajo.

Al Dr. Leandro Peña con el que comencé mi andadura por el camino de la Ciencia y con el que compartí las alegrías y pequeñas frustraciones que surgieron a lo largo del tiempo que permanecimos juntos.

A todos los compañeros que han pasado por el laboratorio: Begoña, Laura, M^a Luz, M^a Jesús, Jumana, Paco, Juanjo, Tomás, Jaime, M^a José, Ana, Carmen, Patricia, Juan Ignacio,... muchos de ellos ya doctores, les quiero expresar mi gratitud por contribuir a que el trabajo se desarrollara en un clima de cordialidad y amistad.

Al personal auxiliar y administrativo del Departamento de Biología de Plantas: Adela, Sacri, Ascensión, Carmen, Emi, Montse y Matoya, por su inestimable ayuda y por su amistad.

A todo el personal encargado de los servicios de microscopía electrónica y de fotografía del CIB.

A mi familia por el continuo apoyo prestado y por todas las horas que les he robado para dedicarlas al trabajo de realizar esta tesis.

Finalmente agradecer el apoyo estructural del Centro de Investigaciones Biológicas y la financiación que me ha proporcionado el Ministerio de Educación y Ciencia durante los años de realización de esta Tesis.

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|--|
| BA: | Benzilaminopurina. |
| BPB: | Azul de bromofenol. |
| BSA: | Albúmina de suero bovino. |
| cDNA: | DNA complementario. |
| CP: | Proteína de la cápsida. |
| CPMP: | Protección mediada por proteína de la cápsida. |
| Ch.I.: | Inoculación desafiante. |
| Da: | Dalton. |
| d.p.i.: | Días posteriores a la inoculación. |
| DNA: | Ácido desoxirribonucleico. |
| DTT: | Ditiotreitol. |
| EDTA: | Ácido etilen diaminotetraacético. |
| ELISA-DAS: | Ensayo inmunoenzimático-doble sandwich de anticuerpos. |
| GA ₃ : | Giberelina A ₃ |
| H.I.: | Hoja/s inoculada/s. |
| HR: | Reacción hipersensible. |
| H.S.: | Hoja/s superior/es. |
| h: | Hora/s |
| I.I.: | Inoculación inductora. |
| IAA: | Ácido indol-acético. |
| INA: | Ácido 2,6-dicloro-isonicotínico. |
| IEF: | Electroforesis de isoelectroenfoque. |
| IgG: | Inmunoglobulina/s G. |
| IgG-FA: | Inmunoglobulina/s G conjugada con fosfatasa alcalina. |
| kb: | Kilobases |
| kDa: | Kilodalton |
| Km: | Sulfato de kanamicina. |
| KIN: | Quinetina. |
| mA: | Miliamperio. |
| min: | Minuto/s. |
| MS: | Medio Murashige-Skoog. |
| mRNA: | RNA mensajero. |
| MW: | Peso molecular. |
| NAA: | Ácido naftalen-acético. |
| NPTII: | Neomicina fosfotransferasa II. |
| nt: | Nucleótido. |
| ORF: | Fase de lectura abierta. |
| pb: | Pares de bases. |
| PCR: | Reacción en cadena de la DNA polimerasa. |
| PEG: | Polietilenglicol. |
| pI: | Punto isoeléctrico. |
| PRs: | Proteínas relacionadas con la patogénesis. |
| PVP: | Polivinilpirrolidona. |
| RNA: | Ácido ribonucleico. |
| rpm: | Revoluciones por minuto. |
| SA: | Ácido salicílico. |
| SAR: | Resistencia sistémica adquirida. |
| SDS: | Dodecilsulfato sódico. |
| SDS-PAGE: | Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. |
| TCA: | Ácido tricloroacético. |
| Tris: | Tris-hidroximetilaminometano. |
| tRNA: | RNA de transferencia. |
| UV: | Ultravioleta. |
| V: | Voltios. |
| ZEA: | Zeatina. |

ABREVIATURAS DE VIRUS Y VIROIDES

| | |
|----------------|--|
| AMV: | Virus del mosaico de la alfalfa; alfalfa mosaic virus. |
| CaMV: | Virus del mosaico de la coliflor; cauliflower mosaic virus. |
| CEVd: | Viroide de la exocortis de los cítricos: citrus exocortis viroid. |
| CMV: | Virus del mosaico del pepino; cucumber mosaic virus. |
| CPMV: | Virus del mosaico del chícharo; cowpea mosaic virus. |
| CsCMV: | Virus del mosaico común de la mandioca; cassava common mosaic virus. |
| CymMV: | Virus del mosaico del <i>Cymbidium</i> ; cymbidium mosaic virus. |
| CymRSV: | Virus de las manchas en anillo del <i>Cymbidium</i> ; cymbidium ringspot virus. |
| GCMV: | Virus del mosaico cromado de la vid; grapevine chrome mosaic virus. |
| GFLV: | Virus del entrenudo corto infeccioso de la vid; grapevine fanleaf virus. |
| GRSV: | Virus de las manchas en anillo del cacahuete; groundnut ringspot virus. |
| LMV: | Virus del mosaico de la lechuga; lettuce mosaic virus. |
| MDMV: | Virus del mosaico enanizante del maíz; maize dwarf mosaic virus. |
| ORSV: | Virus de las manchas anulares del <i>Odontoglossum</i> ; odontoglossum ringspot virus. |
| PaMMV: | Virus del moteado suave de la paprika; paprika mild mottle virus. |
| PAMV: | Virus del mosaico aucuba de la patata; potato aucuba mosaic virus. |
| PEBV: | Virus del oscurecimiento precoz del guisante; pea early-browning virus. |
| PLRV: | Virus del enrollado de la patata; potato leafroll virus. |
| PMMoV: | Virus del moteado suave del pimiento; pepper mild mottle virus. |
| PPV: | Virus de la Sharka; plum pox virus. |
| PRSV: | Virus de las manchas anulares de la papaya; papaya ringspot virus. |
| PVS: | Virus S de la patata; potato virus S. |
| PVX: | Virus X de la patata; potato virus X. |
| PVY: | Virus Y de la patata; potato virus Y. |
| RMV: | Virus del mosaico del plantago; ribgrass mosaic virus. |
| SMV: | Virus del mosaico de la soja; soybean mosaic virus. |
| TCSV: | Virus de las manchas cloróticas del tomate; tomato chlorotic spot virus. |
| TEV: | Virus del grabado del tabaco; tobacco etch virus. |
| TMGMV: | Virus del mosaico verde suave del tabaco; tobacco mild green mosaic virus. |
| TMV: | Virus del mosaico del tabaco; tobacco mosaic virus. |
| ToMV: | Virus del mosaico del tomate; tomato mosaic virus. |
| TRV: | Virus del cascabeleo del tabaco; tobacco rattle virus. |
| TSV: | Virus del estriado del tabaco; tobacco streak virus. |
| TSWV: | Virus de las manchas bronceadas del tomate; tomato spotted wilt virus. |
| WMV-2: | Virus del mosaico de la sanda; watermelon mosaic virus 2. |
| ZYMV: | Virus del mosaico amarillo del calabacín; zucchini yellow mosaic virus. |

RESUMEN

El virus del moteado suave del pimiento (PMMoV) pertenece al género Tobamovirus y causa una grave enfermedad que afecta a las variedades comerciales de pimiento, incluyendo también las que llevan incorporada resistencia frente a TMV y ToMV. Los diferentes tobamovirus aislados de los cultivos de pimiento se han clasificado como patotipos P₀, P₁, P_{1,2} y P_{1,2,3} en base a su capacidad de superar la resistencia conferida por los genes L¹, L², L³ y L⁴ de la serie alélica L de *Capsicum* spp.

Hemos estudiado la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) en plantas de *C. annuum* con el gen de resistencia L¹, asociada a la inducción de lesiones locales necróticas como consecuencia de la reacción hipersensible (HR) que se produce en las hojas de estas plantas al ser inoculadas con TMV. Mediante inmunosueros específicos de PRs de otros huéspedes como tomate y tabaco, hemos caracterizado diferentes isoformas básicas y ácidas de las PRs que se inducen en pimiento, estableciendo la existencia de al menos cuatro grupos diferentes de PRs. También se ha estudiado la síntesis de estas PRs en las hojas superiores de las plantas inoculadas con TMV, así como en las hojas inoculadas y superiores de plantas infectadas con un aislado español de PMMoV (PMMoV-S), caracterizado como patotipo P_{1,2}, y que por tanto infecta sistémicamente plantas de pimiento con el gen de resistencia L¹. En estas plantas la mayor inducción de PRs se observó en las hojas con lesiones locales necróticas producidas por TMV y en las hojas superiores infectadas sistémicamente por PMMoV-S.

Por otra parte se analiza en estas plantas la resistencia sistémica adquirida (SAR) asociada a la reacción hipersensible producida por TMV, observándose que ésta se manifestaba como una reducción en el número y tamaño de las lesiones necróticas inducidas por TMV, pero que no era capaz de impedir la infección sistémica de PMMoV-S. A los tiempos analizados, la SAR observada en las hojas superiores no puede atribuirse a una acumulación de proteínas PR en esta hojas, sino más bien a la inducción de HR en las hojas inoculadas.

Al quedar descartada la inducción de SAR como mecanismo de resistencia

frente a PMMoV-S, hemos abordado la protección mediada por la proteína de la cápsida (CPMP) como método no convencional de obtener plantas protegidas frente a este virus. Para ello hemos llevado a cabo la transformación con *Agrobacterium tumefaciens* de plantas de *Nicotiana clevelandii* Gray con un gen quimérico de la proteína de la cápsida (CP) de PMMoV-S. Este huésped ofrecía la ventaja de ser una especie más sencilla de transformar que *Capsicum annuum*, además de ser un huésped susceptible a la infección, no solo por PMMoV-S, sino también por los diferentes patotipos que infectan plantas de pimiento.

Hemos seleccionado dos líneas de plantas transgénicas que expresan de forma constitutiva la CP de PMMoV-S, una de elevada expresión (C16), y otra de baja expresión (C14). En ambas líneas se ha ensayado la CPMP frente a PMMoV-S, TMV, PaMMV y PMMoV-I, observando que esta protección resulta eficaz frente a las dos estirpes de PMMoV ensayadas y no frente a PaMMV o TMV. En todos los casos la protección se manifestaba como una ausencia total de síntomas y de virus en las hojas inoculadas y superiores, si bien en algunas plantas donde la protección no era completa, esta se manifestaba como atenuación y retraso en la inducción de los síntomas. La protección resultaba superada cuando se inoculaban las plantas con altas concentraciones de inóculo o con RNA desnudo, lo que indica que la CPMP actuaría sobre fases muy tempranas de la replicación de PMMoV-S.

Por otra parte la protección heteróloga frente a TMV y PaMMV, es muy inferior a la protección homóloga, a pesar de que los porcentajes de homología de las secuencias aminoacídicas de los diferentes virus son altas. La mayor capacidad replicativa de TMV y PaMMV en las plantas de *N. clevelandii* puede ser uno de los factores principales que hacen que la CPMP no resulte eficaz frente a estos virus.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. EL VIRUS DEL MOTEADO SUAVE DEL PIMIENTO: CARACTERÍSTICAS GENERALES.

El virus del moteado suave del pimiento (PMMoV; pepper mild mottle virus), pertenece al género Tobamovirus, cuyo miembro tipo es el virus del mosaico del tabaco (TMV; tobacco mosaic virus) (ICTV, 1995). Todos los representantes de este grupo son virus con cápsidas rígidas y alargadas que tienen aproximadamente un diámetro de 18 nm y una longitud de 300 nm (Fig. 1), las cuales están constituidas por capsómeros formados por una única molécula polipeptídica de 17 a 18 kDa y distribuidos helicoidalmente alrededor de una molécula de RNA lineal con polaridad positiva de unos 2×10^3 kDa, que posee una secuencia $m^7G^{5'}ppp^{5'}Gp$ en el extremo 5' y una estructura tipo tRNA en el extremo 3' (Revisión en Van Regenmortel y Fraenkel-Conrat, 1986).

La mayoría de los miembros del género Tobamovirus tienen un moderado rango de huéspedes que incluye plantas de tabaco, tomate, pimiento y otras solanáceas (Martelli y Quacquarelli, 1982). En los últimos años se han aislado en distintas zonas de la cuenca Mediterránea, diferentes tobamovirus capaces de infectar cultivares comerciales de pimiento a los que se había incorporado resistencia a TMV y al virus del mosaico del tomate (ToMV; tomato mosaic virus) mediante técnicas clásicas de selección (Arteaga y Ortega, 1981; Selassie y col., 1981; Paludan, 1982; Erkan y Yorganci, 1983; Wetter y col., 1984; Pares, 1985; Avgelis, 1986; Rast, 1988). Todos ellos tienen unas características biológicas comunes: son virus que no pueden infectar plantas de tomate; en las plantas de tabaco con el gen *N* de resistencia producen lesiones locales necróticas de menor tamaño que otros tobamovirus; se acumulan en menor cantidad en plantas del género *Nicotiana*, etc.

Los virus del género Tobamovirus que infectan plantas de pimiento han sido clasificados en base a su interacción con el gen L de resistencia a tobamovirus en *Capsicum* spp. (Tabla 1). Estos virus han sido designados como patotipos P_0 , P_1 , $P_{1,2}$ y $P_{1,2,3}$ de acuerdo a su capacidad de superar la resistencia conferida por los genes L^1 , L^2 , L^3 y L^4 de la serie alélica *L* de *Capsicum* spp. (Boukema y col., 1980; Selassie and Marchoux, 1991). En todos los casos la resistencia se manifiesta con

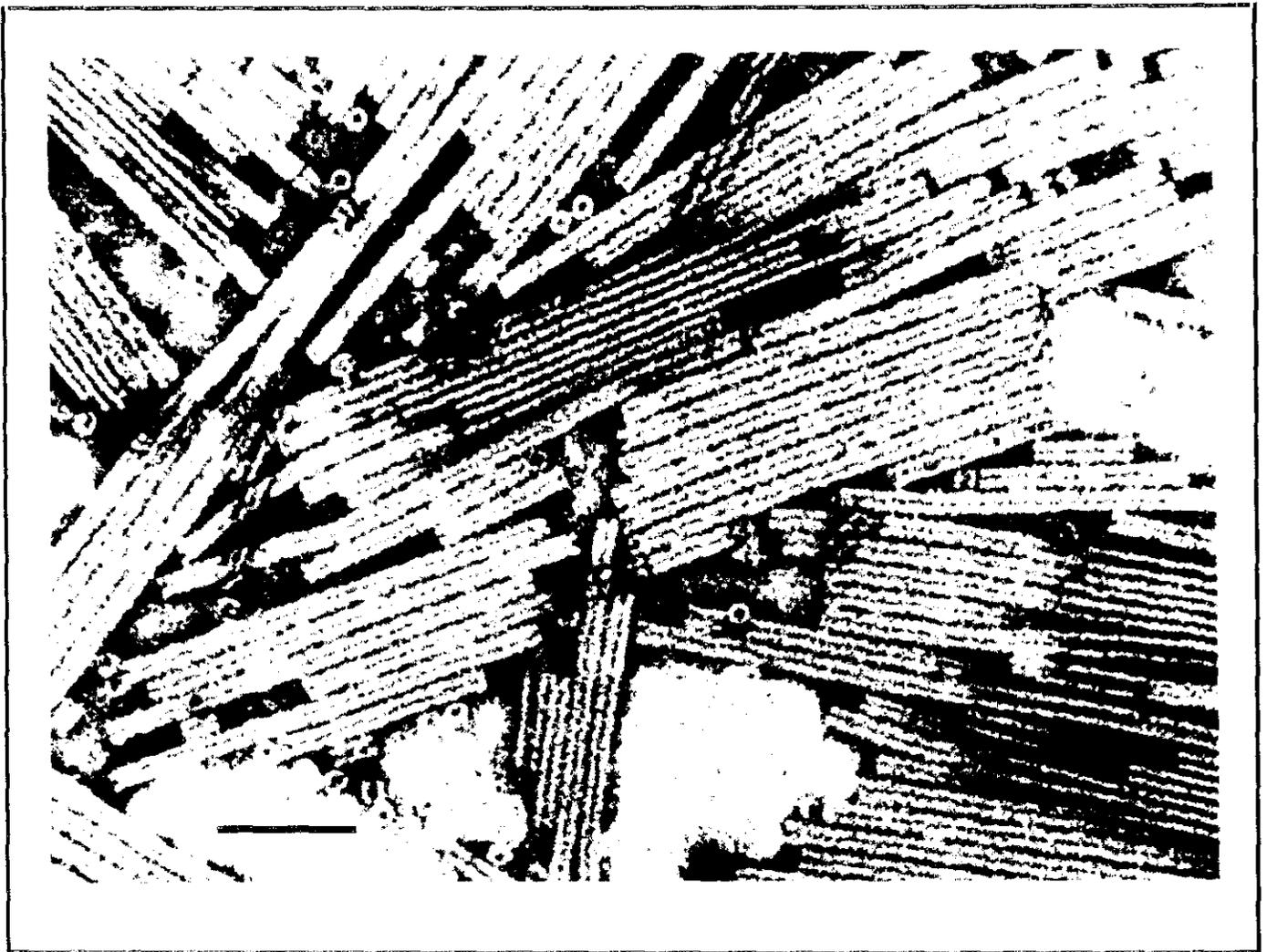


FIG. 1. Tinción negativa de una muestra purificada de PMMoV-S. La barra representa 100 *nm*.

la inducción de lesiones locales necróticas, como consecuencia de la reacción hipersensible que se desencadena en las hojas infectadas.

Tabla 1: Reacción de *Capsicum* spp. frente a los diferentes tobamovirus de pimiento.

| PLANTA | GENOTIPO | PATOTIPOS | | | |
|--------------------------------------|-------------------------------|----------------|----------------|------------------|--------------------|
| | | P ₀ | P ₁ | P _{1,2} | P _{1,2,3} |
| <i>C. annuum</i> cv. Early Calwonder | L ¹ L ¹ | MS | MS | MS | MS |
| <i>C. annuum</i> cv. Bruinsma Wonder | L ¹ L ¹ | LLN | MS | MS | MS |
| <i>C. frutescens</i> cv. Tabasco | L ² L ² | LLN | LLN | MS | MS |
| <i>C. chinense</i> PI 159236 | L ³ L ³ | LLN | LLN | LLN | MS |
| <i>C. chacoense</i> SA/85 | L ⁴ L ⁴ | LLN | LLN | LLN | LLN |

LLN .- Lesiones locales necróticas. MS .- Mosaico sistémico.

Distintos virus representantes de cada uno de los patotipos han sido descritos en la literatura (Wetter y col., 1984; Pares, 1985; Rast, 1988). Alonso y col. (1989) detectaron y aislaron, en los cultivos de pimiento bajo plástico en la región de Almería, diferentes tobamovirus que infectaban las variedades comerciales de pimiento que llevaban incorporada resistencia frente a TMV y ToMV y que producían en las hojas de las plantas unos síntomas muy suaves en forma de mosaico, que se hacían severos cuando afectaban a los frutos produciendo deformaciones y manchas necróticas (Fig. 2). Uno de estos aislados, el AL78/84, fué identificado como una estirpe de PMMoV en base a sus propiedades biológicas, bioquímicas y serológicas y se caracterizó como un patotipo P_{1,2} (García-Luque y col., 1990). Este aislado se ha denominado PMMoV-S para diferenciarlo de un aislado italiano del mismo virus PMMoV-I (Wetter y col. 1984) caracterizado como patotipo P_{1,2,3}.

Se ha propuesto que todos los tobamovirus que infectan plantas de pimiento y presentan características biológicas y serológicas similares a las de estos virus sean considerados como razas de PMMoV. Sin embargo un aislado holandés denominado P11 y caracterizado como un patotipo P₁ (Rast, 1977) presenta



FIG. 2. Síntomas producidos por PMMoV-S en las hojas y frutos de plantas de pimiento (*Capsicum annuum*)

características serológicas y de secuencia nucleotídica de la proteína de la cápsida que lo diferencian de los virus anteriores, por lo que ha sido considerado como un tobamovirus diferente al cual se ha denominado virus del moteado suave de la paprika (PaMMV; paprika mild mottle virus) (García-Luque y col., 1993).

El genoma de PMMoV-S esta constituido por un RNA de cadena sencilla con 6.357 nucleótidos que presenta una homología de secuencia nucleotídica del 69,4% con el RNA de ToMV, del 68,5% con el RNA de TMV y del 64% con el RNA del virus del mosaico verde suave del tabaco (TMGMV; tobacco mild green mosaic virus) (Alonso y col., 1991) . Posee una secuencia líder de 69 nucleótidos en el extremo 5' denominada fragmento Ω y una secuencia de 199 nucleótidos en el extremo 3' que adopta una estructura tRNA (Avila-Rincón y col., 1989). Su organización genética es similar a la descrita en TMV (Fig. 3). El RNA esta organizado en cuatro fragmentos en fase de lectura abierta (ORF) que codifican cuatro proteínas diferentes. El primer ORF comienza en el nucleótido 70 y se extiende hasta el nucleótido 3.423 y codifica una proteína de 1.117 aminoácidos con un peso molecular estimado de 126.304 Da denominada 126K. La supresión de un codón ámbar (UAG) posibilita la lectura hasta el nucleótido 4.908, codificando una proteína de 1.612 aminoácidos con un peso molecular calculado de 183.340 Da denominada 183K. Ambas proteínas poseen una alta homología de secuencia con las proteínas 126K y 183K de TMV las cuales están implicadas en los procesos de replicación viral (Quadt y Jaspars, 1989), por lo que probablemente también estén involucradas en la replicación de PMMoV-S. El tercer ORF comienza en el nucleótido 4.909 y termina en el 5.682, codifica una proteína de 257 aminoácidos con un peso molecular estimado de 28.347 Da que posee una alta homología de secuencia con la proteína 30K de TMV que interviene en el movimiento célula a célula del virus a través de los plasmodesmos (Deom y col., 1987; Meshi y col., 1987). Por último el cuarto ORF que se extiende entre los nucleótidos 5.685 y el 6.158 codifica una proteína de 156 aminoácidos con un peso molecular de 17.110 Da denominada 17.5K y que es la proteína que forma los capsómeros de la cápsida del virus. En todos los tobamovirus en los que ha sido estudiada la estrategia de replicación viral, las proteínas 126K y 183K se traducen directamente del RNA viral, mientras que las proteínas 30K y 17.5K lo hacen a partir de dos mRNAs subgenómicos 3' coterminales (Palukaitis y Zaitlin,

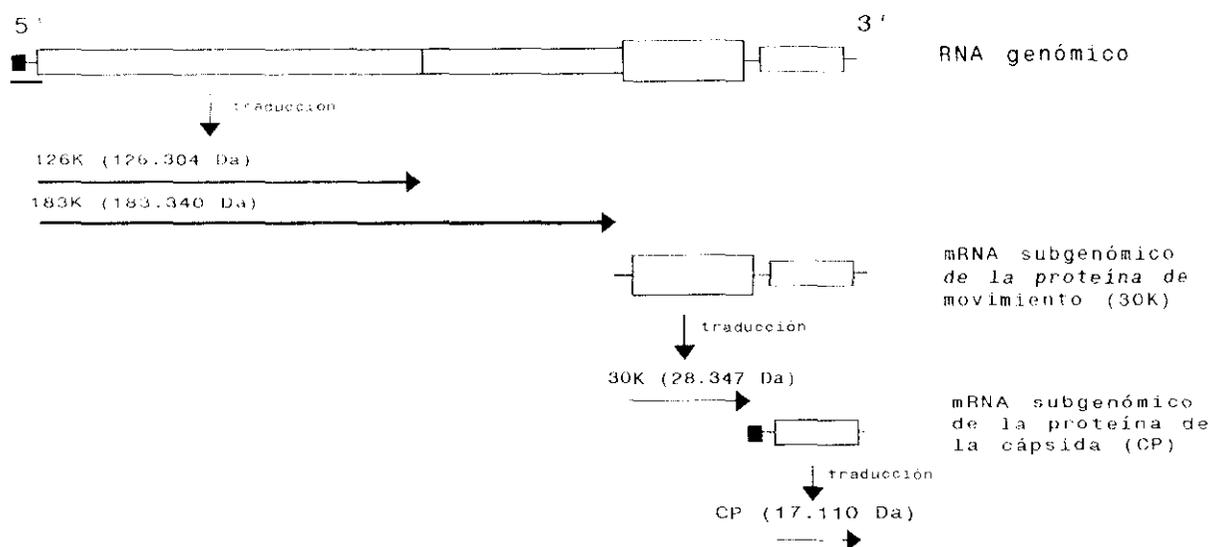


FIG. 3. Organización genómica y estrategia de replicación de PMMoV-S.

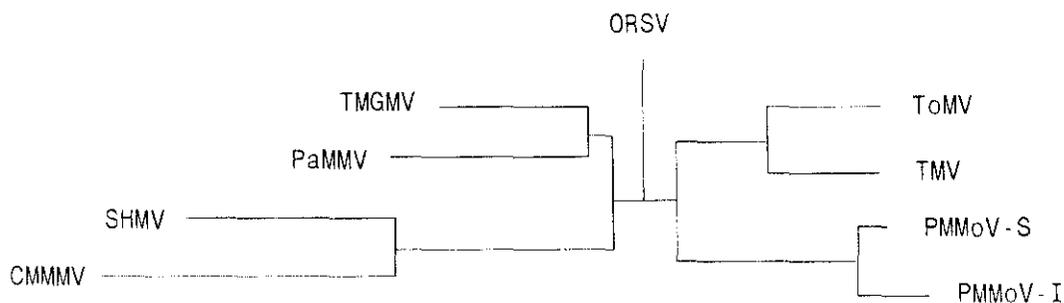


FIG. 4. Dendrograma mostrando las relaciones filogenéticas entre las proteínas de la cápsida de diferentes tobamovirus, cuyas secuencias aminoacídicas han sido deducidas a partir de sus secuencias nucleotídicas. (Tomado de García-Luque y col. 1993).

1986).

El árbol filogenético obtenido por comparación de las secuencias aminoacídicas de las proteínas de la cápsida de diferentes tobamovirus (Fig. 4), muestra que PMMoV-S y PMMoV-I están localizados en la misma rama que TMV y ToMV, mientras que PaMMV y TMGMV ocupan una rama diferente, de lo que se deduce que PMMoV-S y PMMoV-I son virus muy próximos, y ambos presentan mayor parentesco filogenético con TMV que con PaMMV (García-Luque y col., 1993).

2. MECANISMOS DE RESISTENCIA Y PROTECCIÓN EN PLANTAS FRENTE A VIRUS.

Los virus causan graves pérdidas en la mayoría, si no en todos los cultivos del mundo, pudiendo limitar la producción de cultivos específicos en determinadas áreas. Por tal motivo, el control de las enfermedades virales que afectan a los cultivos ha sido objeto de numerosas investigaciones (Fraser, 1989).

Existen básicamente tres estrategias diferentes que tradicionalmente han sido empleadas en el intento de controlar las enfermedades virales de las plantas. Una es la aplicada a los cultivos perennes consistente en la utilización por parte de los agricultores de material vegetal certificado libre de virus y/o en la erradicación de plantas infectadas. Otra es la empleada con los cultivos anuales que implica varias prácticas como son la utilización de semillas libres de virus, el uso de agentes químicos o la plantación de los cultivos en épocas que no coincidan con las plagas de los insectos vectores de los virus. Por último la selección de plantas resistentes a los virus o a sus vectores ha sido la estrategia que ha dado un mejor resultado a largo plazo, entendiendo por resistencia la propiedad de la planta en reducir o impedir la multiplicación viral, la dispersión del virus dentro de la planta o la supresión de los síntomas producidos por el virus. Esta resistencia puede ser *constitutiva o inducida*.

En la Naturaleza las fuentes de resistencia vegetal frente a virus son poco abundantes y ello ha hecho que en los últimos diez años se hayan estudiado estrategias no convencionales de control viral basadas en la obtención, vía ingeniería genética, de variedades de plantas cultivables protegidas frente a la infección por virus, entendiendo la *protección* como una capacidad conferida a la planta para interferir con alguna de las etapas del ciclo infectivo del virus (Hull y Davies, 1992).

2.1. RESISTENCIA CONSTITUTIVA.

Las plantas carecen de mecanismos de resistencia mediados por anticuerpos, sin embargo a lo largo de la Evolución han adquirido no solo la capacidad de adaptarse a los ambientes más hostiles, sino también han

desarrollado mecanismos de defensa frente a posibles patógenos, los cuales a su vez han ido superando las barreras físicas y químicas interpuestas por las plantas, en un proceso de co-evolución para una mutua supervivencia (Revisiones en Ponz y Bruening, 1986; Fraser, 1987; Keen, 1992; Mansky y Hill, 1993).

Tradicionalmente, la resistencia constitutiva de las plantas a las enfermedades virales se ha dividido en dos clases (Revisión en Hadwiger y Culley, 1993). La más eficaz y evolucionada opera a nivel de especie, es la denominada "*resistencia no-huésped*" que actúa en todos los individuos de la especie, los cuales no muestran síntomas ni multiplicación viral al ser inoculados con un amplio espectro de virus frente a los que son resistentes. Este fenómeno se conoce como *inmunidad*, y se supone que se debe a la presencia en las plantas de barreras mecánicas y/o a la carencia de determinados factores de susceptibilidad que requiere el virus (Zaitlin y Hull, 1987). En algunas especies aparentemente inmunes, el virus puede replicarse en las células inicialmente infectadas, si bien posteriormente no puede moverse a las células adyacentes, de forma que este tipo de resistencia podría actuar sobre el movimiento célula a célula del virus. La infección del virus en estas plantas se denomina *infección subliminal* (Sulzinski y Zaitlin, 1982).

En los procesos de patogénesis se supone que el huésped aporta factores de susceptibilidad que junto a factores de patogenicidad aportados por el virus permiten a éste la multiplicación y dispersión por la planta, con manifestación de síntomas visibles y otros efectos patogénicos en el huésped. En la base de esta interacción compatible actúa la segunda clase de resistencia denominada "*raza-específica*" la cual es cualitativa y ocurre cuando algunos miembros de una especie son susceptibles frente a una raza del virus mientras que otros son resistentes. Estos últimos constituyen los *cultivares resistentes*, los cuales contienen un gen o grupo de genes normalmente dominantes que confieren resistencia frente a un virus para el cual la especie es normalmente susceptible (Revisiones en Fraser, 1990; Keen, 1990; Mansky and Hill, 1993). Ejemplos de esta resistencia son la conferida por los genes *N'*, *Tm-2* y *L* de resistencia a tobamovirus en plantas de *N. sylvestris*, *Lycopersicon* spp. y *Capsicum* spp. respectivamente. Estos genes se activan en respuesta a la infección viral pudiendo actuar interrumpiendo uno o más estadios del ciclo de replicación viral, lo cual conduce a la restricción de la

acumulación del virus, a su localización en el sitio de infección o a un efecto conjunto tal y como se observa en la *reacción hipersensible* (HR) (Revisión en Culver y col., 1991). La reacción hipersensible es un sistema de defensa activo que se caracteriza por la muerte de las células vecinas al punto de infección y que va acompañada de la activación de diferentes genes que incluyen los que codifican enzimas de la ruta de los compuestos fenólicos, peroxidasas, glucanasas, quitinasas así como las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (Revisión en Fritig y col., 1987).

En numerosas combinaciones planta-virus existen pocas fuentes de genes de resistencia o bien no son suficientemente conocidas, además esta resistencia puede verse sobrepasada por aislados virulentos o mutantes del virus. Este es el caso, como ya hemos visto anteriormente, del gen *L* de resistencia frente a TMV y ToMV en plantas de *Capsicum* spp. en las que se han aislado distintos tobamovirus capaces de sobrepasar la resistencia conferida por la serie alélica de este gen.

2.2. RESISTENCIA INDUCIDA

Las plantas susceptibles o resistentes a un virus poseen frecuentemente un nivel adicional de resistencia inducida que es conferida por la inoculación previa con un virus causante de *reacción hipersensible* y que se conoce como *resistencia sistémica adquirida* (SAR) (Revisiones; Dean y Kuc, 1985; White y Antoniwi, 1991; Lawton y col., 1993; Ryals y col., 1994).

Ross fue el primero en acuñar los términos , "resistencia sistémica adquirida" para referirse a la resistencia inducida sistémicamente por TMV (Ross, 1961b), y "resistencia localizada adquirida" para describir la resistencia inducida en las hojas inoculadas por este virus (Ross, 1961a). El concepto de resistencia sistémica adquirida ha sido posteriormente ampliado al demostrarse que las plantas pueden resultar protegidas frente a un virus también por la inoculación con otros patógenos diferentes como hongos necrogénicos (Hecht y Bateman, 1964), bacterias saprófitas (Klement y col. , 1966), o por la inoculación con compuestos químicos (Revisión en Kessmann y col., 1994), tales como el ácido acetilsalicílico (White, 1979) o como el ácido 2,6-dicloro-isonicotínico (INA) (Uknes y col., 1992).

La correlación existente entre la HR y la inducción de SAR ha sido

establecida en numerosos casos de plantas que reaccionando hipersensiblemente a la infección por un virus se hacen sistémicamente más resistentes frente a una segunda infección con el mismo virus (Ross, 1966; Nicoud y col., 1988), o con un virus diferente (Bergstrom y col., 1982; Gianinazzi, 1984). Esta resistencia se caracteriza normalmente por una disminución del número y tamaño de las lesiones producidas durante la segunda infección sin que se produzca una inhibición de la multiplicación viral, por lo que podría actuar limitando el movimiento célula a célula del virus (Pennazio y Roggero, 1991a). El papel preciso de la HR en la inducción de SAR no ha sido aún claramente establecido. Una cuestión no resuelta es conocer qué señales químicas pueden hacer que una respuesta localizada en una determinada zona de la planta active la SAR en otras zonas distintas de ésta (Revisión en Enyedí y col., 1992). El ácido salicílico (SA) se ha propuesto como la principal señal inductora de SAR (Klessig y Malamy, 1994), dado que su concentración se incrementa de forma notable tras la infección viral (Malamy y col., 1990; Enyedí y col., 1992). Sin embargo, no parece que el SA sea la molécula que actúe como señal a larga distancia (Rasmussen y col. 1991), pudiendo existir otras moléculas que podrían moverse a través del floema y que producirían un incremento de SA en las hojas sistémicas, el cual actuaría como señal inductora de SAR en éstas (Ryals y col., 1994).

2.3. INDUCCIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA PATOGÉNESIS.

En las hojas no infectadas de plantas de *N. tabacum* Sansum NN que responden con una reacción hipersensible a la inoculación con TMV se activan de forma coordinada al menos nueve familias de genes a los que colectivamente se denominan "genes SAR" (Ward y col., 1991). Por otra parte, los distintos agentes químicos que inducen SAR tales como el SA y el INA, también inducen el mismo espectro de expresión de "genes SAR" (Ward y col., 1991; Uknes y col., 1992).

Algunos productos de estos genes tienen una actividad antimicrobiana directa o están muy relacionados con proteínas antimicrobianas. Estos incluyen β -1,3-glucanasas, quitinasas y proteínas ricas en cisteína relacionadas con la thaumatina. De otros productos génicos como las proteínas PR-1 se desconoce su función. Estas proteínas fueron identificadas por primera vez y de forma independiente, por Van Loon y Van Kammen (1970) y por Gianinazzi y col. (1970)

en las hojas de plantas de tabaco en las que se acumulaban en respuesta a la reacción hipersensible inducida por TMV. Posteriormente muchas otras proteínas de similares propiedades se han aislado de plantas de tabaco y de otras muchas especies, incluyendo dicotiledóneas y monocotiledóneas, en respuesta a la infección por virus, viroides, bacterias y hongos, motivo por el cual reciben el nombre de "proteínas relacionadas con la patogénesis" (PRs) (Revisiones en; Van Loon, 1985; Bol y col., 1990; Bowles, 1990; Linthorst, 1991; White y Antoniw, 1991; Stintzi y col., 1993a). Algunas proteínas PR se inducen también en respuesta a tratamientos de las hojas con agentes químicos como el ácido acetilsalicílico (White, 1979), el ethephon (Granell y col., 1987), el ácido salicílico (Yalpani y col., 1991), y el INA (Uknes y col., 1992), o con fitohormonas como auxinas (Hughes y Dickerson, 1991), citoquininas (Memelink y col., 1990), y el etileno considerado una hormona de "stress" (Keefe y col., 1990; Brederode y col., 1991). También determinadas condiciones fisiológicas de las plantas tales como la senescencia de las hojas (Vera y col., 1988; Castresana y col., 1990), la floración (Fraser, 1981), o el stress salino (Grosset y col., 1990), inducen determinadas PRs. Estas proteínas se inducen también, de forma constitutiva, en determinados híbridos interespecíficos de tabaco, los cuales muestran una alta resistencia a la infección viral (Ahl y Gianinazzi, 1982). Sin embargo, recientemente se ha sugerido el término proteína "PR-like" (PRL), para designar proteínas de tejidos de plantas sanos que son homólogas a las PRs, pero cuya inducción no ha sido aún demostrada. De manera que, el término PRs sirva solo para designar proteínas de plantas que son inducidas en estados patológicos o relacionados con éstos (Van Loon y col. 1994)

Las proteínas PR poseen una serie de propiedades fisicoquímicas y biológicas muy características que ayudan a su detección y aislamiento: 1) son estables a pH muy bajos manteniéndose solubles en tampones ácidos; 2) son resistentes a la acción de enzimas proteolíticas; 3) son monómeros de bajo peso molecular (8-50 kDa); 4) se localizan en compartimentos como vacuolas, apoplasto y en la pared celular (Van Loon, 1985; Dore y col., 1991).

En plantas de *Nicotiana tabacum* se identificaron, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida nativos, diez PRs que se denominaron PR-1a, -1b, -1c, -2, -N, -O, -P, -Q, -R y -S en orden decreciente de movilidad electroforética (Antoniw

y col., 1980). En base a sus relaciones serológicas estas proteínas se agruparon en cuatro familias diferentes, una formada por las PR-1a, -1b y -1c y las otras tres formados por las PR-2, -N y -O, las PR-P y -Q y las PR-R y -S (Jamet y Fritig, 1986). A medida que se identificaban otras proteínas PR en diferentes especies de plantas se iban nombrando con diferentes terminologías. En el III Congreso Internacional sobre PRs celebrado en Arolla (Switzerland, 16-20 de Agosto de 1992) se llegó al acuerdo de usar una clasificación y nomenclatura comunes para las proteínas PR de diferentes orígenes, de modo que permitiera establecer comparaciones entre las pertenecientes a diferentes especies vegetales. Esta clasificación agrupa a las proteínas PR en cinco familias o grupos diferentes.

El grupo PR-1 esta constituido por las PRs ácidas de tabaco (PR-1a, -1b y -1c), que fueron las primeras en purificarse (Antoniw y Pierpoint, 1978), y las primeras cuyos genes fueron clonados y secuenciados (Cutt y col., 1988). En las plantas de tomate infectadas con diferentes patógenos como hongos o viroides, se inducen diferentes PRs del grupo 1, que a diferencia de las aisladas en tabaco son de punto isoeléctrico básico (Camacho y Sanger, 1984; Lucas y col., 1985; Granell, y col., 1987), aunque también se ha identificado una PR-1 ácida, en las plantas de tomate infectadas por viroides (Tornero y col., 1994) . Las PRs de este grupo muestran una estrecha relación serológica entre ellas (Heitz y col., 1994), y con PRs ácidas y básicas de otras especies vegetales, como patata y tomate (Nassuth y Sanger, 1986; White y col., 1987).

La función biológica de las proteínas de este grupo es hasta el momento desconocida. Datos recientes demuestran la actividad antifúngica de estas proteínas en ensayos realizados "in vitro" frente a *Phytophthora infestans* (Niderman y col., 1993; 1995). Sin embargo la expresión constitutiva de la PR-1a (Linhorst y col., 1989) y de la PR-1b (Cutt y col., 1989) en plantas de tabaco transgénicas, no parece incrementar los niveles de resistencia de estas plantas frente a la infección por TMV.

Los grupos PR-2 y PR-3 estan constituidos por proteínas con actividad β -1,3-glucanasa y quitinasa respectivamente que fueron identificadas por vez primera en plantas de tabaco infectadas con TMV (Kauffmann y col., 1987; Legrand y col., 1987). Posteriormente muchas proteínas PR han sido caracterizadas como β -1,3-glucanasas o quitinasas en plantas dicotiledóneas como patata (Kombrink y col.

1988), judía (Vögeli y col., 1988), guisante (Mauch y col., 1988), y tomate (Joosten y De Wit, 1989), y en plantas monocotiledóneas como maíz (Nasser y col., 1988) y cebada (Hoj y col., 1989). Estas enzimas juegan un doble papel en la resistencia de las plantas frente a patógenos, principalmente hongos; por un lado actúan directamente hidrolizando los componentes estructurales de la pared celular de los microorganismos y por otro lado actúan indirectamente liberando oligosacáridos que se comportan como inductores de otros mecanismos de defensa en la planta (Boller, 1993; Stintzi y col., 1993a).

La mayoría de las β -1,3-glucanasas son monómeros de peso molecular comprendido entre 25 y 35 kDa con actividad endoglucanasa. Muchos de los genes que codifican estas proteínas han sido clonados y secuenciados (Revisión en Meins y col., 1992), y en base a la comparación de las secuencias aminoacídicas deducidas, las β -1,3-glucanasas de tabaco se han agrupado en tres clases. A la clase I pertenece una proteína básica de 33 kDa denominada glucb que posiblemente este constituida por distintas isoformas de la misma enzima (Grosset y col., 1990). La clase II esta constituida por las proteínas PR-2, PR-N y PR-O (Kauffmann y col., 1987) y la clase III por la PR-Q' (Payne y col., 1990). Todas estas proteínas estan serológicamente relacionadas (Kauffmann y col., 1987). Las enzimas ácidas son extracelulares mientras que la enzima básica se localiza en vacuolas (Van der Bulcke y col., 1989). La actividad específica de estas enzimas es muy variable, las más activas son la glucb y la PR-O mientras que las otras muestran muy baja actividad (Stintzi y col., 1993a).

En los últimos años se han purificado y caracterizado un gran número de quitinasas de plantas (Revisiones en Collinge y col., 1993; Broglie y Broglie, 1993). Al igual que las β -1,3-glucanasas, las quitinasas estan constituidas por monómeros de 25 a 35 kDa de peso molecular y la mayoría posee actividad endoquitinasa, produciendo quito-oligosacáridos formados por unidades de 2-6 N-acetilglucosamina, si bién algunas quitinasas poseen también actividad lisozima.

Hay quitinasas específicas que son inducidas en respuesta a la infección por patógenos (Grenier y Asselin, 1990). Asi la infección por TMV induce en las plantas de tabaco la síntesis de dos proteínas, PR-P y PR-Q, que poseen actividad quitinasa y son las PRs ácidas mayoritarias en tabaco e induce también la síntesis de dos quitinasas de punto isoeléctrico (pI) básico, chi 32 y chi 34 de mayor

actividad específica que las quitinasas ácidas (Legrand y col., 1987). Recientemente se han aislado otras tres quitinasas básicas; la chi 28, relacionada con las chi 32 y chi 34, y las proteínas lys b1 y lys b2, estas últimas con una alta actividad lisozima. Anticuerpos frente a las proteínas lys b1 y lys b2 reconocen una nueva quitinasa ácida denominada lys 28 que no posee actividad lisozima (Stintzi y col., 1993a).

Las quitinasas de plantas se han clasificado basándose en su estructura primaria en cinco clases. La clase I contiene las quitinasas básicas chi 28, chi 32 y chi 34, las cuales poseen un dominio N-terminal rico en cisteína de aproximadamente 40 aminoácidos (Shinshi y col., 1990). La chi32 y chi 34 presentan la más alta actividad específica de las quitinasas aisladas en tabaco y su localización es intracelular (Stintz y col., 1993a). Las quitinasas de la clase II incluyen la PR-P y PR-Q que carecen del dominio rico en cisteína, pero tienen una alta homología de secuencia con las quitinasas de la clase I (Hoofft y col., 1987). Las quitinasas de la clase III no se asemejan a las quitinasas de las clases I y II y sin embargo son muy similares a las quitinasas de pepino que tienen una alta actividad lisozima (Stintzi y col. 1993b). Las quitinasas de la clase IV contienen un dominio rico en cisteína al igual que las de la clase I, sin embargo poseen una homología de secuencia aminoacídica con éstas de tan solo un 41-47% lo que las hace serológicamente distinguibles. Las quitinasas de la clase IV se han identificado en plantas de remolacha, guisante y colza y no en plantas de tabaco (Collinge y col., 1993). Por último a la clase V pertenece la quitinasa Chi-V aislada de hojas de plantas de tabaco Samsun NN infectadas con TMV, la cual no está relacionada con las quitinasas de las otras clases y sí presenta en cambio una alta homología de secuencia aminoacídica con quitinasas bacterianas (Melchers y col., 1994).

El grupo PR-4 está constituido por cuatro proteínas denominadas s1, s2, r1 y r2 de bajo peso molecular, entre 13 y 14,5 kDa, que fueron purificadas de plantas de tabaco Samsun NN infectadas con TMV (Kauffmann y col., 1990). Todas ellas son extracelulares y serológicamente relacionadas entre sí pero no con PRs de otros grupos, además su función biológica o actividad son desconocidas debido a que son las PRs menos estudiadas. Existe una homología de secuencia aminoacídica del 50% entre estas PRs y las proteínas Win1 y Win2 que se inducen

en patata en respuesta a las lesiones o heridas (Friedrich y col., 1991). Por otro lado, solo en plantas de tomate se ha purificado y caracterizado una proteína de 15 kDa que puede pertenecer a este grupo (Joosten y col., 1990).

El grupo PR-5 esta constituido por proteínas de peso molecular entre 22 y 24 kDa, entre las que se incluyen las dos proteínas de pl neutro PR-R y -S aisladas de *N. tabacum* Samsun NN (Kauffman y col., 1990), que se corresponden probablemente con las proteínas R-menor y R-mayor aisladas de *N. tabacum* cv. Xanthi nc. (Pierpoint y col., 1987). También en las hojas infectadas de plantas de tabaco se ha aislado una proteína básica serológicamente relacionada con las PR-R y -S, y que ha sido identificada como una osmotina (Stintzi y col., 1991). La homología de secuencia aminoacídica existente entre las PR-R y -S con la proteína thaumatina es de un 60%, por lo que a las PRs del grupo 5 se las denomina "PRs similares a la thaumatina" (Cornelissen y col., 1986). Distintas proteínas similares a la thaumatina se han aislado en otras especies de plantas como tomate (Rodrigo y col., 1991), patata (Pierpoint y col., 1990), maíz (Roberts y Selitrennikoff, 1990), y cebada (Bryngelsson y Green, 1989). La función biológica de las proteínas de este grupo parece ser antifúngica, inhibiendo la germinación de las esporas y/o impidiendo el crecimiento de las hifas del hongo (Vigers y col., 1992).

En muchos de los sistemas virus/huésped estudiados existe una correlación entre la inducción de proteínas PR y la resistencia sistémica adquirida (Kessmann y col., 1994), la posible función o funciones de estas proteínas en el proceso de inducción y/o desarrollo de esta forma de resistencia es algo desconocido y que en la actualidad es objeto de numerosos estudios.

2.4. MECANISMOS DE PROTECCIÓN FRENTE A VIRUS EN PLANTAS TRANSGÉNICAS.

En un sentido amplio, las plantas transgénicas son plantas en las cuales se ha insertado en sus genomas genes funcionales ajenos a la planta. Los avances recientes en las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, los métodos eficaces de clonaje de genes, el perfeccionamiento de los vectores de expresión de genes en plantas, así como la disponibilidad de diferentes genes marcadores y de promotores adecuados, son los factores que más han contribuido en los últimos diez años a la transformación de un gran número de plantas, lo que ha dado lugar

a la obtención de nuevas variedades vegetales con nuevas propiedades genéticas (Uchimiya y col., 1989). Se han empleado numerosos métodos para la obtención de plantas transgénicas (revisión en Potrykus, 1991), de los cuales el más utilizado, no solo por su sencillez sino también por su gran eficacia, ha sido la transferencia de genes mediante la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (Horsch y col., 1985; Corbin y Klee, 1991; Hooykaas y Schilperoort, 1992; Zupan y Zambryski, 1995).

La posibilidad de obtener plantas transgénicas ha permitido el estudio de nuevas estrategias no convencionales aplicadas al control de las enfermedades virales. La introducción de forma estable en el genoma de las plantas de genes quiméricos abre un abanico de nuevas posibilidades en el intento de obtener plantas con resistencia a virus y presenta dos ventajas fundamentales frente a las técnicas tradicionales, por un lado la posibilidad de transferir genes únicos no acompañados de genes no deseados y por otro lado la posibilidad de crear genes de resistencia nuevos que no existen en la Naturaleza (revisión en Gadani y col., 1990; Joshi and Joshi, 1991; Hull y Davies, 1992; Wilson, 1993; Baulcombe, 1994b).

En los distintos intentos de obtener plantas transgénicas protegidas frente a virus se han ensayado diferentes genes quiméricos, algunos de origen no viral tales como genes de **anticuerpos funcionales** (Hiatt y col., 1989; Tavladoraki y col., 1993), y **genes suicidas latentes** (Wilson, 1993), y otros de origen viral como secuencias que codifican **RNA satélites** (Baulcombe y col., 1986; Harrison y col., 1987; McGarvey y col., 1990; Peña y col., 1994), **RNA defectivos interferentes** (Resende y col., 1992; Kollar y col., 1993), **ribozimas** (Haseloff y Gerlach, 1988) o **RNAs antisentido** (Cuozzo y col., 1988; Day y col., 1991; Nelson y col., 1993). Sin embargo las secuencias génicas de origen viral más utilizadas en la transformación de plantas para la obtención de resistencia frente a virus son las procedentes del propio genoma de los virus. La teoría de la "resistencia derivada del patógeno" expresada por Sanford y Johnston (1985) propone que genes de resistencia a virus pueden ser obtenidos del propio material genético viral, de tal forma que determinados genes virales insertados en el genoma de la célula vegetal y que sean capaces de expresarse en éstas pueden dar lugar a plantas resistentes a la infección por el virus. Con anterioridad Hamilton

(1980) había predicho que el fenómeno de protección cruzada observado en las plantas podría ser inducido introduciendo dentro de las células vegetales cDNAs correspondientes a regiones del RNA viral.

En base a estas teorías y a la luz de los mejores conocimientos que cada día se tienen sobre la organización genómica y la función de los genes de una amplia gama de virus de plantas, se han empleado dos grupos diferentes de genes virales para la transformación de plantas con el fin de obtener protección frente a virus: (1) genes que codifican proteínas no estructurales tales como las proteínas relacionadas con la 54K de TMV, que están codificadas por secuencias nucleotídicas correspondientes a las replicasas virales (Carr y Zaitlin, 1993; Baulcombe, 1994a; Tenllado y col., 1995), o las proteínas implicadas en el movimiento de los virus célula a célula a través de los plasmodesmos (Lapidot y col., 1993; Malysenko y col., 1993; Cooper y col., 1995), y (2) genes que codifican las proteínas estructurales que forman la cápsida de los virus, los cuales han sido los más empleados e históricamente los primeros en utilizarse en la obtención de variedades de plantas protegidas frente a virus (Bevan y col. 1985).

El uso de secuencias codificadoras de la proteína de la cápsida (CP) de los virus abría la posibilidad de imitar en las células vegetales, mediante la ingeniería genética, el fenómeno natural de protección cruzada observado por primera vez por McKinney (1929), cuando la infección de plantas huéspedes con estirpes atenuadas de un virus las protegía frente a subsiguientes infecciones por estirpes severas de dicho virus. Este mecanismo de protección ha sido utilizado para controlar algunas enfermedades virales en cultivos hortícolas (Fulton, 1986; Sherwood, 1987), y aunque los mecanismos responsables son hasta hoy en día poco conocidos, diferentes estudios sugieren que la proteína de la cápsida del virus inductor juega un importante papel en la protección cruzada (Serwood y Fulton, 1982; Palukaitis y Zaitlin, 1984; Zinnen y Fulton, 1986).

Powell y col. (1986) obtuvieron plantas de tabaco transgénicas que expresaban de forma constitutiva la proteína de la cápsida de TMV, para lo cual transformaron vía *A. tumefaciens* células de *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi con un gen quimérico constituido por un cDNA correspondiente a la secuencia codificadora de la CP de la estirpe U1 de TMV, flanqueado por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV; cauliflower mosaic virus) y la señal de

poliadenilación del gen nopalina sintetasa del propio *A. tumefaciens*. La progenie de las líneas de plantas transgénicas que acumulaban CP de TMV por encima del 0,1% de las proteínas solubles totales mostraban protección frente a la infección por este virus.

La protección obtenida por la expresión del gen de la proteína de la cápsida de un virus en plantas transgénicas se denomina "protección mediada por la proteína de la cápsida" (CPMP) y desde su demostración inicial hasta nuestros días ha sido descrita en numerosas especies de plantas que han sido transformadas con diferentes construcciones de genes de la proteína de la cápsida de virus pertenecientes a 12 familias distintas (revisiones en Beachy y col., 1990; Fitchen y Beachy, 1993; Gonsalves y Slightom, 1993; Hackland y col., 1994).

En la mayoría de los casos estudiados la CPMP se manifiesta como una reducción de los sitios de infección en la hoja inoculada y por tanto en la cantidad de virus detectado en ésta (Nelson y col., 1987; Loesch-Fries y col., 1987; Hemenway y col., 1988), en una disminución de la severidad de los síntomas y en el número de plantas que desarrollan éstos (Powell-Abel y col., 1986; Cuozzo y col., 1988;), y por último en una menor acumulación de virus en hojas superiores de las plantas transformadas en comparación a las hojas de las plantas control (Nelson y col., 1987; Cuozzo y col., 1988; Lawson y col., 1990), estableciéndose una correlación entre esta reducción de la cantidad de virus y la atenuación o ausencia de síntomas en las plantas.

Tras la obtención de plantas transgénicas protegidas frente a TMV, la CPMP fue descrita frente al virus del mosaico de la alfalfa (AMV; alfalfa mosaic virus) en plantas de tabaco (Loesch-Fries y col., 1987; Tumer y col., 1987; Van Dun y col., 1988a), tomate (Tumer y col., 1987), y posteriormente alfalfa (Hill y col., 1991).

La CPMP también ha sido ensayada frente al virus del mosaico del pepino (CMV; cucumber mosaic virus), uno de los patógenos virales causante de más graves daños en importantes especies vegetales cultivables. El primer ejemplo de CPMP frente a CMV fue descrito en plantas de tabaco transformadas con el gen de la proteína de la cápsida de la estirpe D de CMV que resultaban protegidas frente a la infección por la estirpe C de CMV, tanto en hojas inoculadas como en hojas sistémicas (Cuozzo y col., 1988). Posteriormente se ha ensayado la CPMP en plantas de tabaco transformadas con genes de la proteína de la cápsida de las

estirpes WL (Namba y col., 1991), O e Y de CMV (Nakajima y col., 1993), y frente a estirpes del virus transmisibles mecánicamente o por pulgones (Quemada y col., 1991). El hecho de que existan RNA satélites asociados a las distintas estirpes de CMV ha posibilitado la utilización de éstos como agentes de control biológico en combinación con la expresión de proteína de la cápsida (Yie y col., 1992).

La protección mediada por proteína de la cápsida de TMV, AMV o CMV, se debe a una actuación directa de la proteína sobre una o más fases del ciclo infectivo del virus, quedando descartada la implicación del mRNA en estos procesos. (Van Dun y col., 1988; Nejdat y Beachy, 1989; Powell y col., 1990; Okuno y col., 1993b). Por otro lado no parece que la acumulación de la proteína de la cápsida desencadene en la planta el mecanismo de resistencia sistémica adquirida en relación con la inducción y acumulación de proteínas PR. Tan solo en algunas líneas de tabaco transgénicas hay un nivel muy bajo de expresión constitutiva de la PR-1a, si bien en todas las líneas de plantas que acumulan proteína de la cápsida hay protección, independientemente de la acumulación de PR1a (Carr y col., 1989).

Si bien la CPMP frente a CMV presenta características esencialmente similares a la de TMV o AMV, existen algunas diferencias con alguna de las estirpes ensayadas, así las plantas que expresan la proteína de la cápsida de CMV-Y muestran protección frente a la inoculación con RNA desnudo (Okuno y col., 1993a) o como ocurre con otras estirpes, la protección no siempre se relaciona con el nivel de acumulación de la proteína de la cápsida (Namba y col., 1991; Quemada y col., 1991). Algo similar ocurre en plantas de tabaco transformadas con el gen de la proteína de la cápsida del virus X de la patata (PVX; potato virus X) donde se observa una alta protección frente PVX tanto a elevadas concentraciones de inóculo como cuando se inocula con el RNA viral (Hemenway y col., 1988). Sin embargo Hoekama y col., (1989) ensayan la CPMP frente a PVX en dos cultivares de patata, observando en ambos casos una clara correlación entre la acumulación de proteína de la cápsida y el grado de protección.

En las plantas transformadas con el gen de la proteína de la cápsida de TMV la protección frente estirpes muy relacionados es tan efectiva como la protección homóloga, mientras que la protección frente a otros tobamovirus depende del grado de homología de secuencia aminoacídica de la CP de éstos con respecto a

la de TMV (Nejdat y Beachy, 1990). Por otra parte, la protección en estas plantas frente a virus no relacionados con TMV como PVX, CMV y AMV es muy débil o inexistente (Anderson y col., 1989), de manera que la protección heteróloga en las plantas transformadas con la CP de TMV no resulta muy eficaz. Sin embargo esto no sucede igual en las plantas transformadas con la proteína de la cápsida de virus de la familia Potyviridae.

Stark y Beachy (1989) presentan el primer caso de CPMP frente a potyvirus al transformar plantas de tabaco con el gen de la proteína de la cápsida del virus del mosaico de la soja (SMV; soybean mosaic virus), consiguiendo una protección heteróloga frente a la infección por los potyvirus no relacionados, virus del grabado del tabaco (TEV; tobacco etch virus) y virus Y de la patata (PVY; potato virus Y), refiriendo este hecho como "resistencia de amplio espectro". Posteriormente, se obtuvo CPMP homóloga frente a potyvirus, en plantas de patata transformadas con el gen de la proteína de la cápsida de PVY, solo o co-transformadas con él de PVX (Lawson y col., 1990).

Tras estos primeros estudios, la CPMP se ha ensayado frente a otros potyvirus como el virus de las manchas anulares de la papaya (PRSV; papaya ringspot virus) (Ling y col., 1991; Fitch y col., 1992), el virus 2 del mosaico de la sandía (WMV-2; watermelon mosaic virus 2) (Namba y col., 1992), el virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV; zucchini yellow mosaic virus) (Namba y col., 1992), el virus de la Sharka (PPV; plum pox virus) (Regner y col., 1992), y el virus del mosaico enanizante del maíz (MDMV; maize dwarf mosaic virus) (Murry y col., 1993). En la mayoría de los casos la protección virus-específica es más efectiva que la de amplio espectro (revisión en Lindbo y col., 1993), sin bién se ha descrito CPMP frente a PVY, en plantas de tabaco transformadas con el gen de la proteína de la cápsida del virus del mosaico de la lechuga (LMV; lettuce mosaic virus) (Dinant y col., 1993).

La protección mediada por la proteína de la cápsida se ha ensayado con otros virus pertenecientes a géneros diferentes, como el Luteovirus virus del enrollado de la patata (PLRV; potato leafroll virus) (Kawchuk y col., 1990; Kawchuk y col., 1991); el Tobravirus virus del cascabeleo del tabaco (TRV; tobacco rattle virus) (Van Dum y Bol, 1988; Van Dum y col., 1988a; Angenent y col., 1990); el Ilarvirus virus del estriado del tabaco (TSV; tobacco streak virus)

(Van Dum y col., 1988b); el Carlavirus virus S de la patata (PVS; potato virus S) (MacKenzie y Tremaine, 1990; MacKenzie y col., 1991); los Tospovirus virus de las manchas broncedas del tomate (TSWV; Tomato spotted wilt virus) (Gielen y col., 1991; Vaira y col., 1995), virus de las manchas cloróticas del tomate (TCSV; tomato chlorotic spot virus) (Prins y col., 1995) y virus de las manchas en anillo del cacahuete (GRSV; groundnut ringspot virus) (Prins y col., 1995); el Comovirus virus del mosaico del chícharo (CPMV; cowpea mosaic virus) (Nida y col., 1992); los Nepovirus virus del mosaico cromado de la vid (GCMV; grapevine chrome mosaic virus) (Brault y col., 1993) y virus del entrenudo corto infeccioso de la vid (GFLV; grapevine fanleaf virus) (Bardonnnet y col., 1994); el Tombusvirus virus de las manchas en anillo del *Cymbidium* (CymRSV; cymbidium ringspot virus) (Rubino y col., 1993) y los Potexvirus virus del mosaico común de la mandioca (CsCMV; cassava common mosaic virus) (Fauquet y col., 1991), virus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV; cymbidium mosaic virus) (Chia y col., 1992) y virus del mosaico aucuba de la patata (PAMV; potato aucuba mosaic virus) (Leclerc y AbouHaidar, 1995).

Si bien todos los ejemplos de CPMP reseñados son el resultado de la introducción en el genoma de las plantas de genes quiméricos de la proteína de la cápsida de los virus frente a los que se quiere generar protección, es poco probable que exista un único mecanismo que actúe en todos los casos. Es más, podría ser incluso que la protección actuara a través de más de un mecanismo inhibiendo diferentes estadios en el proceso de infección o replicación viral. Los mecanismos a través de los que la CPMP actúa en las plantas frente a los virus son aun desconocidos, si bien se comienza a tener algunos conocimientos gracias a los exhaustivos estudios realizados principalmente con TMV, AMV y diferentes virus del género Potyvirus, los cuales han concluido en dos modelos distintos de actuación de la CPMP: (1) el modelo basado en los resultados de la CPMP frente a TMV, según el cual la CP constitutiva interferiría con diferentes fases del ciclo infectivo viral (Reimann-Philipp y Beachy, 1993; Fitchen y Beachy, 1993) y (2) el modelo basado en los resultados obtenidos frente a diferentes potyvirus, según el cual la protección podría atribuirse a la interferencia directa del transgen con una o más fases de la replicación viral (Lindbo y Dougherty, 1992b; Lindbo y col., 1993).

(1).- Según el primer modelo propuesto, la CP de TMV que se acumula en las células de las plantas transgénicas parece actuar sobre dos estadios bien diferentes de la infección viral. Primeramente actuaría sobre la fase temprana del desensamblaje de la partícula viral, que ocurre en el citoplasma de la célula y en la que están implicados los ribosomas de ésta (Verduin, 1993), y posteriormente lo haría sobre el movimiento a larga distancia del virus (Wisniewski y col., 1990)

La primera evidencia de que existe un bloqueo del desensamblaje del virus viene dada por el hecho de que la CPMP no es efectiva frente a la inoculación con RNA purificado de TMV (Nelson y col., 1987), ya que parece improbable que se produzca reencapsidación de la molécula de RNA (Osbourn y col., 1989a; 1989b). Por otro lado, protoplastos obtenidos de plantas que expresan la proteína de la cápsida de TMV soportan replicación viral cuando son infectados con RNA desnudo de TMV o con la partícula completa en un medio tamponado a pH 8.0, mientras que no sufren replicación viral cuando se infectan con la partícula completa a pH 7.0 (Register III y Beachy, 1988). El tratamiento de las partículas virales en un medio tamponado a pH 8.0 elimina un pequeño número de moléculas de proteína de la cápsida dejando libre el extremo 5' del RNA viral, lo que permite la unión a éste de los ribosomas de la planta y su posterior desnudamiento y traducción (Wilson y col., 1990). Estas estructuras virales denominadas estriposomas han sido aisladas de tejidos infectados por TMV (Shaw y col., 1986). Wu y col. (1990) observan un número menor de estriposomas en protoplastos obtenidos de plantas que expresan la proteína de la cápsida de TMV cuando son infectados con el virus, lo cual sugiere que la modificación que conduce al desensamblaje de la partícula viral esta afectada en estas plantas

Otra evidencia de que la CPMP actúa sobre esta fase temprana de la infección viral viene dada por la expresión específica de la proteína de la cápsida en diferentes tejidos de la planta mediante el uso de promotores órgano-específicos. El promotor del gen *rbcS* es solo activo en células de mesófilo, de manera que, plantas transformadas con el gen de la proteína de la cápsida de TMV bajo el control de este promotor, y que por tanto acumulaban esta proteína en dichas células, mostraban un menor grado de protección que las transformadas con el mismo gen bajo el promotor 35S del CaMV (Clark y col., 1990). Por otro lado, plantas transformadas con el mismo gen bajo el promotor del gen *pal2*, que

solo se expresa en células de la epidermis, estaban parcialmente protegidas frente a la infección viral a pesar de que en estas plantas la cantidad acumulada de CP era mucho menor que la acumulada en plantas transformadas con el gen quimérico bajo el promotor 35S del CaMV (Reimann-Philipp y Beachy, 1993b). Por último las plantas transformadas con este gen bajo el control del promotor *rol/C*, que solo se expresa en el tejido floemático, no mostraban protección frente a la infección local o sistémica por TMV (Reimann-Philipp y Beachy, 1993b).

Si bien el bloqueo del desensamblaje del virus parece ser el primer mecanismo de actuación de la CPMP frente a TMV, la forma en que se produce este bloqueo resulta desconocida. Existen dos posibles formas de actuación en base a los dos modelos de desensamblaje que se postulan. Según el primer modelo, las condiciones fisicoquímicas internas de la célula, tales como el pH o la presencia de cationes como el Ca^{+2} o el Mg^{+2} , serían la causa del inicio del desensamblaje viral. De manera que, la presencia en la célula de CP constitutiva desplazaría el equilibrio químico establecido entre ésta y la forma no disociada de la partícula viral hacia esta última forma, lo cual estabilizaría la estructura del virión impidiendo así su desensamblaje. El otro modelo propone la existencia en el interior de la célula de puntos de anclaje de la partícula viral, imprescindibles para iniciar el desensamblaje del virus, los cuales estarían bloqueados por la CP constitutiva en las células de plantas transformadas, impidiendo así el inicio del desnudamiento del RNA viral (Register III y col., 1989; Register III y Nelson, 1992). Sin embargo, los últimos estudios realizados parecen indicar que existen pocas evidencias de la implicación de zonas de anclaje durante el desensamblaje del virión, e incluso que la CPMP sea el resultado de una estabilización de la partícula viral (Reimann-Philipp y Beachy, 1993a; Clark y col., 1995).

Existen numerosas evidencias que demuestran que la CPMP frente a TMV no solo inhibe fases tempranas de la infección viral, sino que también interfiere sobre fases posteriores de ésta. Cuando se inocula con RNA purificado de TMV plantas transformadas con el gen de la proteína de la cápsida de este virus, la acumulación de virus en hoja inoculada es igual a la de plantas no transformadas. Si bien, el desarrollo de síntomas sistémicos y la acumulación sistémica de virus en las plantas transformadas sufre un retraso que parece indicar una interferencia de la CP constitutiva con el transporte a larga distancia del virus. Experimentos de

inmuno-impresión de tejidos demuestran que si la infección por TMV se hace sistémica en las plantas transgénicas la propagación del virus ocurre en estas plantas igual que en las plantas control, si bien se produce una reducción en la velocidad de ésta (Wisniewski y col., 1990). Por otro lado, cuando el bloqueo inicial de la infección se rompe en las plantas transgénicas hay una baja, pero significativa reducción en la velocidad de propagación célula a célula próxima a los puntos de infección (Wisniewski y col., 1990). Estos resultados demuestran que la CPMP puede actuar también sobre el movimiento a larga distancia del virus cuando éste se evade del bloqueo inicial del desensamblaje en el punto de infección.

Los mecanismos de actuación de la CPMP frente a TMV son posiblemente iguales que los que actúan frente a otros virus como AMV y CMV.

(2).- El segundo modelo de actuación de la CPMP esta basado en los resultados tan dispares obtenidos frente a diferente virus del género Potyvirus, lo que hace muy difícil la hipótesis de un mecanismo único de protección frente a estos virus. De una forma simple la protección se atribuye a la interferencia directa del transgen con uno o más de los procesos de replicación viral (Lindbo y Dougherty, 1992b; Lindbo y col., 1993). La implicación del mRNA del gen de la proteína de la cápsida en la CPMP se observa en diferentes líneas de plantas transformadas, en las cuales no existe una relación directa entre la acumulación de CP y el grado de protección. Estos resultados se observan en la CPMP frente a PVX y PVY, según los cuales, algunas de las líneas transgénicas más protegidas acumulaban cantidades no detectables de CP, mientras que otras líneas de plantas en las que se acumulaban cantidades detectables de CP mostraban idéntico grado de susceptibilidad que las plantas no transformadas (Lawson y col., 1990; Kaniewski y col., 1990; Van der Vlugt y col., 1992; Farinelli y Malnoe, 1993).

El papel que juega el mRNA en la CPMP se ha estudiado mediante la transformación de plantas con genes truncados de las proteínas de la cápsida de TEV (Lindbo y Dogherty, 1992a; 1992b; Silva-Rosales y col., 1994), ZYMV (Fang y Grumet, 1993), y TSWV (De Haan y col., 1992).

Lindbo y col. (1993) han descrito un fenómeno denominado "recuperación" en plantas de tabaco transformadas con el gen completo de la proteína de la

cápsida de TEV consistente en que plantas que inicialmente sufrían infección viral, a las 3 ó 5 semanas se recuperaban de la infección. De manera que los tallos y hojas nuevas surgían libres de virus y estas hojas quedaban protegidas frente a la inoculación con TEV. Sorprendentemente, en estas hojas inoculadas se detectaba entre 12 y 22 veces menos mRNA de la proteína de la cápsida que en las hojas no inoculadas a pesar de que la transcripción a nivel del núcleo era similar. Con todos estos datos proponen que tanto la protección como la disminución en la acumulación de mRNA están mediadas, a nivel celular, por una actividad citoplasmática que reconoce secuencias específicas del mRNA y del RNA de TEV que conduce a su inactivación.

A pesar de que estos dos modelos propuestos de actuación de la CPMP explican gran parte de los resultados obtenidos en los distintos ensayos realizados frente a un gran número de virus, es posible sin embargo, que múltiples mecanismos puedan estar actuando con diferente eficacia en las distintas plantas transgénicas y en los distintos sistemas virus-huésped ensayados.

En la actualidad la CPMP se ha ensayado en condiciones de campo en plantas de gran interés agrícola como tomate (Nelson y col., 1988; Sanders y col., 1992), patata (Kaniewski y col., 1990), y maíz (Murry y col., 1993), con resultados muy prometedores y no parece lejos el día en que se inicie la comercialización de semillas de estas plantas (revisión en Kaniewski y Thomas, 1993).

3. OBJETIVOS.

El cultivo de pimiento tiene una gran importancia en la agricultura de nuestro país, no solo por la superficie cultivada, unas 26.000 ha, sino también por los niveles de producción, siendo España el primer productor de la Unión Europea (UE) (Gil Ortega, 1992).

Esta favorable situación del cultivo de pimiento, se ve seriamente amenazada por la presencia de enfermedades virales (García-Arenal, 1992), que producen pérdidas que en ocasiones llegan a alcanzar el 100% de la producción. La estirpe española del virus del moteado suave del pimiento (PMMoV-S) es un tobamovirus que causa una de las enfermedades víricas más extendidas entre los cultivos de pimiento bajo plástico de la región de Almería y que afecta a plantas que son resistentes frente a otros tobamovirus como TMV o ToMV. Hasta un 100% de las plantas cultivadas en una misma área pueden verse afectadas debido a la facilidad con que se trasmite el virus por contacto durante las tareas de cultivo. Por otra parte, hasta el momento no existen variedades comerciales de pimiento resistentes a algunos de los patotipos de este tobamovirus. La obtención de nuevos cultivares de pimiento que sean resistentes frente a PMMoV-S, obliga previamente a un estudio de los mecanismos de resistencia que actúan en las plantas de pimiento frente a tobamovirus, así como los posibles mecanismos de protección frente a PMMoV-S.

Nos propusimos por tanto, el estudio de dos vías alternativas de obtención de resistencia frente a la infección por PMMoV-S: por un lado la resistencia sistémica adquirida y por otro la protección mediada por la proteína de la cápsida. Para conseguir estos conocimientos, en la presente tesis nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1.- Caracterizar las proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) como marcadores de resistencia en plantas de *Capsicum annuum* de genotipo L¹L¹.
- 2.- Analizar la síntesis de estas proteínas PR en relación con la activación o no del gen de resistencia L¹ en las plantas de *Capsicum annuum*.

- 3.- Abordar la resistencia sistémica adquirida como una posible forma de introducir resistencia frente a PMMoV-S en las plantas de *Capsicum annuum*.
- 4.- Establecer la posible relación entre la síntesis de PRs y los mecanismos de resistencia sistémica adquirida frente a TMV y PMMoV-S que actúan en plantas de *Capsicum annuum*.
- 5.- Obtener plantas transgénicas de *Nicotiana clevelandii* Gray que expresen el gen de la proteína de la cápsida de PMMoV-S.
- 6.- Estudiar el mecanismo de protección mediada por proteína de la cápsida (CPMP) frente a PMMoV-S en las plantas transgénicas.
- 7.- Establecer la eficacia de este mecanismo de protección frente a PMMoV-S y frente a otros tobamovirus relacionados.

CAPÍTULO I

CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA PATOGÉNESIS (PRs) INDUCIDAS EN LA REACCIÓN HIPERSENSIBLE (HR) FRENTE A TMV, EN PLANTAS DE *Capsicum annuum* PORTADORAS DEL GEN DE RESISTENCIA L¹.

I.1. INTRODUCCIÓN.

Los diferentes tobamovirus aislados infectando plantas de pimiento han sido designados como patotipos P₀, P₁, P_{1,2} y P_{1,2,3}, de acuerdo a su capacidad de superar la resistencia conferida por la serie alélica L¹, L², L³ y L⁴ de *Capsicum* spp. (Tabla 1. Introducción). La inoculación de plantas de *Capsicum annuum* del genotipo L¹L¹ con TMV, que es un patotipo P₀, desencadena la inducción de lesiones locales necróticas en el sitio de infección. Esta necrosis constituye una reacción hipersensible (HR) frente al virus, el cual queda localizado en el interior de la lesión necrótica y en las células que le rodean (Culver y col., 1991).

En las hojas de plantas de tabaco que reaccionan de forma hipersensible frente a la inoculación con TMV se induce la síntesis de un conjunto de proteínas denominadas proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs). Estas proteínas tienen puntos isoeléctricos ácidos y básicos y poseen una serie de propiedades fisicoquímicas y biológicas que ayudan a su detección y aislamiento, tales como son su alta estabilidad a pH ácido, su bajo peso molecular y su alta resistencia a la acción de enzimas proteolíticas (Van Loon, 1985).

Las proteínas PRs han sido identificadas y caracterizadas en diferentes huéspedes, si bien donde más han sido estudiadas es en las plantas de tabaco en respuesta a la infección por virus, bacterias, hongos y al tratamiento con agentes químicos (Revisiones en Bol y col., 1990; Bowles, 1990; Linthorst, 1991; White y Antoniwi, 1991). En estas plantas se han identificado isoformas básicas y ácidas de hasta quince PRs, las cuales se han agrupado en cinco grupos diferentes en base a sus relaciones serológicas o a la homología de sus secuencias aminoacídicas (Stinzi y col., 1993a). El grupo 1 está constituido por las proteínas PR-1a, -1b y -1c, cuya función biológica es desconocida, si bien ensayos realizados *in vitro* demuestran cierta actividad antifúngica (Niderman y col., 1993; 1995). El grupo 2 está constituido por las proteínas PR-2, -N, -O, y -O', las cuales poseen actividad β-1,3-glucanasa (Kauffmann y col., 1987), mientras que el grupo 3 está constituido por las proteínas PR-P, -Q y chi32 y chi34, las cuales poseen actividad quitinasa (Legrand y col., 1987). Se ha postulado que ambos grupos de proteínas juegan un doble papel en la resistencia de las plantas frente a patógenos

principalmente hongos; por un lado actúan directamente hidrolizando los componentes estructurales de la pared celular de los microorganismos, y por otro lado de una forma indirecta liberando oligosacáridos que actúan como inductores de otros mecanismos de defensa en plantas (Boller, 1993). El grupo 4 está constituido por las proteínas s1, s2, r1 y r2, de bajo peso molecular y de función desconocida (Kauffmann y col., 1990). Por último el grupo 5 está constituido por las proteínas PR-S y -R (Kauffmann y col., 1990), las cuales reciben el nombre de proteínas "similares a la thaumatina" debido a la alta homología que presentan con esta proteína (Cornelissen y col., 1986), y cuya función biológica parece ser antifúngica (Vigers y col., 1992).

En este capítulo, se analiza la inducción de PRs en plantas de pimiento, *Capsicum annuum* cv. Dulce Italiano, portadoras del gen de resistencia L¹, en respuesta a la inoculación con TMV. Se estudia la posible relación entre la inducción de proteínas PR y la reacción hipersensible, así como la caracterización de estas proteínas con la ayuda de inmunosueros específicos de PRs de tabaco y tomate, con el fin de establecer los posibles grupos de proteínas PR existentes en las plantas de pimiento y su relación con las PRs descritas en otras plantas solanáceas.

I.2. MATERIALES Y MÉTODOS

I.2.1. PLANTAS Y VIRUS.

Se han utilizado plantas de *Capsicum annuum* L. cv. "Dulce Italiano" con el gen de resistencia L¹ frente a TMV. Las plantas fueron mantenidas en cámaras de cultivo a una temperatura de 25 °C, humedad relativa del 60%, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad y una intensidad lumínica de 10.000 lux.

La estirpe U1 del virus del mosaico del tabaco (TMV) fue cedida por el Prof. Dr. F. García-Arenal (Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Madrid). El virus fue conservado en forma de desecado a 4 °C y propagado en plantas de *Nicotiana clevelandii* Gray.

Las plantas de pimiento fueron inoculadas en dos hojas completamente expandidas con una solución que contenía 20 µg/ml de TMV purificado en tampón de inoculación¹. Las plantas utilizadas como controles fueron inoculadas solo con el tampón o no se inocularon.

I.2.2. PURIFICACIÓN DE TMV-U1.

El virus fue purificado a partir de plantas de *Nicotiana clevelandii* Gray, a los 10 días posteriores a su inoculación (d.p.i.) con TMV a una concentración de 40 µg/ml, mediante un método puesto a punto en nuestro laboratorio (García-Luque y col. 1990).

Para ello las plantas fueron homogeneizadas con tampón de extracción², conteniendo un 10% de cloroformo, en la proporción de 4 ml por cada gramo de tejido foliar. Tras una centrifugación a 6.000 g durante 10 min los virus fueron precipitados del sobrenadante con PEG 6.000 al 6% y ClNa al 1%. El sedimento

¹ Tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7

² Tampón borato 100mM, pH 7,5
EDTA 5 mM
β-mercaptoetanol 5 mM

fue recogido por centrifugación a 6.000 g durante 20 min y resuspendido en el tampón de extracción conteniendo Tritón X-100 al 1%. La suspensión fue clarificada mediante una centrifugación a 15.000 g durante 5 min, y el sobrenadante se centrifugó a 110.000 g durante 2 h 15 min. Los precipitados fueron resuspendidos en el tampón de extracción, colocados en un gradiente de sacarosa (0,18 M - 0,58 M) y centrifugados a 160.000 g durante 60 min. Las fracciones conteniendo los virus, obtenidas mediante un fraccionador de gradientes ISCO con lectura de la absorbancia a 254 nm, fueron centrifugadas a 110.000 g durante 2 h 15 min, y el virus fue resuspendido en el tampón de extracción.

I.2.3. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

Las hojas inoculadas fueron recogidas a los 3 d.p.i. Las proteínas fueron extraídas según el método descrito por Tobias y col., (1989) con algunas modificaciones. Para ello las hojas se trituraron en morteros usando 1 g de tejido foliar por ml de tampón de extracción³. El homogeneizado se centrifugó a 20.000 g durante 20 min. y el sobrenadante fue dializado frente a un tampón Tris-HCL 62,5 mM pH 6,8, a 4 °C durante 24 horas, con tres cambios de tampón.

La cantidad de proteínas extraídas fue cuantificada por el método de Bradford utilizando el reactivo coloreado de Bio-Rad y seroalbúmina bovina (BSA) como patrón (Bradford, 1976).

I.2.4. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE).

Los extractos de proteínas fueron analizados en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) según el método descrito por Laemmli (1970), mediante el cual las proteínas se separan según su peso molecular (MW). Los geles empleados

³ 79.4 ml Acido Cítrico .. 0.1 M
20.6 ml PO₄HNa₂ 0.2 M
β-mercaptoetanol 0.3%
Acido Ascórbico 0.1%
PVP 0.1%
pH 2,8

tenían una zona de concentración de la muestra con 4.5% de poliacrilamida⁴ y una zona de separación con 12.5% de poliacrilamida⁵. Las proteínas eran previamente desnaturalizadas calentando las muestras a 100 °C durante 3 min en presencia de un tampón disociador⁶. La electroforesis se realizó a 25 mA durante 4 horas con refrigeración por agua.

Las bandas de proteínas fueron visualizadas por tinción con plata según el método descrito por Morrissey (1981).

1.2.5. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL.

Los extractos de proteínas se analizaron en geles de poliacrilamida mediante electroforesis bidimensional basada en el método descrito por O´Farrel (1975), de forma que las proteínas se separan según su punto isoeléctrico (pI) y su peso molecular.

La primera dimensión, isoelectroenfoque (IEF), se realizó en geles de poliacrilamida (T=4%, C=3%), Immobiline^R DryStrip de PHARMACIA que contienen un gradiente de pH inmovilizado entre 3 y 10. Los extractos de proteínas se prepararon en tampón de muestra⁷ antes de cargarse en los geles. La

⁴ Tris-HCl 125 mM, pH 6.8
 Acrilamida 4.4%
 Bisacrilamida 0.1%
 SDS 0.1%
 TEMED 0.05%
 Persulfato Amónico .. 0.07%

⁵ Tris-HCl 375 mM, pH 8.8
 Acrilamida 12.45%
 Bisacrilamida 0.33%
 SDS 0.1%
 TEMED 0.05%
 Persulfato Amónico .. 0.05%

⁶ Tris-HCl 125 mM, pH 6.8
 β-mercaptoethanol ... 2%
 SDS 2%
 BPB 0.01%

⁷ Urea 8 M
 β-mercaptoethanol ... 2%
 Pharnalitos 3-10 ... 2%
 Tritón X-100 0.5%
 BPB 0.01%

electroforesis se realizó en cuatro fases⁸ en las cuales el voltaje se fue incrementando. Las tiras de IEF no utilizadas inmediatamente se guardaron a -80 °C.

La segunda dimensión, SDS-PAGE, se realizó en geles ExcelGel™ SDS de PHARMACIA, de 0.5 mm de espesor y un gradiente de concentración entre 8 y 18 % de poliacrilamida. Previamente, las muestras de proteínas inmovilizadas en los geles de IEF se someten a dos pasos consecutivos de equilibrado con un tampón disociador⁹, que en el primer paso contenía DTT (0.2%) y en el segundo paso Iodoacetamida (4,5%) más azul de bromofenol (BPB) al 0,01%. La electroforesis se realizó a 600 V durante 2 h. Ambos tipos de electroforesis se llevaron a cabo en el sistema electroforético Multiphor^R II de PHARMACIA.

Las proteínas separadas en la segunda dimensión fueron visualizadas por tinción con plata según el protocolo descrito por PHARMACIA con algunas modificaciones: primeramente los geles se sumergían en dos soluciones fijadoras¹⁰ durante 30 y 15 min cada una y a continuación se incubaban durante 1 min en una solución reductora de tiosulfato sódico (0.02%). Tras varios lavados con H₂O los geles se incubaron en una solución acuosa de nitrato de plata¹¹ durante 20 min en oscuridad. Las bandas de proteínas fueron reveladas en una solución de carbonato sódico¹² y la reacción se detuvo con una solución al 5% de ac. acético.

⁸ 1ª Fase: 300 V durante 3 h
2ª Fase: Incrementos del voltaje cada 30 min
hasta alcanzar 1400 V en 3 h 30 min
3ª Fase: 1400 V durante 13 h
4ª Fase: 2000 V durante 2h 30 min.

⁹ Tris-HCl 50 mM pH 6.8
Urea 6 M
Glicerol .. 30%
SDS 1%

¹⁰ a) 50% Etanol + 10% Ac. acético
b) 5% Etanol + 1% Ac. acético

¹¹ Ag NO₃ 0.2%
Formaldehído ... 750 µl/l

¹² Na₂CO₃ 6%
Na₂S₂O₃·5H₂O ... 0.02%
Formaldehído ... 500 µl/l

I.2.6. ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A FILTROS DE NITROCELULOSA.

Las proteínas separadas en los geles desnaturalizantes de la segunda dimensión fueron electrotransferidas a filtros de nitrocelulosa HybondTM-ECL. Para ello los geles eran previamente separados del soporte plástico sobre el que están polimerizados y posteriormente transferidos a los filtros según el método de Towbin y col., (1979). La transferencia se realizó en tampón Tris-glicina¹³, a un voltaje constante de 30 V y durante 16 h.

I.2.7. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS SOBRE FILTROS DE NITROCELULOSA.

Los filtros de nitrocelulosa con las proteínas fijadas eran sumergidos en una solución bloqueante¹⁴ durante 1 h y posteriormente incubados con diferentes inmunosueros específicos de las PRs de tomate, p14, P23, P29, P35 y P36, que nos fueron cedidos por el Prof. Dr. Vicente Conejero (E.T.S.I. Agrónomos. Valencia) y de las PRs de tabaco PRQ y chi32,34 cedidos por el Dr. Legrand (Institut de Biologie Moleculaire des Plantes. CNRS. Estrasburgo, Francia) y glucb cedido por la Dra. Carmen Castresana (CNB. CSIC. Madrid). Los inmunosueros, cuyas especificidades figuran en la tabla 1, se emplearon a diferentes diluciones, determinadas empíricamente, en solución de bloqueo y la incubación se realizó a temperatura ambiente durante toda la noche. Tras varios lavados con PBS-T¹⁵ los anticuerpos unidos a las proteínas del filtro se detectaron con un segundo anticuerpo, específico de las IgG de conejo conjugado con peroxidasa (GAR-PO). Este segundo anticuerpo se utilizó a la dilución 1:5.000 en solución de bloqueo.

¹³ Tris base ... 25 mM
Glicina 192 mM
Metanol 20%

¹⁴ PO4HNa2 8 mM
PO4H2Na 2 mM
ClNa 150 mM
Tween-20 0.1%
Leche desnatada en polvo 5%
pH 7,2

¹⁵ PO4HNa2 8 mM
PO4H2Na 2 mM
ClNa 150 mM
Tween 20 0.1%
pH 7,2

La actividad enzimática unida al segundo anticuerpo se detectó mediante una reacción de oxidación del sustrato luminol, que producía una emisión de luz la cual era detectada por cortas exposiciones del filtro a películas de autoradiografía sensibles a la luz azul (Hyperfilm ECL). Este sistema luminiscente de detección ECL™ ha sido desarrollado por AMERSHAM, de forma que todos los reactivos utilizados así como el protocolo seguido, fueron los suministrados por esta casa comercial.

Tabla. 1.- Especificidad de los inmunosueros utilizados en este estudio. La intensidad de la reacción en inmunoelectrotransferencia varía entre fuerte (+ + +), suave, (+ +), débil (+ / -) o nula (-). n.d.- No determinado.

| PLANTA | NOMBRE | GRUPO | INMUNOSUERO ESPECIFICO DE PRs | | | | | | | | Referencia | |
|--------|----------|-------|-------------------------------|-------|-------|-------|------|--------|------|----------|------------|-----------------------|
| | | | TOMATE | | | | | TABACO | | | | |
| | | | p14 | P29 | P35 | P36 | P23 | glucb | PRQ | chi32,34 | | |
| Tomate | p14 | 1 | + + + | - | - | - | - | - | n.d. | - | - | Vera y col., 1988. |
| Tomate | P29 | 2 | - | + + + | - | - | - | - | n.d. | - | - | Dra. C. Domingo* |
| Tomate | P35 | 2 | - | - | + + + | - | - | - | n.d. | - | - | " |
| Tomate | P36 | 2 | - | - | + / - | + + + | - | - | n.d. | - | - | " |
| Tomate | P23 | 5 | - | - | - | - | - | + + | n.d. | - | - | Rodrigo y col., 1991. |
| Tabaco | glucb | 2 | - | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | + | - | - | Dra. C. Castresana* |
| Tabaco | chi32,34 | 3 | - | - | - | - | - | - | - | + + | + + + | Legrand y col., 1987. |
| Tabaco | PRQ | 3 | - | - | - | - | - | - | - | + + + | - | " |

* comunicación personal.

I.3. RESULTADOS

I.3.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DE LAS HOJAS INOCULADAS CON TMV Y TAMPÓN Y DE LAS HOJAS NO INOCULADAS.

La cantidad de proteína estimada por el método de Bradford en los extractos de hojas inoculadas con TMV fue de 800 $\mu\text{g/g}$ de tejido fresco, mientras que la cantidad de proteínas en los extractos de hojas inoculadas con tampón fue de 250 $\mu\text{g/g}$. Una parte importante de las proteínas extraídas de las hojas inoculadas con TMV corresponde a la proteína de la cápsida del virus, que es la proteína mayoritaria durante la infección viral, aproximadamente 500 $\mu\text{g/g}$ de tejido fresco.

I.3.2. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).

La inoculación con TMV de hojas de plantas de pimiento con el gen de resistencia L^1 desencadena una reacción hipersensible caracterizada por la aparición de lesiones locales necróticas a los 3 d.p.i. y la posterior necrosis y abscisión de la hoja (Fig. 1). El análisis electroforético (SDS-PAGE) en geles del 12,5% de poliacrilamida de las proteínas extraídas a pH ácido de las hojas de *Capsicum annuum* L^1L^1 , muestra un patrón de bandas claramente diferente entre los extractos obtenidos de hojas inoculadas con TMV y los de hojas inoculadas con tampón (Fig. 2). De tal forma que podemos distinguir distintos grupos de bandas de proteínas con diferentes pesos moleculares en las hojas inoculadas con TMV que no se encuentran en las hojas inoculadas con tampón. Las proteínas mayoritarias identificadas en las plantas de pimiento tienen pesos moleculares semejantes a los de las PRs de tabaco. Atendiendo al peso molecular de estas proteínas las hemos nombrado p13 a p46.

Fig. 1. Lesiones locales necróticas inducidas durante la reacción hipersensible en las hojas de plantas de *Capsicum annuum* cv. Dulce Italiano L¹L¹ inoculadas con TMV.

Fig. 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5% (SDS-PAGE) de los extractos proteicos obtenidos a los 3 d.p.i. de hojas de *Capsicum annuum* cv Dulce Italiano L¹L¹ inoculadas con TMV (Carril B) y con tampón de inoculación (Carril A). A la izquierda de la figura se indican los pesos moleculares (MW) de los marcadores. Las flechas señalan las bandas de proteínas mayoritarias detectadas en las hojas inoculadas con TMV. A la derecha de las flechas se indican los diferente grupos de PRs de tabaco a los que pueden adscribirse estas proteínas en base a su MW. TMV-CP señala a la proteína de la cápsida del virus. Las bandas de proteínas se visualizaron tiñéndolas con plata.



FIG.1

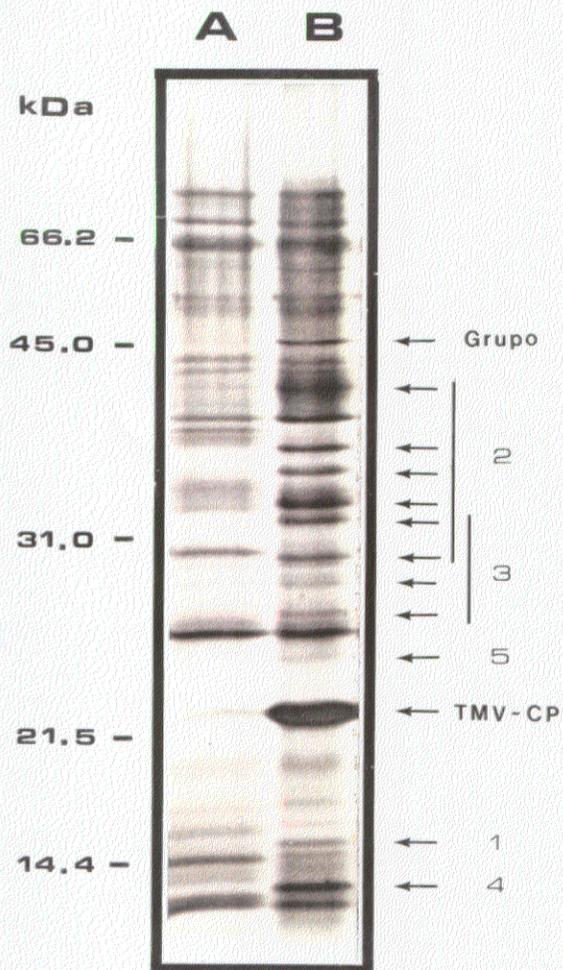


FIG.2

1.3.3. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO BIDIMENSIONAL DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

El análisis de los extractos proteicos mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida, dio también como resultado un patrón de proteínas claramente diferente entre los extractos obtenidos de las hojas inoculadas con TMV y los de las hojas inoculadas con tampón, pudiéndose observar un mayor número de proteínas en los extractos de hojas inoculadas con TMV (Fig. 3). Mayoritariamente las proteínas detectadas tienen *pI* ácido o neutro, siendo pocas las que poseen *pI* básico. El mayor número de isoformas corresponde a las proteínas con MW comprendidos entre 30 y 35 kDa.

1.3.4. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS PR SOBRE FILTROS DE NITROCELULOSA.

Las proteínas separadas por electroforesis bidimensional fueron electrotransferidas a filtros de nitrocelulosa para su posterior inmunodetección con diferentes inmunosueros específicos de PRs de otras solanáceas.

1.3.4.1. PRs DEL GRUPO 1

Incubando las membranas de nitrocelulosa con un inmunosuero específico de la proteína p14 aislada de plantas de tomate infectadas por el viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd; citrus exocortis viroid), se detectó en las hojas de plantas de pimiento inoculadas con TMV una proteína de MW 16 kDa y *pI* 8,6 que no se detectó en los extractos de hojas de plantas sanas (Fig. 4c).

1.3.4.2. PRs DEL GRUPO 2: β -1,3-Glucananas (EC 3.2.1.39).

Los filtros de nitrocelulosa se incubaron con tres inmunosueros específicos de las proteínas del grupo 2 P29, P35 y P36, aisladas de plantas de tomate en respuesta a la infección por el CEVd. Con el inmunosuero frente a la P29 se detectó en las hojas de pimiento inoculadas con TMV una proteína de MW 30 kDa y *pI* 4,4 denominada p30 (Fig. 5d). Con el inmunosuero específico de la P35 se detectaron tres proteínas; la p34a, de MW 34 kDa y con isoformas de *pI*

Fig. 3. Electroforesis bidimensional de los extractos proteicos obtenidos a los 3 d.p.i. de hojas de *Capsicum annuum* cv Dulce Italiano L¹L¹ inoculadas con TMV (a) y con tampón de inoculación (b). A la izquierda de la figura se indican los pesos moleculares de los marcadores. La flecha señala la proteína de la cápsida del virus. Las proteínas se visualizaron tiñéndolas con plata.

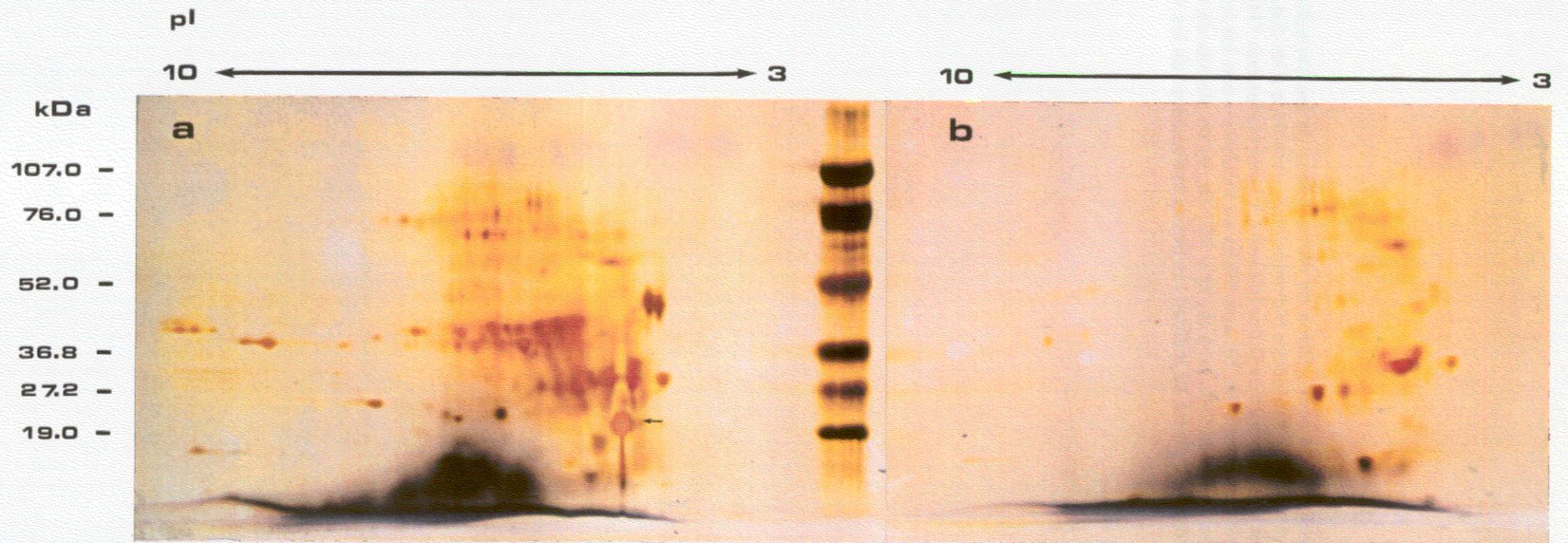


FIG. 3

Fig. 4. Inmunodetección sobre filtros de nitrocelulosa de los extractos proteicos, separados por electroforesis bidimensional, obtenidos a los 3 d.p.i. de hojas de *Capsicum annuum* cv Dulce Italiano L¹L¹ inoculadas con TMV (**c, d**) y de hojas no inoculadas (**a, b**). Los filtros se incubaron con los inmunosueros específicos de las PRs, p14 (**a, c**) y P23 (**b, d**) de plantas de tomate. A la izquierda de la figura se indican los pesos moleculares de los marcadores.

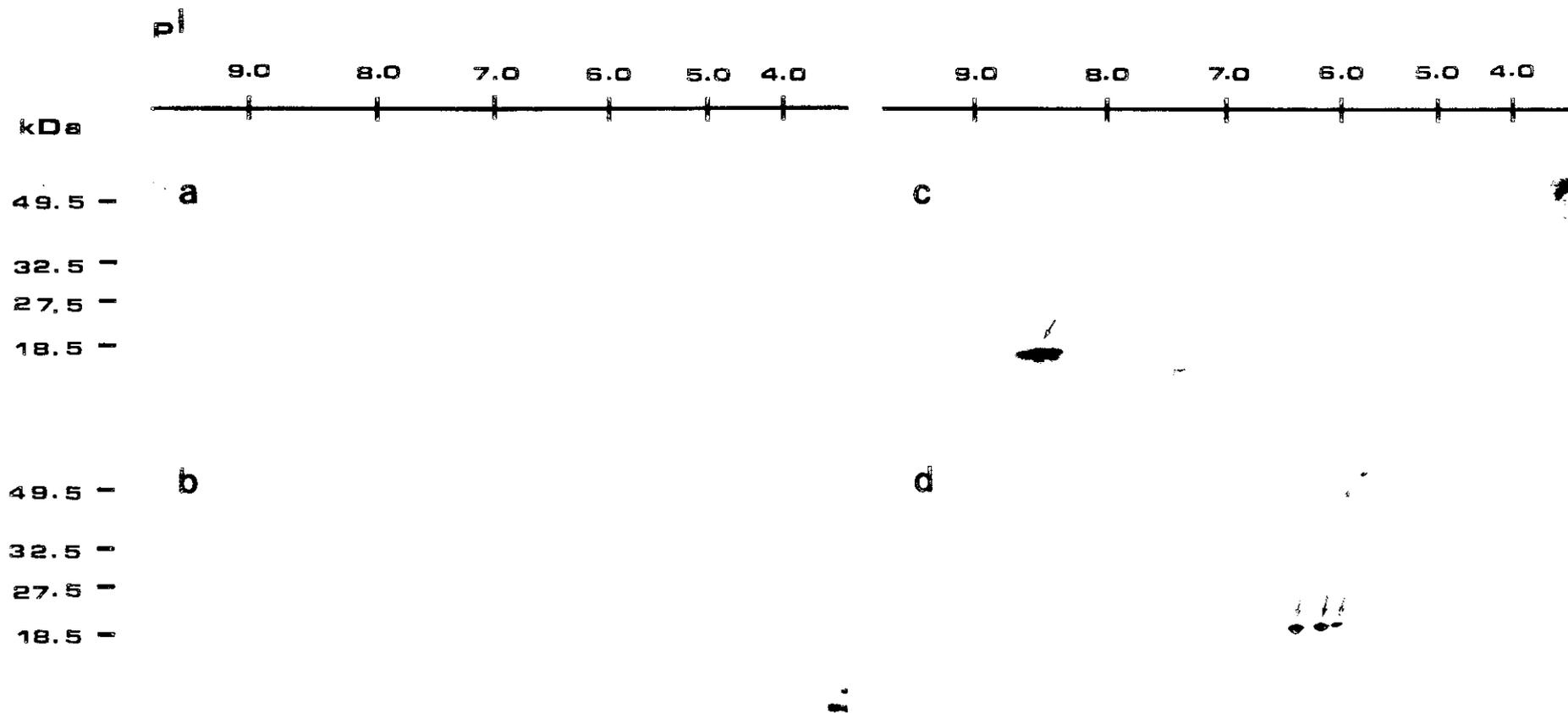


FIG. 4

comprendidos entre 4,8 y 5,4; la p34b, de idéntico peso molecular pero con isoformas de pI comprendidos entre 7,7 y 8,0 (Fig. 5e); y la p40, de MW 40 kDa con isoformas de pI comprendidas entre 4,8 y 5,2. Algunas de las isoformas ácidas y básicas de estas proteínas reaccionaron también con un inmunosuero específico de la PR básica glucb de tabaco (datos no mostrados). Con el inmunosuero específico de la P36 se detectaron hasta 3 isoformas ácidas de pI comprendidos entre 4,8 y 5,4 de la proteína p36 de MW 36 kDa (Fig. 5f). Este grupo de isoformas se detectó también con el inmunosuero frente a la proteína P35 (Fig. 5e).

En las hojas no inoculadas se detectaron algunas isoformas básicas con el suero frente a la P35 (Fig. 5b) e isoformas neutras con el inmunosuero específico de la P36 (Fig. 5c).

1.3.4.3. PRs DEL GRUPO 3: Quitinasas (EC 3.2.1.14).

Los filtros de nitrocelulosa se incubaron con inmunosueros específicos de las quitinasas PRQ y chi32,34 aisladas de plantas de tabaco infectadas con TMV. Con el inmunosuero frente a la PRQ se detectó una gran cantidad de isoformas básicas y ácidas de proteínas de distinto peso molecular (Fig. 6d), así se detectaron las proteínas p28b y p29b con MW 28 y 29 kDa respectivamente, que poseen isoformas básicas de pI comprendido entre 7,8 y 8,1 y las proteínas p28a y p29a con los mismos pesos moleculares pero con isoformas ácidas de pI comprendidos entre 4,5 y 6,5. También con este inmunosuero se detectaron las proteínas p31 y p32 de MW 31 y 32 kDa y con isoformas ácidas de pI comprendidos entre 5,3 y 6,5. Isoformas del mismo peso molecular que estas proteínas pero con pI comprendidos entre 4,4 y 5,1, se detectaron con el inmunosuero frente a la chi32,34 de tabaco (Fig. 6c).

En las hojas de plantas de pimiento no inoculadas, se detectaron isoformas básicas de 31 y 32 kDa con el suero frente a la chi32,34 (Fig. 6a) y varias isoformas ácidas de 28 kDa con el inmunosuero frente a la PRQ (Fig. 6b).

Fig. 5. Inmunodetección sobre filtros de nitrocelulosa de los extractos proteicos, separados por electroforesis bidimensional, obtenidos a los 3 d.p.i. de hojas de *Capsicum annuum* cv Dulce Italiano L¹L¹ inoculadas con TMV (**d, e, f**) y de hojas no inoculadas (**a, b, c**). Los filtros se incubaron con los inmunosueros específicos de las PRs, P29 (**a, d**), P35 (**b, e**) y P36 (**c, f**) de plantas de tomate. A la izquierda de la figura se indican los pesos moleculares de los marcadores.

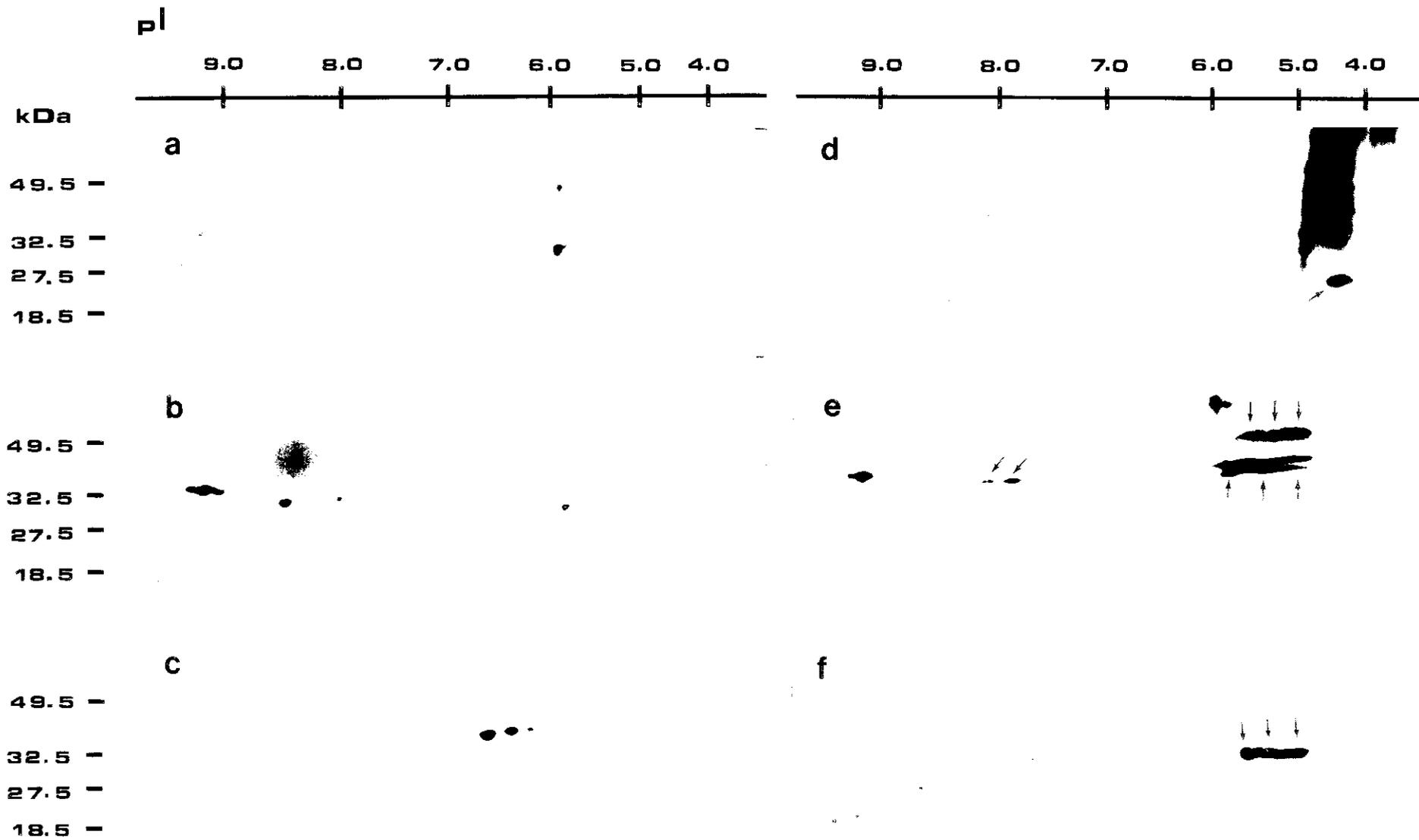


FIG. 5

Fig. 6. Inmunodetección sobre filtros de nitrocelulosa de los extractos proteicos, separados por electroforesis bidimensional, obtenidos a los 3 d.p.i. de hojas de *Capsicum annuum* cv Dulce Italiano L¹L¹ inoculadas con TMV (**c, d**) y de hojas no inoculadas (**a, b**). Los filtros se incubaron con los inmunosueros específicos de las PRs, chi32,34 (**a, c**) y PRQ (**b, d**) de plantas de tabaco. A la izquierda de la figura se indican los pesos moleculares de los marcadores.

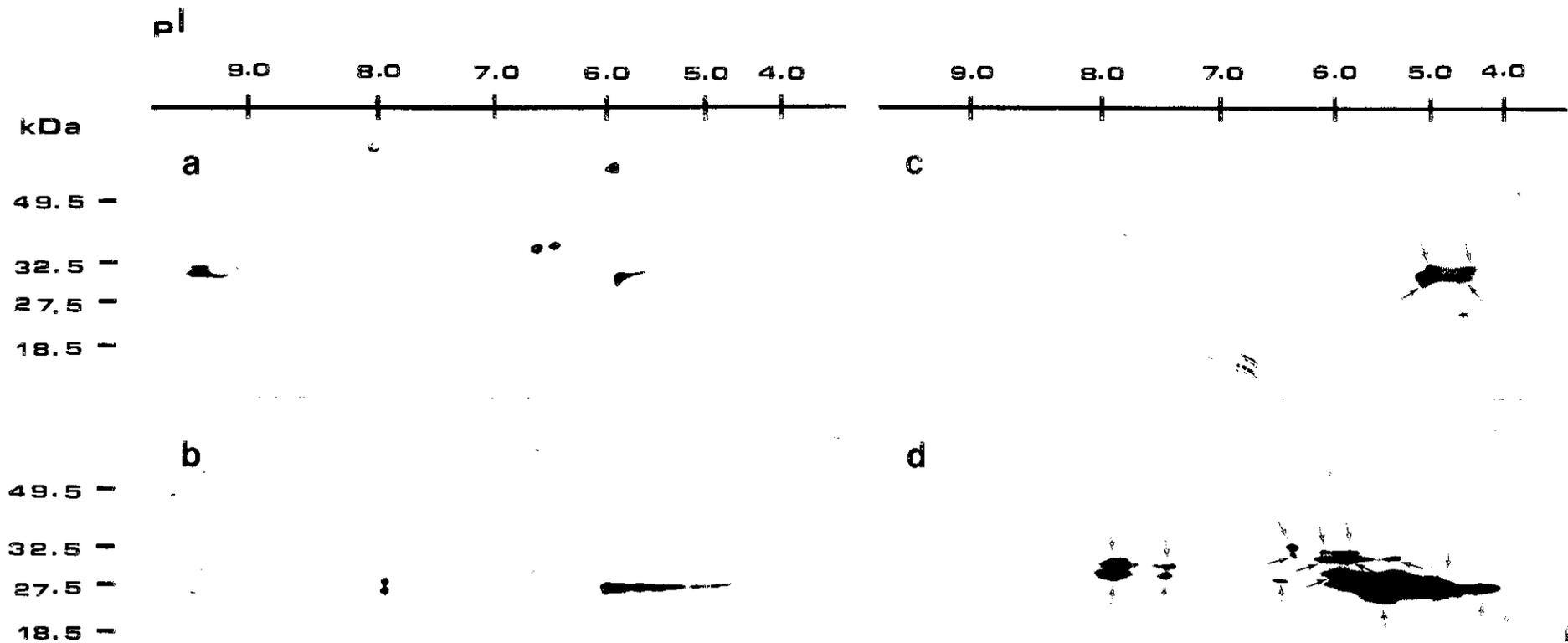


FIG. 6

I.3.4.4. PRs DEL GRUPO 5.

Las membranas se incubaron con un inmunosuero específico de la proteína PR P23 aislada de plantas de tomate infectadas con CEVd. En las hojas de pimiento inoculadas con TMV se detectaron tres isoformas de pI 6,1, 6,2 y 6,4 de la proteína p23 con MW 23 kDa (Fig. 4d).

Los resultados anteriormente expuestos se resumen en la Tabla 2 y en la Figura 2.

Tabla 2.- PRs identificadas en hojas de plantas de *Capsicum annuum* de genotipo L'L¹ inoculadas con TMV.

| GRUPO | NOMBRE | kDa | pl | RELACION SEROLOG. | REF. TABACO | NOMBRE | kDa | pl | RELACION SEROLOG. | REF. TABACO | FUNCION DEL GRUPO |
|-------|--------|-----|---------|---------------------|-------------|--------|-----|---------|-------------------|-------------|-------------------|
| 1 | | | | | | p16 | 16 | 8,6 | p14 Tomate | PR-1 | antifúngica (?) |
| 2 | p30 | 30 | 4,4 | P29 Tomate | Clase II | | | | | | β-1,3-glucanasas |
| | p34a | 34 | 4,8-5,8 | P35 Tomate | Clase II | p34b | 34 | 7,7-9,5 | P35 Tomate | Clase I | |
| | p36 | 36 | 4,8-5,4 | P36 Tomate | Clase II | | | | | | |
| | p40 | 40 | 4,8-5,2 | P35 Tomate | ? | | | | | | |
| 3 | p28a | 28 | 4,5-6,5 | PR-Q Tabaco | Clase II | p28b | 28 | 7,8-8,1 | PR-Q Tabaco | Clase I (?) | quitinasas |
| | p29a | 29 | 5,0-5,7 | PR-Q Tabaco | Clase II | p29b | 29 | 7,8-8,1 | PR-Q Tabaco | Clase I (?) | |
| | p31 | 31 | 5,3-6,5 | PR-Q Tabaco | Clase II | | | | | | |
| | | 31 | 4,5-5,1 | chi 32,34 tabaco | Clase II | | | | | | |
| | p32 | 32 | 6,0-6,5 | PR-Q Tabaco | Clase II | | | | | | |
| | | 32 | 4,4-5,0 | chi 32,34 Tabaco | Clase II | | | | | | |
| 4 (?) | p13 | 13 | nd | ? | | | | | | | desconocida |
| 5 | p23 | 23 | 6,1-6,4 | PR P23 Tomate | PR-R, -S | | | | | | antifúngica (?) |

I.4. DISCUSIÓN.

En las plantas de *Capsicum annuum* con el gen de resistencia L¹, la inoculación con TMV desencadena en las hojas inoculadas una reacción hipersensible caracterizada por la presencia de lesiones locales necróticas en las hojas y por la inducción y acumulación en éstas de una serie de proteínas, las cuales han sido identificadas y caracterizadas con anterioridad en otros huéspedes que responden también con reacción hipersensible frente a diferentes patógenos, tales como hongos, bacterias y virus, y que se conocen como PRs (Revisiones en Bol y col., 1990; Stintzi y col., 1993a).

El análisis electroforético de estas proteínas nos ha permitido identificar hasta 11 PRs principales en las hojas de plantas de *C. annuum* L¹L¹ infectadas con la estirpe U1 de TMV, las cuales están ausentes o en escasa presencia en las hojas de plantas sanas. Todas estas proteínas se caracterizan por ser solubles en un tampón de pH ácido y poseer un rango de peso molecular bajo, tal y como se ha observado en otras PRs identificadas en especies de plantas solanáceas como tabaco (Van Loon y col., 1987), patata (Parent y Asselin, 1987) y tomate (Granell y col., 1987; Christ y Mössinger, 1989).

Las PRs de pimiento que hemos identificado presentan diferentes isoformas de pl ácido y básico, siendo las isoformas ácidas las más abundantes. Isoformas básicas y ácidas de las PRs se han encontrado también, en otras solanáceas como tabaco (Van Loon y col., 1987), patata (Parent y Asselin, 1987) y tomate (Fischer y col., 1989). En todos los casos, excepto en las plantas de tomate, las isoformas ácidas son mayoritarias tal y como ocurre en las plantas de pimiento. Los diferentes pl de las PRs parecen estar relacionados con la localización de estas proteínas en las células, de manera que la mayoría de las isoformas ácidas se localizan en los espacios extracelulares mientras que las isoformas básicas se localizan en el interior de vacuolas (Dore y col., 1991; Heitz y col., 1994), por otra parte algunas de estas proteínas vacuolares se traducen unidas a un corto prepeptido C-terminal que actúa como señal de transporte, el cual es eliminado durante o después de su compartimentación en la vacuola (Melchers y col., 1993)

Hemos comprobado que distintas isoformas de las PRs de pimiento

reaccionan sobre filtros de nitrocelulosa con diferentes inmunosueros obtenidos frente a PRs purificadas de plantas de tomate y tabaco infectadas con CEVd y TMV respectivamente. La reacción cruzada con inmunosueros específicos de las distintas PRs se observa entre proteínas del mismo grupo, tanto en plantas de la misma especie, tal y como se ha descrito en tomate (Joonsten y De Wit, 1989), y tabaco (Heitz y col., 1994), como entre proteínas pertenecientes a plantas de especies diferentes (Nassuth y Sanger, 1986; Parent y col., 1988; Fischer y col., 1989). En las plantas de tabaco, los anticuerpos frente a las formas ácidas de las PRs reconocen sus correspondientes formas básicas, mientras que los sueros realizados frente a las formas básicas son específicos solo para estas formas (Heitz y col., 1994). Esto último no ocurre así en las plantas de tomate ni tampoco en las plantas de pimiento tal y como revelan nuestros resultados, pues con sueros realizados frente a diferentes PRs básicas de plantas de tomate de los grupos 2 y 3 se identifican formas básicas y ácidas de proteínas PRs de estos grupos en las plantas de pimiento.

Estos resultados nos han permitido adscribir las PRs de pimiento a los cinco grupos en los que se encuentran clasificadas las PRs de *Nicotiana* spp. Así, en el grupo 1, se incluira la proteína p16; en el grupo 2, las proteínas p30, p34, p36 y p40; en el grupo 3, las proteínas p28, p29, p31 y p32; en el grupo 4, la proteína p13; y en el grupo 5, la proteína p23.

La proteína p13 no reaccionó con ninguno de los inmunosueros ensayados, por lo que su inclusión en el grupo 4 se realizó únicamente, en base a su peso molecular, similar al de PRs de este grupo descritas en otros huéspedes (Kauffman y col., 1990). Por otra parte, la proteína de 46 kDa (p46), tampoco reaccionó con ninguno de los inmunosueros probados, por lo que desconocemos su posible relación con las PRs de otras solanaceas.

La proteína básica de 16 kDa y pl 8.6 a la que llamamos p16, reacciona con un suero obtenido frente a la proteína p14 (Vera y col., 1988), que es una de las PRs mayoritaria y mejor conocida en las plantas de tomate (Granell y col., 1987). La p14 es una proteína básica que muestra homología con las PRs del grupo 1 de tabaco (Lucas y col., 1985). Joosten y col. (1990), describen dos isoformas de 15,5 kDa y pl 10,9 y 10,7, denominadas P4 y P6 respectivamente, que presentan reacción cruzada con los inmunosueros de las PR1-a, -b y -c de tabaco.

Recientemente, se han purificado en las plantas de tomate infectadas con *Phytophthora infestans* tres proteínas básicas de 14 kDa, denominadas P14a, P14b y P14c, cuyas relaciones serológicas y comparación de secuencias muestran que son miembros del grupo PR1. La proteína P14a correspondería a la isoforma P6, la P14b correspondería a la isoforma P4 y la P14c sería una nueva PR1 (Niderman y col., 1995). Por otra parte la proteína P14a presenta un 100% de homología con la secuencia deducida del clon Tom-PR-1a publicado por Tornero y col., (1993), y que corresponde al gen de la proteína p14 aislada por Vera y col. (1988).

Si bien, con anticuerpos frente a la PR- 1a y -1b de tabaco se han podido identificar PRs del grupo 1 en plantas de maíz, patata y tomate (White y col., 1987), no ha sido posible identificar PRs básicas de este grupo en las plantas de tabaco (Stintzi y col., 1993). Sin embargo, con el inmunosuero específico de la P14a se ha identificado en las plantas de tabaco infectadas con *P. infestans* una proteína básica denominada PR-1g, cuya secuencia aminoacídica presenta un 94% de homología con la p14c y con la secuencia deducida de un clon genómico de tabaco correspondiente a una PR-1 básica (Payne y col., (1989).

Con el suero frente a la p14 de tomate no hemos identificado ninguna proteína ácida en pimiento, a pesar de que este inmunosuero reconoce una proteína de aproximadamente 14 kDa en las plantas de *N. tabacum* infectadas con TMV (datos no mostrados), que podría ser del grupo 1 de PRs ácidas de tabaco. Por otra parte, Nassuth y Sängner, (1986) encuentran una fuerte reacción cruzada de las PR 1a, 1b y 1c de *N. tabacum* Samsun NN con un inmunosuero específico de la PR p14 de tomate. Es probable por tanto que, el inmunosuero específico de la p14 de tomate pudiera reconocer isoformas ácidas de PRs del grupo 1 en plantas de pimiento, por lo que es posible que en estas plantas no existan estas isoformas. Podemos concluir que, la p16 es una proteína básica del grupo PR1 relacionada con la p14 de tomate y que al igual que ocurre con esta proteína y debido a su pl básico se localice probablemente en el interior de vacuolas y en apoplasto (Vera y col., 1989).

Diferentes isoformas ácidas de las proteínas PR de pimiento, p30, p34a, p36 y p40 e isoformas básicas de la PR p34b, reaccionan con inmunosueros específicos de tres β -1,3-glucanasas básicas (P29, P35 y P36) purificadas de plantas de tomate infectadas con CEVd. La mayoría de isoformas ácidas y básicas

de estas proteínas en las plantas de pimiento reaccionan con el suero específico de la PR-P35 de tomate. Así, se detectan las proteínas p34a y p34b de MW 34 kDa y con isoformas ácidas de pI comprendidos entre 4,8 y 5,8 y con isoformas básicas de pI comprendido entre 7,7 y 9,5, respectivamente. Los pI de estas proteínas coinciden con los de las diferentes isoformas ácidas y básicas de actividades β -1,3-glucanasas identificadas en las hojas de plantas de pimiento infectadas con *Pseudomonas capsici* (Kim y Hwang, 1994). Por otro lado el peso molecular de estas proteínas es similar al hallado en las PRs de plantas de tomate infectadas con *Cladosporium fulvum*, donde se han purificado dos proteínas de 35 kDa con pI básico y ácido (Joosten y De Wit, 1989; Van Kan y col., 1992), que están relacionadas con las PRs descritas en plantas de tabaco, glucb de la clase I y PR-2, -N y -O de la clase II respectivamente (Kauffman y col., 1987). De manera que podemos concluir que, las PRs p34a y p34b, identificadas en las plantas de pimiento, están relacionadas con las glucanasas de las clases II y I respectivamente, tal y como ocurre con sus homólogas descritas en tomate. Las isoformas básicas de la p34b se detectan también en los extractos de hojas de plantas sanas, en concordancia con trabajos anteriores en los que se describe la expresión constitutiva de estas proteínas en las hojas más viejas de plantas sanas de tabaco (Wyatt, y col., 1991; Van de Rhee y col., 1993).

Isoformas ácidas de la proteína p40 de MW 40 kDa reaccionan también con el suero frente a la P35 de tomate, lo que podría indicarnos su posible relación con las glucanasas de la clase II. Sin embargo, no se ha identificado con anterioridad en ningún huésped ninguna proteína PR del grupo 2 con un peso molecular tan alto. Con el suero frente a la PR-P36 de tomate reacciona la proteína p36 de MW 36 kDa, cuyo peso molecular es igual al de una proteína ácida identificada en las plantas de tomate infectadas con *P. infestans* (Fisher y col., 1989). Las isoformas de la p36 poseen pI comprendidos entre 4,8 y 5,8 iguales a los de la p34a, además algunas de las isoformas de la p36 reaccionan también con el suero frente a la PR-P35, lo cual nos indica la estrecha relación existente entre ambas proteínas, de manera que la p36 puede formar parte también de la clase II al igual que la p34a.

Con el suero frente a la P29 de tomate se detecta en las hojas de plantas de pimiento inoculadas con TMV la proteína p30 de MW 30 kDa y pI \approx 4,4.

Ninguna proteína ácida de este peso molecular ha sido descrita con anterioridad en las plantas de tomate. Sin embargo, en las plantas de tabaco la proteína PR2 de la clase II presenta un MW y pI muy semejantes (Kauffmann y col., 1987), esto unido al hecho de que el suero está realizado frente a una proteína con actividad β -1,3-glucanasa, parece indicar que la p30 de pimiento es una PR del grupo 2, y posiblemente de la clase II, relacionada con la PR2 de tabaco.

En las hojas de plantas de pimiento inoculadas con TMV se detectan numerosas isoformas ácidas y algunas isoformas básicas de proteínas con pesos moleculares comprendidos entre 28 y 32 kDa, que presentan reacción cruzada con inmunosueros realizados frente a las proteínas PR-Q y chi32,34 del grupo 3 de proteínas PR con actividad quitinasa, caracterizadas en las hojas de las plantas de tabaco Samsun NN infectadas con TMV (Legrand y col., 1987). Con el suero frente a la quitinasa ácida de la clase II de tabaco, PR-Q, se detectan en las plantas de pimiento isoformas ácidas de cuatro proteínas de MW 28, 29, 31 y 32 kDa, e isoformas básicas de dos proteínas de MW 28 y 29 kDa, debido a que este inmunosuero reconoce determinantes antigénicos presentes en las isoformas ácidas y básicas de las quitinasas de tabaco (Legrand y col., 1987). De forma similar, en las plantas de tomate infectadas con *P. infestans* se detectan dos quitinasas básicas de 30 y 31 kDa y una quitinasa ácida de 26 kDa (Fischer y col., 1989), mientras que la infección con *C. fulvum* induce quitinasas ácidas de 26 y 27 kDa y básicas de 30 y 32 kDa (Joosten y Wit, 1988). Las proteínas ácidas identificadas en las plantas de pimiento poseen pI y MW semejantes a los hallados en las quitinasas de la clase II de tabaco, además la reacción con el suero frente a la PR-Q parece indicar que estas quitinasas son de esta misma clase. Sin embargo, las dos proteínas básicas identificadas en las plantas de pimiento no poseen reacción cruzada ni con el inmunosuero específico de las quitinasas básicas de la clase I de tabaco chi32,34, ni con el inmunosuero de las quitinasas básicas inducidas en las plantas de tomate por la infección con el viroide CEVd (Conejero y col., 1990), las cuales están relacionadas con las quitinasas de la clase I de tabaco (datos no mostrados). Si consideramos el hecho que los sueros frente a quitinasas básicas solo reaccionan con las quitinasas de la clase I de tabaco (Heitz y col., 1994) y de tomate (Fischer y col., 1989), parece claro que las quitinasas básicas detectadas en pimiento no poseen los mismos determinantes antigénicos

que las quitinasas de la clase I de tabaco y tomate. Este hecho unido a que los pesos moleculares de las quitinasas básicas de pimiento son inferiores a los de las quitinasas de la clase I de las plantas de tabaco y tomate, parece indicar que las quitinasas básicas de pimiento no pertenecen a la clase I, pudiendo por tanto ser de otra clase diferente. En este sentido, Collinge y col., (1993) proponen una clase IV de quitinasas aun no localizadas en tabaco, en la que se incluyen las proteínas básicas PR4 de *Phaseolus vulgaris* (Margis-Pinheiro y col., 1991) y ChB4 de *Brassica napus* (Rasmussen y col., 1992a), las cuales poseen un dominio N-terminal rico en cisteína igual que el que poseen las quitinasas de la clase I, pero que son más pequeñas que éstas y por tanto con un peso molecular inferior y con las que poseen un porcentaje de homología de secuencia aminoacídica entre un 45 y un 50% (Rasmussen y col., 1992b).

En las hojas de plantas de pimiento sanas es posible detectar algunas isoformas ácidas de la p28a e isoformas básicas de la p28b y p29b. Al igual que ocurre con las β -1,3-glucanasas, las quitinasas son enzimas que poseen complejos mecanismos de inducción y de regulación de la expresión, de forma que frecuentemente aparecen asociadas con diferentes estados fisiológicos de las plantas sanas (Kombrink y col., 1993).

Por último, la reacción hipersensible frente a TMV en las hojas de plantas de pimiento induce también la síntesis de una proteína de 23 kDa que posee tres isoformas de pI 6,1, 6,2 y 6,4, las cuales se detectan con un suero frente a la P23, que es una PR básica del grupo 5, la cual se acumula en las vacuolas de las células de las plantas de tomate infectadas con el viroide CEVd (Rodrigo y col., 1991). En las plantas sanas de pimiento no se detecta la expresión constitutiva de esta proteína al igual que ocurre en las plantas de tomate (Rodrigo y col., 1993). La alta homología de secuencia aminoacídica existente entre las PRs neutras y básicas de este grupo hace que haya una estrecha relación serológica entre estas proteínas (Heitz y col., 1994). Si bien la proteína identificada en las plantas de pimiento reacciona con el suero frente a la P23, el pI de las isoformas halladas apunta la posibilidad de que esta proteína este más relacionada con las proteínas neutras PR-R y PR-S identificadas en las plantas de tabaco Samsun NN (Kauffmann y col., 1990), que con la P23, por lo que en este caso sería una proteína de localización apoplástica y no vacuolar (Dore y col., 1991).

CAPÍTULO II

ACUMULACIÓN LOCAL Y SISTÉMICA DE PRs EN PLANTAS DE *Capsicum annuum* PORTADORAS DEL GEN DE RESISTENCIA L¹ TRAS LA INFECCIÓN POR TMV Y PMMoV-S. POSIBLE RELACIÓN CON LA RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA (SAR).

II.1. INTRODUCCIÓN.

La reacción hipersensible inducida en las hojas de algunas plantas en respuesta a la infección con determinados patógenos viene acompañada de una serie de cambios metabólicos, entre los cuales cabe destacar la síntesis de un conjunto de proteínas que reciben el nombre genérico de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) (Van Loon y Van Kammen, 1970; Gianinazzi y col., 1970). La inducción y acumulación de estas proteínas es un fenómeno relacionado con la interacción incompatible entre un huésped y un parásito, si bien en algunas interacciones compatibles se ha observado también la inducción tardía de algunas de estas proteínas, las cuales se acumulan en menor cantidad que en las interacciones incompatibles (Revisiones en Van Loon, 1985; Bol y col., 1990; Linhorst, 1991). Algunas de estas proteínas poseen funciones antifúngicas y enzimáticas, tales como β -1,3-glucanasas y quitinasas (Kauffman y col., 1978; Legrand y col., 1987). Sin embargo, la función y el modo de actuación de estas proteínas en los mecanismos de resistencia desencadenados durante la reacción incompatible es desconocida (Stintzi y col., 1993a).

Asociada a la reacción hipersensible se induce en las hojas superiores de plantas de tabaco un estado de resistencia que se ha denominado resistencia sistémica adquirida (SAR), caracterizada por una disminución del número y/o tamaño de las lesiones locales necróticas producidas por una inoculación posterior con el mismo patógeno o patógenos diferentes (Ross, 1961b; Dean y Kuc, 1985). Esta forma de resistencia se ha descrito en numerosos huéspedes asociada no solo a la reacción hipersensible debida a virus, hongos o bacterias, sino también al tratamiento de las plantas con agentes químicos (Revisiones en White y Antoniwi, 1991; Ryals y col., 1994; Kessmann y col., 1994). En las hojas superiores de las plantas de tabaco que reaccionan hipersensiblemente frente a TMV, junto a la inducción de SAR, se activan de forma coordinada al menos nueve familias de genes a los que colectivamente se denominan "genes SAR". Algunos de estos genes corresponden a PRs descritas en tabaco con anterioridad (Ward y col., 1991).

Algunas de estas PRs han sido identificadas y caracterizadas por nosotros

en las plantas de *C. annuum* cv Dulce Italiano de genotipo L¹L¹, inducidas durante la reacción hipersensible frente a TMV, tal y como hemos visto en el capítulo I de esta tesis. En el presente capítulo se estudia la inducción diferencial de estas proteínas en las hojas inoculadas y superiores de plantas de *C. annuum* cv Dulce Italiano de genotipo L¹L¹ durante la reacción incompatible frente a TMV y la reacción compatible frente a PMMoV-S, y por otra parte se estudia en las hojas superiores de estas plantas la inducción de SAR y la posible relación con la inducción de PRs en estas hojas.

II.2. MATERIALES Y MÉTODOS

II.2.1. PLANTAS Y VIRUS

Se utilizaron plantas de *Capsicum annuum* L. cv. "Dulce Italiano" con el gen de resistencia L¹L¹ frente al virus del mosaico del tabaco (TMV) y que se infectan de forma sistémica por la estirpe española del virus del moteado suave del pimiento (PMMoV-S). Las semillas se germinaron y las plantas fueron mantenidas en cámaras de cultivo a una temperatura de 25 °C con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad y una intensidad lumínica de 10.000 lux.

La estirpe U1 de TMV fue cedida por el Dr. F. García-Arenal (ETSIA, Madrid), mientras que la estirpe S de PMMoV fue aislada en nuestro laboratorio a partir de plantas de pimiento de la variedad Bel Amy cultivadas bajo plástico en la provincia de Almería (Alonso y col. 1989). Ambos virus fueron propagados y purificados a partir de hojas de *N. clevelandii* Gray infectadas sistémicamente, siguiendo el método descrito en García-Luque y col. (1990) tal y como se describe en apartado I.2.2.

Para el estudio de la inducción de PRs, las plantas fueron inoculadas en dos hojas completamente expandidas con una solución de TMV o PMMoV-S a la concentración de 10 µg/ml en tampón de inoculación¹. Las plantas utilizadas como controles fueron inoculadas bien solo con el tampón o bien no fueron inoculadas.

Las plantas en las que se realizó un estudio de la resistencia sistémica adquirida (SAR) fueron *dóblemente inoculadas*: una primera inoculación "inductora" (I.I.) sobre las dos primeras hojas completamente expandidas, con 1 ó 10 µg de TMV purificado por ml de tampón de inoculación y a los 7 d.p.i. una segunda inoculación "desafiante" (Ch.I.) sobre las dos hojas del piso foliar inmediatamente superior, con una concentración de virus de 1 µg/ml de TMV o PMMoV-S. Las plantas utilizadas como control fueron inoculadas con tampón en la inoculación inductora.

¹ Tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7

II.2.2 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

Las hojas inoculadas y las hojas superiores de las plantas fueron recogidas a los 3 y 12 d.p.i. respectivamente. Las proteínas fueron extraídas según el método descrito por Tobias y col. (1989) con las modificaciones descritas en el apartado I.2.3.

La cantidad de proteínas extraídas fue cuantificada por el método de Bradford utilizando el reactivo coloreado de Bio-Rad y seroalbúmina bovina como patrón (Bradford, 1976).

II.2.3. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE).

Los extractos de proteínas fueron analizados en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) según el método descrito por Laemmli (1970), tal y como se describe en el apartado I.2.4.

Las bandas de proteínas fueron visualizadas por tinción con plata según el método descrito por Morrissey (1981).

II.2.4. ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A FILTROS DE NITROCELULOSA.

Las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron electrotransferidas a filtros de nitrocelulosa siguiendo el método de Towbin y col. (1979). La transferencia se realizó en tampón Tris-glicina² a una intensidad de corriente constante de 250 mA y durante 4 h.

La efectividad de la transferencia se observó tiñendo los filtros con rojo Ponceau³, la tinción es reversible y se elimina con tampón de transferencia.

² Tris base ... 25 mM
Glicina 192 mM
Metanol 20%
SDS 0,1%

³ Rojo Ponceau 0.2%
TCA 3%

II.2.5. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS SOBRE FILTROS DE NITROCELULOSA.

Los filtros de nitrocelulosa, con las proteínas fijadas, fueron sumergidos en una solución bloqueante⁴ durante 2 h previamente a la incubación con los distintos inmunosueros específicos de las proteínas PRs, p14, P23, P29, P35 y P36 aisladas de plantas de tomate y PRQ y chi32,34 aisladas de plantas de tabaco, cuyas especificidades se recogen en la tabla 1 del capítulo I. Los sueros se emplearon a una dilución 1:100 en solución de bloqueo y la incubación se realizó a temperatura ambiente durante toda la noche. Tras varios lavados con PBS⁵ los anticuerpos unidos a las proteínas del filtro se detectaron con un segundo anticuerpo, específico de las IgG de conejo, conjugado con peroxidasa (GAR-PO). Este segundo anticuerpo se utilizó a la dilución 1:1000 en solución de bloqueo. La actividad enzimática unida al segundo anticuerpo se detectó mediante el sustrato 4-cloro-1-naftol⁶ cuya oxidación produce un compuesto coloreado insoluble que queda unido al enzima.

II.2.6. ISOELECTROENFOQUE (IEF) DE LAS PROTEÍNAS

Las proteínas de los extractos se separaron según su carga en geles del 5% de poli(acrilamida) (T=5%, C=3%) conteniendo ampholitos de un rango de pH entre 3.5 y 9.5 (Ampholine PAGplate, PHARMACIA). Debido a que el volumen máximo que se puede cargar en estos geles es de 20 μ l, 100 μ l de muestra se concentraron hasta este volumen en un secador a vacío Speed-Vac. La electroforesis se realizó en una unidad Multiphor II de PHARMACIA a una intensidad de corriente constante de 50 mA durante 1.5 h. Las soluciones de los

⁴ PO₄HNa₂ 8 mM
PO₄H₂Na 2 mM
ClNa 150 MM
Leche desnatada en polvo 5%
pH 7,2

⁵ PO₄HNa₂ 8 mM
PO₄H₂Na 2 mM
ClNa 150 MM
pH 7,2

⁶ 3,3 ml 4-cloro-1-naftol 0.3% en metanol
10 μ l H₂O₂ 30%
PBS hasta 50 ml

electrodos eran distintas para el ánodo y el cátodo⁷.

II.2.7. DETECCIÓN DE ACTIVIDAD DE ISOENZIMAS β -1,3-GLUCANASAS SOBRE GELES DE IEF.

Empleamos un método descrito por Pan y col. (1989) para ensayar la actividad de isoenzimas β -1,3-glucanasas (EC 1.3.2. 39) directamente sobre los geles de isoelectroenfoque (IEF), basado en la reacción del compuesto 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride⁸ (2,3,5-TPTZC) con los azúcares reductores liberados del sustrato laminarina⁹ por la actividad β -1,3-glucanasa. La reacción produce un compuesto coloreado, de forma que las isoenzimas se detectan como zonas rosas sobre el gel.

II.2.8. DETECCIÓN DE ACTIVIDAD DE ISOENZIMAS QUITININASAS SOBRE GELES DE IEF.

La actividad de isoenzimas quitinasas en los geles de IEF se detectó mediante el método descrito por Pan y col. (1991), en geles del 7,5% de poliacrilamida¹⁰ conteniendo el sustrato glicol quitina, con los cuales se cubrían los geles de IEF. Previamente a la incubación, los geles de IEF se equilibraron en acetato sódico 0.1 M, pH 5.0 durante 5 min. Tras 1 h y 30 min de incubación, las isoenzimas fueron visualizadas como zonas no fluorescentes cuando se exponían los geles a la luz UV, después de haber sido teñidos con el reactivo fluorescente

⁷ Solución del Anodo : H_3PO_4 1M
Solución del Cátodo: NaOH 1M

⁸ NaOH 1M
2,3,5-TPTZC ... 1,5%

⁹ Acetato potásico 25 mM, pH 5.0
Laminarina ... 0.7%

¹⁰ Acetato sódico ... 0,2 M, pH 5,0
Acrilamida 7,3%
Bisacrilamida ... 0,2%
Glicol quitina ... 0,05%
Persulfato 0,05%
TEMED 0,05%

Calcofluor¹¹

La síntesis de glicol quitina se realizó por acetilación del glicol quitosán según el método descrito por Trudel y Asselin (1989).

II.2.9. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA

Se recogieron muestras de las hojas inoculadas con TMV y PMMoV-S (Ch.I.) a los 3 d.p.i. y de las hojas superiores de las plantas inoculadas con PMMoV-S (Ch.I.) a los 12 d.p.i., para cuantificar por ELISA la cantidad de virus presente en estas hojas. El sistema de detección y cuantificación por ELISA de los distintos patotipos de los tobamovirus que infectan plantas de pimiento fue puesto a punto por nosotros tal y como se describe en los apartados III.2.3. y IV.2.3.

Por otro lado en las hojas inoculadas con TMV (Ch.I.) se cuantificó el número y se midió el tamaño de las lesiones locales necróticas inducidas a los 3 días posteriores a la inoculación con este virus.

¹¹ Tris ClH 0,5 M, pH 8,9
Calcofluor blanco M2R 0,01%

II.3. RESULTADOS.

II.3.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DE LAS HOJAS INOCULADAS Y DE LAS HOJAS SUPERIORES DE PLANTAS DE *C. annuum* (L¹L¹) INOCULADAS CON TMV, PMMoV-S Y TAMPÓN.

La cantidad de proteínas estimada por el método de Bradford de los extractos de hojas inoculadas y hojas superiores de plantas de *C. annuum* (L¹L¹) inoculadas con TMV, PMMoV-S y tampón se recoge en la Tabla 1.

Tabla 1. Cantidad de proteínas totales en los extractos de hojas de plantas de *C. annuum* L¹L¹ inoculadas con TMV, PMMoV-S o tampón.

| EXTRACTO | INÓCULO | CANTIDAD DE PROTEÍNAS |
|------------------|---------|-----------------------|
| HOJAS INOCULADAS | TMV | 800 µg/ml |
| | PMMoV-S | 320 µg/ml |
| | TAMPÓN | 280 µg/ml |
| HOJAS SUPERIORES | TMV | 240 µg/ml |
| | PMMoV-S | 480 µg/ml |
| | TAMPÓN | 270 µg/ml |

En las hojas inoculadas con TMV y PMMoV-S y en las hojas superiores de las plantas infectadas con PMMoV-S, una parte importante de la cantidad de proteínas estimadas corresponde a la proteína de la cápsida del virus.

II.3.2. ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).

El análisis electroforético (SDS-PAGE) de los extractos proteicos de las hojas inoculadas con TMV, nos permitió la identificación de diferentes PRs pertenecientes a los cinco grupos descritos en tabaco, tal y como hemos descrito

en el capítulo 1. En las hojas inoculadas con PMMoV-S (Fig. 1A, carril 3), se observó también un número de bandas de proteínas mayor que en las hojas inoculadas con tampón (Fig. 1A, carril 1), pero menor que en las inoculadas con TMV (Fig. 1A, carril 2). Estos resultados fueron diferentes a los obtenidos cuando se analizaron electroforéticamente los extractos procedentes de las hojas superiores de las plantas inoculadas con tampón, TMV y PMMoV-S (Fig. 2A, carriles 1, 2 y 3), ya que en estas hojas el mayor número de bandas proteicas se observó en las infectadas por PMMoV-S.

II.3.3. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS CON INMUNOSUEROS ESPECÍFICOS DE PRs.

Las proteínas separadas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y electrotransferidas a filtros de nitrocelulosa, se incubaron con los distintos sueros frente a las PRs, p14, P23, P29, P35, P36, PRQ y chi 32,34. Los resultados obtenidos en los diferentes extractos de hojas de plantas infectadas y sanas se pueden observar en las figuras 1 y 2 y se resumen en la Tabla 2.

En los extractos proteicos de las hojas inoculadas con TMV (Fig. 1B-G, carril 2), se detectaron diferentes proteínas que reaccionan con cada uno de estos sueros. Una banda intensa, correspondiente a una proteína de unos 16 kDa (p16), reaccionó con el suero frente a la p14 (Fig. 1B). Frente a los sueros específicos de las β -1,3-glucanasas de plantas de tomate P29 y P35, reaccionaron diferentes bandas con distintos pesos moleculares a las que denominamos p30, p34 y p40 (Fig. 1C y 1D). Sin embargo, con el inmunosuero de la P36 reaccionó una única proteína (p36) de 36 kDa (Fig. 1E). El inmunosuero específico de la PRQ de tabaco reconocía varias proteínas de pesos moleculares entre 28 y 32 kDa (p28, p29, p31 y p32) (Fig. 1G), mientras que el inmunosuero específico de la chi32,34 de tabaco reaccionó con una única proteína de 32 kDa (Fig. 1F). En los extractos de las hojas inoculadas con PMMoV-S y tampón (Fig. 1B-G, carriles 3 y 1 respectivamente), tan solo se identificaron algunas bandas de proteínas que reaccionaban con los inmunosueros específicos de las proteínas P29 y P35. Si bien, frente a este último solo reaccionaron proteínas de peso molecular superior a 35 kDa (Fig. 1C y 1D). Por último, con el inmunosuero de la proteína P23 reaccionó de forma tenue, una

Fig. 1. A.- Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5% (SDS-PAGE) de los extractos proteicos obtenidos a los 3 d.p.i. de hojas de *Capsicum annuum* cv *Dulce Italiano L¹L¹* inoculadas con tampón de inoculación (Carril **1**), TMV (Carril **2**) y con PMMoV-S (Carril **3**). A la izquierda de la figura se indican los pesos moleculares de los marcadores en kDa. Las bandas de proteínas se visualizaron tiñéndolas con plata.

B-G.- Inmunodetección sobre filtros de nitrocelulosa de los extractos proteicos separados por SDS-PAGE, obtenidos a los 3 d.p.i. de hojas de plantas de *Capsicum annuum* cv *Dulce Italiano L¹L¹* inoculadas con tampón de inoculación (Carril **1**), TMV (Carril **2**) y con PMMoV S (Carril **3**). Los filtros se incubaron con los inmunosueros específicos de las proteínas, p14 y P23 (**B**), P29 (**C**), P35 (**D**), P36 (**E**), chi32,34 (**F**) y PRO (**G**). Las flechas señalan las bandas detectadas con un peso molecular semejante al de la proteína del inmunosuero específico correspondiente.

kDa

92.5 —

66.2 —

45.0 —

31.0 —

21.5 —

14.4 —

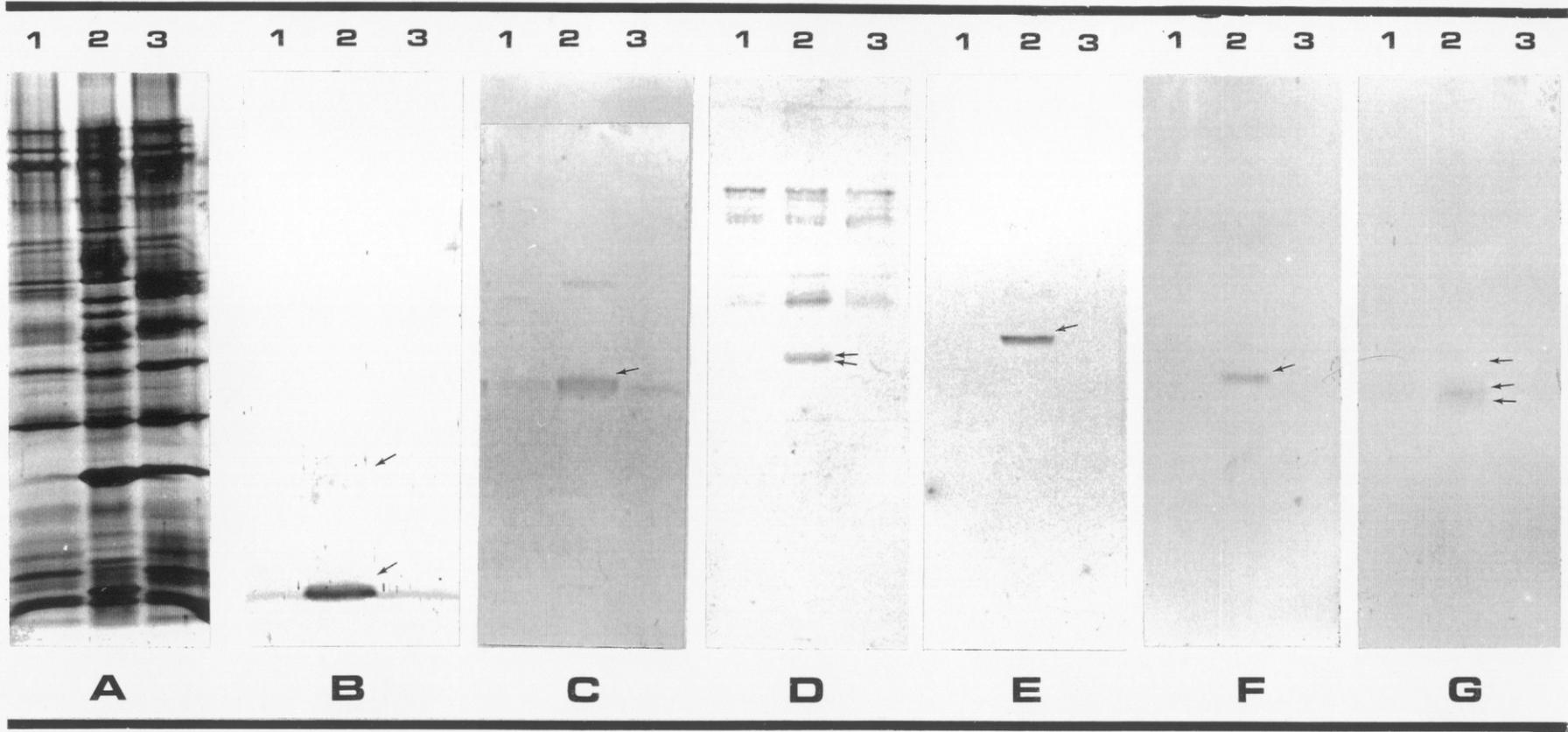


FIG.1

banda de proteína de 23 kDa presente tanto en los extractos de las hojas inoculadas con TMV y PMMoV-S (Fig. 1B, carriles 2 y 3), como en las hojas inoculadas con tampón (Fig. 1B, carril 1).

Tabla 2. Proteínas PRs y actividades enzimáticas detectadas en los extractos proteicos de hojas de plantas de *C. annuum* L'L' inoculadas con TMV, PMMoV-S o en hojas de plantas sanas.

| PRs | TMV H.I. | PMMoV-S H.I. | TMV H.S. | PMMoV-S H.S. | PLANTA SANA |
|----------------------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|----------------|
| <u>Grupo 1</u> | | | | | |
| p16 | ++ | +/- | +/- | ++ | +/- |
| <u>Grupo 2</u> | | | | | |
| PRs Ácidas ^(a) | ++ | + | + | ++ | +/- |
| PRs Básicas ^(a) | ++ | + | +/- | +/- | +/- |
| p30 | ++ | +/- | +/- | +/- | +/- |
| p34 | ++ | - | +/- | +/- | - |
| p36 | ++ | - | - | - | - |
| p40 | ++ | +/- | +/- | +/- | +/- |
| <u>Grupo 3</u> | | | | | |
| PRs Ácidas ^(a) | ++ | ++ | + | ++ | + |
| PRs Básicas ^(a) | + | +/- | - | - | - |
| p28 | ++ | - | - | + | - |
| p29 | ++ | - | - | + | - |
| p31 | ++ | - | - | - | - |
| p32 | ++ | - | - | - | - |
| <u>Grupo 4</u> | | | | | |
| p13 ^(b) | ++ | - | ++ | | - |
| <u>Grupo 5</u> | | | | | |
| p23 | +/- | +/- | - | | +/- |

(a) Actividad enzimática en geles de IEF. (H.I.) Hojas inoculadas. (H.S.) Hojas superiores. (++) Inducción o actividad enzimática fuerte. (+) Inducción o actividad enzimática suave. (+/-) Inducción constitutiva o actividad muy baja. (-) Inducción o actividad enzimática no detectadas.

(b) Esta proteína no reaccionó con ninguno de los sueros ensayados, y solo se detectó en electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Fig. 2. A.- Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5% (SDS-PAGE) de los extractos proteicos obtenidos a los 12 d.p.i. de hojas superiores de plantas de *Capsicum annuum* cv Dulce Italiano L¹L¹, inoculadas con tampón de inoculación (Carril 1), TMV (Carril 2) y con PMMoV-S (Carril 3). A la izquierda de la figura se indican los pesos moleculares de los marcadores en kDa. Las bandas de proteínas se visualizaron tiñéndolas con plata.

B-G.- Inmunodetección sobre filtros de nitrocelulosa de los extractos proteicos separados por SDS-PAGE, obtenidos a los 12 d.p.i. de hojas superiores de plantas de *Capsicum annuum* cv Dulce Italiano L¹L¹ inoculadas con tampón de inoculación (Carril 1), TMV (Carril 2) y con PMMoV-S (Carril 3). Los filtros se incubaron con los inmunosueros específicos de las proteínas, p14 y P23 (B), P29 (C), P35 (D), P36 (E), chi32,34 (F) y PRO (G). Las flechas señalan las bandas detectadas con un peso molecular semejante al de la proteína del inmunosero específico correspondiente.

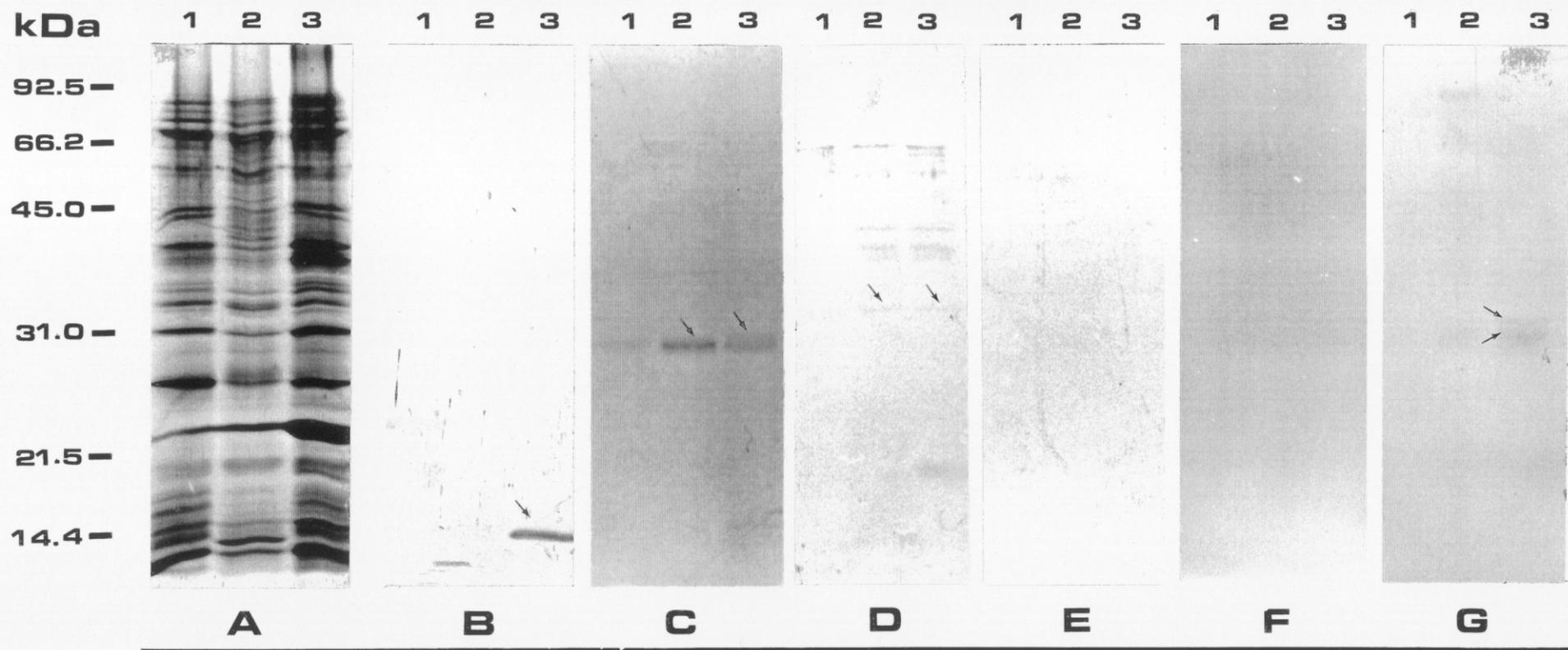


FIG. 2

Estos resultados fueron diferentes cuando se analizaron los extractos de las hojas superiores de las plantas inoculadas con tampón, TMV y PMMoV-S (Fig. 2B-G, carriles 1, 2 y 3 respectivamente). Así, en las hojas superiores de plantas inoculadas con TMV tan solo se identificaron bandas de proteínas que reaccionaron con el suero frente a la P29 y muy tenuemente con el suero frente a la P35 (Fig. 2 C y D). Por otro lado, en las hojas infectadas con PMMoV-S se identificaron, además de estas mismas bandas de proteínas, una banda intensa que reaccionó con el suero frente a la p14 (Fig 2B) y una doble banda que reaccionó con el suero frente a la PRQ (Fig 2G). Ninguna proteína reaccionó con los sueros frente a la P23, P36 y chi 32 en los extractos de las hojas superiores de las plantas de pimiento infectadas o sanas.

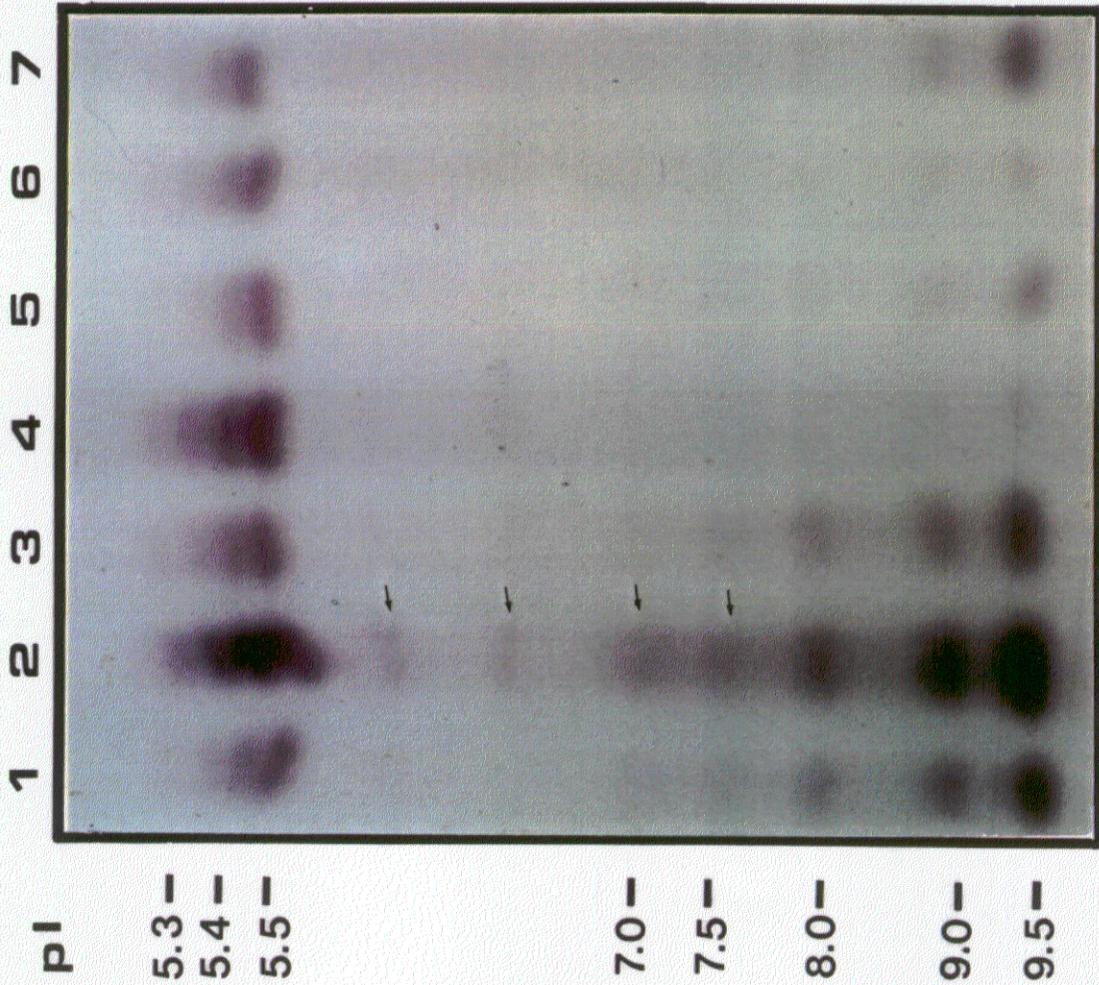
II.3.4. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE ISOENZIMAS β -1,3-GLUCANASAS Y QUITINASAS.

El análisis de la actividad β -1,3-glucanasa (EC 1.3.2.39) sobre geles de IEF de extractos de las hojas inoculadas y superiores de plantas de pimiento inoculadas con TMV, PMMoV-S y tampón y de plantas no inoculadas, permitió identificar isoenzimas ácidas y básicas en todos los extractos analizados (Fig. 3A). El mayor número de isoenzimas se detectó en las hojas inoculadas con TMV (Fig. 3A, carril 2), donde se activaron formas ácidas de pI comprendido entre 5 y 6, formas básicas de pI comprendidos entre 9,5 y 8 y también formas neutras de pH 7,5 a 7. Algunas de estas isoenzimas se detectaron también en los extractos de las hojas inoculadas con PMMoV-S y con tampón (Fig. 3A, carril 1 y 3, respectivamente).

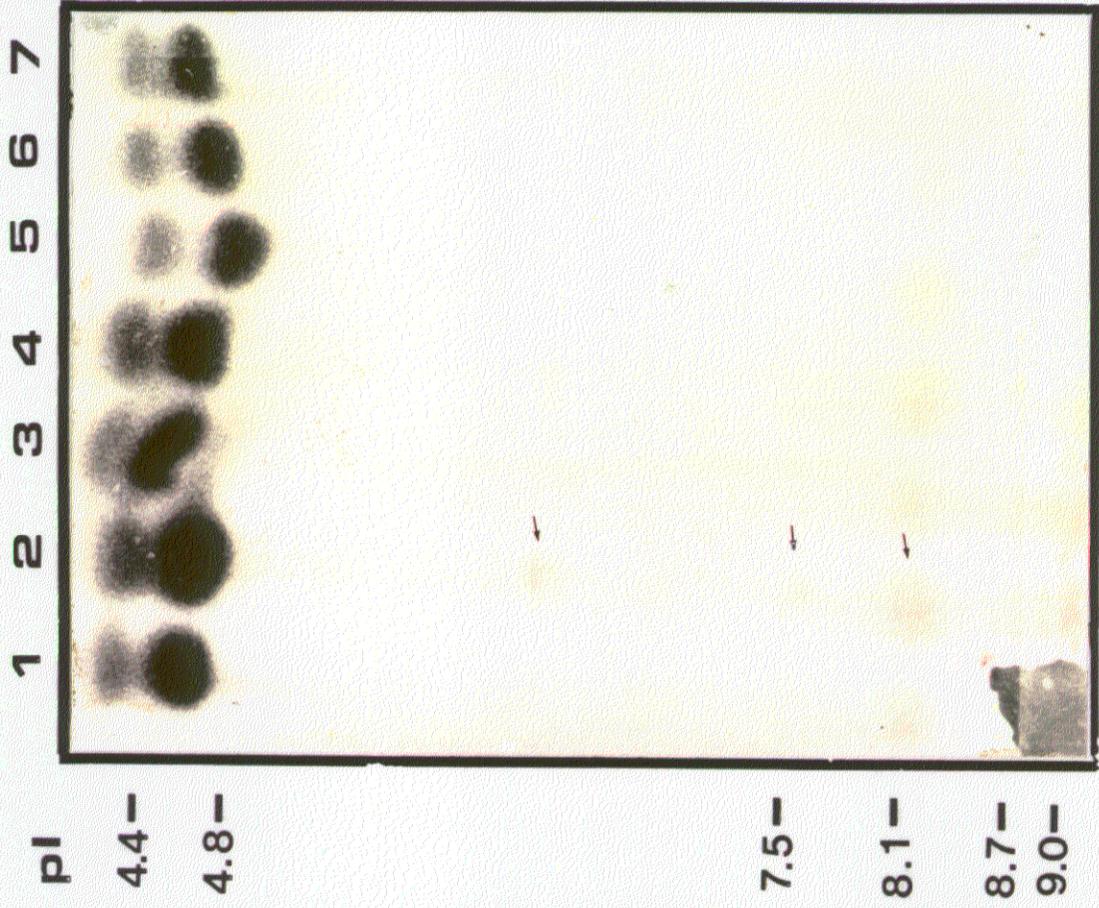
En todos los extractos de hojas superiores analizados (Fig. 3A, carriles 4, 5 y 6), la actividad de las isoformas básicas fue en general muy inferior a la detectada en los extractos de hojas inoculadas (carriles 1, 2 y 3). Por otro lado la actividad de isoenzimas ácidas en los extractos de hojas superiores fue mayor en las plantas inoculadas con PMMoV-S (Fig 3A, carril 4) que en las inoculadas con TMV (carril 5) o tampón (carril 6).

Al analizar la actividad de isoenzimas quitinasas (EC 3.2.1.14), en todos los extractos de hojas inoculadas (Fig. 3B, carriles 1, 2 y 3), y de hojas superiores (Fig. 3B, carriles 4, 5 y 6), se detectaron diferentes isoformas ácidas de pI entre

Fig. 3. Actividades β -1,3-glucanasa (**A**) y quitinasa (**B**) de los extractos proteicos, separados en geles de IEF, obtenidos a los 3 d.p.i. de hojas inoculadas (carriles 1, 2 y 3) y a los 12 d.p.i. de hojas superiores (carriles 4, 5 y 6) de plantas de *Capsicum annuum* cv Dulce Italiano L¹L¹, inoculadas con PMMoV-S (carriles 1 y 4), TMV (carriles 2 y 5) o con tampón de inoculación (carriles 3 y 6). El carril 7 corresponde a los extractos proteicos procedentes de hojas de plantas no inoculadas. A la izquierda de cada figura se indica el punto isoeléctrico medido directamente sobre el gel con un electrodo.



A



B

FIG. 3

4 y 5. Por otra parte, diferentes isoformas básicas de pI comprendido entre 9 y 7,5 se detectaron de forma tenue, principalmente en las hojas inoculadas con TMV (Fig. 3B, carril 2).

II.3.5. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA.

Hemos analizado la resistencia sistémica adquirida (SAR) frente a TMV y PMMoV-S en plantas de *Capsicum annuum* genotipo L¹L¹. La resistencia sistémica adquirida frente a TMV se estudió analizando la disminución del número y reducción del tamaño de las lesiones locales necróticas inducidas a los 3 días posteriores a la inoculación desafiante (Ch.i.) con 1 μ g/ml de TMV, en las hojas superiores de plantas de pimiento, que 7 días antes se habían inducido con una inoculación (I.I.) con 1 ó 10 μ g/ml de TMV en las hojas inferiores. La cantidad de virus acumulada en las hojas se calculó cuantificando la cantidad de proteína de la cápsida viral mediante ELISA-DAS. Estos resultados se recogen en la Tabla 3.

La inoculación desafiante con 1 μ g/ml de TMV desencadena en las hojas superiores de las plantas de pimiento inducidas con 1 ó 10 μ g/ml de TMV un menor número de lesiones locales necróticas, así como una disminución del tamaño de éstas en comparación a las inducidas en las hojas de las plantas control cuya inoculación inductora se realizó solo con tampón de inoculación (Fig. 4). Ambos fenómenos son más patentes en las plantas que se inducen con la concentración mayor de TMV, siendo mayor la disminución del tamaño que la reducción en el número de las lesiones, pues las diferencias observadas en este caso con las plantas no inducidas no resultan significativas al realizar la t de Student. Por otro lado en ningún caso la cantidad de virus en las hojas inoculadas se vio afectada por las inoculaciones inductoras con TMV.

La resistencia sistémica adquirida frente PMMoV-S se estudió cuantificando por ELISA-DAS la cantidad de virus en las hojas inoculadas y en las hojas infectadas sistémicamente de plantas que previamente se habían inoculado con TMV como inductor de la resistencia. Los resultados de estos análisis se recogen en la Tabla 4. La cantidad de PMMoV-S acumulada, tanto en las hojas inoculadas como en las hojas superiores de plantas inducidas con TMV, es similar a la hallada en las hojas de plantas inducidas con tampón de inoculación. Por otra parte los

Fig. 4. Lesiones locales necróticas producidas por la inoculación "desafiante" con 1 $\mu\text{g/ml}$ de TMV sobre hojas de plantas de *C. annuum* que previamente habían sido inoculadas en las hojas inferiores con 10 $\mu\text{g/ml}$ de TMV (3) o con tampón (2), como inoculación "inductora". (1) Hoja de *C. annuum* sin inocular.

Tabla 3. Número y tamaño de las lesiones locales necróticas y cantidad de virus en hojas de plantas de *C. annuum* 3 d.p.i. con TMV. Las plantas se habían previamente inoculado con TMV o con tampón en las hojas inferiores.

| INOCULACION "INDUCTORA" | INOCULACION "DESAFIANTE" | L.N. NUMERO ⁽¹⁾ | L.N. TAMAÑO ⁽²⁾ | TMV CONCENTRACIÓN ⁽³⁾ |
|-------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| TAMPON | TMV 1 $\mu\text{g/ml}$ | 9,75 \pm 2,57 | 2,01 \pm 0,19 | 155 \pm 24 |
| TMV 1 $\mu\text{g/ml}$ | TMV 1 $\mu\text{g/ml}$ | 8,25 \pm 2,57 | 0,60 \pm 0,18 | 127 \pm 36 |
| TMV 10 $\mu\text{g/ml}$ | TMV 1 $\mu\text{g/ml}$ | 6,5 \pm 1,56 | 0,24 \pm 0,05 | 132 \pm 33 |

(1) Media \pm error estándar del número de lesiones contado en 20 hojas.

(2) $\text{mm}^2 \pm$ error estándar.

(3) ng virus/mg tejido \pm error estándar.

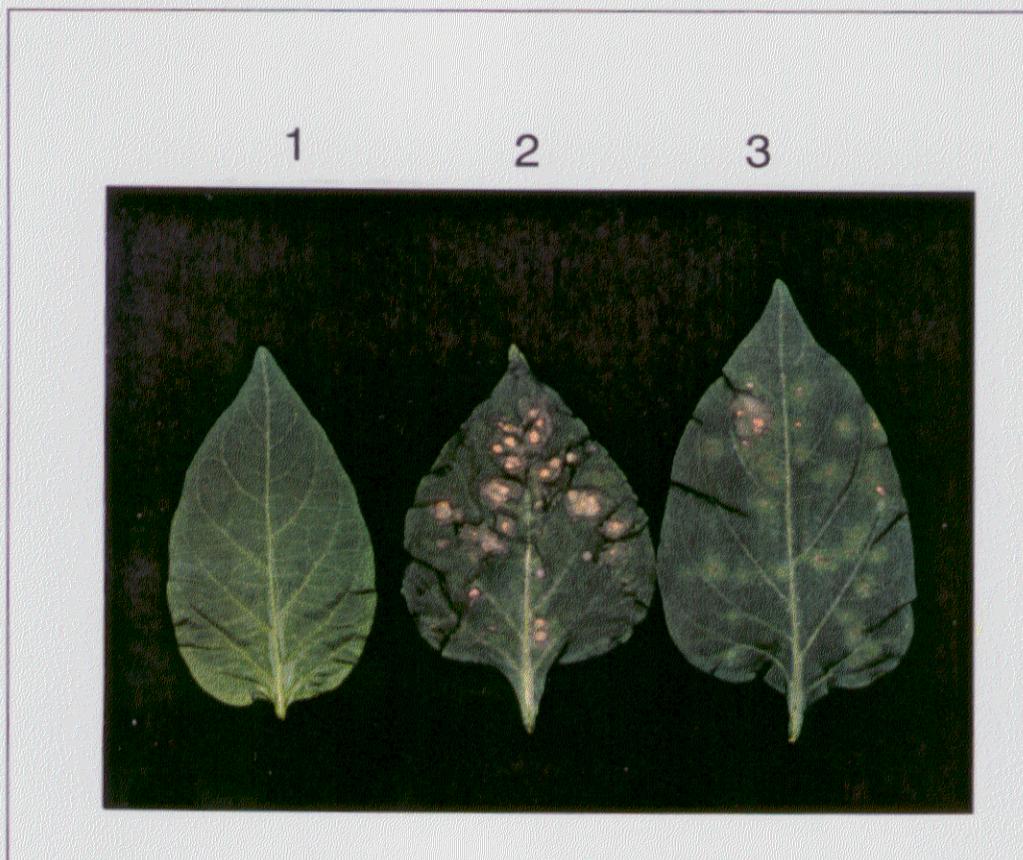


FIG. 4

síntomas producidos por PMMoV-S en las plantas inducidas con TMV fueron iguales a los producidos en las plantas inoculadas solo con tampón.

Tabla 4. Cantidad de PMMoV-S en las hojas inoculadas y superiores de plantas de *Capsicum annuum* L'L' a los 3 y 12 d.p.i. utilizando como inoculación desafiante PMMoV-S. Las plantas previamente se habían inoculado con TMV o tampón de inoculación como inoculación inductora.

| INOCULACIÓN "INDUCTORA" | INOCULACIÓN "DESAFIANTE" | HOJA INOCULADA ⁽¹⁾ 3 d.p.i. | HOJA SUPERIOR ⁽¹⁾ 12 d.p.i. |
|----------------------------|-----------------------------|---|---|
| TAMPÓN | PMMoV S 1 µg/ml | 31 ± 12 | 2675 ± 567 |
| TMV 1 µg/ml | PMMoV-S 1 µg/ml | 27 ± 11 | 2783 ± 675 |
| TMV 10 µg/ml | PMMoV-S 1 µg/ml | 29 ± 14 | 2689 ± 634 |

(1) ng virus/mg tejido ± error estándar

II.4. DISCUSIÓN

La reacción hipersensible (HR) inducida por TMV en las hojas inoculadas de plantas de *C. annuum* con el genotipo L¹L¹ esta acompañada de la inducción y acumulación de PRs ácidas y básicas de los diferentes grupos descritos en tabaco. Algunas de estas proteínas no se inducen cuando las hojas se inoculan con PMMoV-S, que es un virus que rompe la resistencia conferida por este gen, no produce lesiones locales necróticas e infecta sistémicamente estas plantas. Un resultado similar se obtiene al inocular plantas de pimiento portadoras del gen L¹ con distintos tobamovirus en las que también se observa una mayor acumulación de proteínas PR en las hojas inoculadas con virus que inducen HR que con virus causantes de infección sistémica (Tobias y col., 1989). En los diferentes sistemas patógeno-huésped en los que se han estudiado las PRs, la interacción con patógenos incompatibles causantes de HR se ha mostrado que esta asociada a la inducción y acumulación de estas proteínas en las hojas inoculadas de la planta huésped (Bol y col., 1990; Linthorst, 1991). Sin embargo en algunas interacciones compatibles planta/patógeno, principalmente hongos, se observa también la inducción de proteínas PR, tal y como ocurre en las hojas de plantas de tabaco infiltradas con aislados compatibles e incompatibles de *Pseudomonas solanacearum* (Godiard, y col., 1990) o de *Cladosporium fulvum* (Van Kan y col., 1992). La acumulación de estas proteínas parece que no es suficiente para desencadenar las lesiones necróticas asociadas a la HR, algo que se deduce de la expresión constitutiva de algunas de estas proteínas en plantas de tabaco transgénicas en las cuales no se observan lesiones locales necróticas (Linthorst y col., 1989). Sin embargo debido a la localización de estas proteínas en el anillo de células que rodea los puntos de infección (Jung y Hahne, 1992), si podrían jugar un importante papel en la localización del virus en la zona que bordea las lesiones, tal y como se demuestra en un mutante de *Arabidopsis thaliana* incapaz de expresar PRs, y en el cual la inoculación con la bacteria *Pseudomonas syringae*, que es un patógeno incompatible, produce unas lesiones mayores y más difusas que las producidas en las plantas que sí expresan PRs (Cao y col., 1994).

La inducción sistémica de PRs en una reacción incompatible se ha

demostrado en plantas de tabaco con el gen N inoculadas con TMV, en cuyas hojas superiores no infectadas se acumulan formas básicas y ácidas de PRs de los grupos 1, 2, 3 y 5, si bien lo hacen en menor cantidad que en las hojas inoculadas que responden con una HR en forma de lesiones necróticas (Heitz y col., 1994). Nuestros resultados muestran que en las hojas superiores de las plantas de pimiento inoculadas con TMV no hay la misma inducción de proteínas PRs que en las hojas inoculadas, observándose que a los 12 d.p.i. se acumulan PRs del grupo 2, las cuales se inducen también, y con la misma intensidad, en las hojas de las plantas previamente inoculadas con tampón. Únicamente, la proteína p13 se induce de manera específica, tanto en las hojas inoculadas como en las hojas superiores de plantas inoculadas con TMV.

En las plantas de pimiento analizadas por nosotros la expresión constitutiva de PRs corresponde principalmente a isoformas ácidas de los grupos 2 y 3, tal y como ocurre en las plantas de pimiento cultivar Hanbyul infectadas con el hongo *Phytophthora capsici* (Kim y Hwang, 1994). Sin embargo, la expresión constitutiva de PRs en las plantas de tabaco corresponde principalmente a isoformas básicas de estos mismos grupos, y suele estar relacionada con fenómenos como la floración o el envejecimiento de las plantas (Wyatt y col., 1991; Van de Rhee y col., 1993).

La infección sistémica de las plantas de pimiento con PMMoV-S induce en las hojas superiores PRs de los grupos 1, 2 y 3 en mayor cantidad que en las hojas superiores de las plantas inoculadas con TMV. Son pocos los casos descritos de plantas en las que se inducen y acumulan PRs en respuesta a una infección sistémica por un virus, pero es precisamente en plantas de *C. annuum* infectadas sistémicamente por la estirpe SL de TMV donde mejor se ha observado este fenómeno (Tobias y col., 1989). Estos resultados y los obtenidos por nosotros, nos indican que en las plantas de pimiento la inducción y acumulación de PRs está relacionada no solo con la HR sino también con la infección del virus y/o con la inducción de síntomas en las hojas superiores. En este sentido, la proteína PR del grupo 1 p16 está claramente asociada a la infección viral pues es la proteína que con mayor intensidad se detecta en las hojas infectadas sistémicamente con PMMoV-S. Esta proteína está serológicamente relacionada con la p14 que se induce en plantas de tomate en respuesta a la infección por el viroide CEVd y que

parece estar implicada en la degeneración celular provocada tanto por actividades naturales, resultado de los diferentes acontecimientos del ciclo biológico de las plantas, como por agentes externos como la infección por un patógeno (Vera y col., 1988).

Las proteínas PR del grupo 2 poseen actividad β -1,3-glucanasas, existiendo en las plantas de pimiento isoformas ácidas y básicas de estas proteínas tal y como se puede ver en los geles de IEF. La mayor actividad de las isoformas ácidas se detecta en las hojas inoculadas con TMV y en las hojas infectadas de forma sistémica con PMMoV-S. Si bien, en las hojas superiores de las plantas de pimiento inoculadas con TMV, la actividad es algo mayor que la detectada en los controles, lo que podría estar relacionado con el hecho de que en las plantas inoculadas a diferencia de lo que ocurre en las plantas sanas, se detecta la PR p34 que es una proteína con isoformas ácidas (p34a) y básicas (p34b), tal y como vimos en el capítulo 1. Sin embargo, la activación de las isoformas básicas ocurre principalmente en las hojas inoculadas con ambos virus y con el tampón de inoculación y no en las hojas superiores. De igual forma, en las plantas de tabaco Samsun NN la inoculación con TMV induce en las hojas inoculadas más isoformas ácidas que básicas de las PRs del grupo 2, mientras que en las hojas superiores solo se inducen las isoformas ácidas (Brederode y col., 1991). Estos resultados parecen indicar que estas isoformas básicas están relacionadas con mecanismos de stress muy genéricos en los que se incluirían las lesiones producidas por la inoculación, mientras que la activación de las isoformas ácidas estaría más relacionada con la infección viral, fundamentalmente con la HR frente a TMV. Si bien, en las plantas de pimiento no podemos descartar su relación con la infección sistémica de PMMoV-S, ya que existe también una cierta inducción de estas isoformas en las hojas infectadas sistémicamente por este virus.

Las PRs del grupo 3 tienen actividad quitinasa, existiendo también isoformas ácidas y básicas de estas enzimas en las plantas de pimiento. La mayor actividad corresponde a las isoformas ácidas, las cuales se detectan también en las plantas control, mientras que las isoformas básicas poseen muy baja actividad y se detectan fundamentalmente en las hojas inoculadas con TMV. Sin embargo, al detectarse también en las hojas inoculadas con tampón de inoculación, estas isoformas básicas podrían ser inducidas en respuesta a las lesiones de inoculación,

tal y como ocurre en las plantas de tabaco donde estas proteínas se inducen como consecuencia de las heridas producidas en las hojas con un escalpelo (Brederode y col., 1991).

La inoculación con TMV de las hojas inferiores de plantas de pimiento induce, en las hojas superiores de estas plantas, resistencia sistémica adquirida (SAR) que se manifiesta como una reducción en el número y tamaño de las lesiones locales necróticas producidas en estas hojas tras la inoculación de nuevo con TMV. Esta reducción del tamaño de las lesiones locales necróticas no viene acompañada de una disminución en la cantidad de antígeno viral acumulado en estas hojas. Por otra parte la inducción de SAR en las plantas de pimiento no es efectiva frente a la infección por PMMoV-S, no observándose atenuación de los síntomas sistémicos producidos por el virus, ni disminución en la cantidad de antígeno viral acumulado tanto en las hojas inoculadas como en las hojas superiores. Resultados similares a éstos se obtiene en las plantas de tabaco en las cuales la inducción de SAR por TMV se manifiesta como una reducción del tamaño de las lesiones necróticas pero no de la cantidad de antígeno viral acumulada en el interior de estas lesiones (Pennazio y Roggero, 1991a), y en las que esta forma de resistencia no es efectiva frente a virus que infectan sistémicamente las plantas (Pennazio y Roggero, 1988). La ausencia de correlación entre el tamaño de las lesiones y la acumulación de antígeno viral, así como el hecho de que de esta forma de resistencia no actúe frente a virus que infectan sistémicamente las plantas, sugiere que durante el proceso de SAR no actúa ningún inhibidor de la replicación viral, sino que ésta se debe más bien a una limitación en el movimiento célula a célula del virus, o bien a una atenuación de la respuesta de la planta frente al patógeno.

La posible relación entre las PRs y la inducción de SAR ha sido objeto de gran controversia. Para algunos autores esta relación no existe o al menos no se trata de una relación directa (Fraser, 1982; Ye y col., 1990). Sin embargo, en las plantas de tabaco con SAR inducida por TMV se produce la inducción y acumulación en las hojas superiores de mRNAs pertenecientes a nueve familias de genes de los diferentes grupos de PRs (Ward y col., 1991). Esta correlación entre la síntesis de PRs y la inducción de SAR se observa también en dos líneas de plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana*, una de las cuales presenta expresión

constituva de PRs acompañada de un estado permanente de SAR y otra en cuyas plantas no es posible inducir PRs y en las que no se observa SAR (Cao y col., 1994; Bowling y col., 1994).

En las hojas superiores de las plantas de pimiento con el gen L^1 donde se observa SAR frente a TMV, hemos comprobado que no hay una acumulación importante de PRs, tal y como ocurre en las plantas de *C. annuum* cvs. 357 con el genotipo L^3L^3 , en las cuales la inoculación con la estirpe Ob de TMV induce la acumulación de proteínas PR en estas hojas, pero no en las hojas superiores, donde la posterior inoculación con este mismo virus da como resultado una disminución del tamaño de las lesiones necróticas (Tobías y col., 1989). Estos resultados nos indican que en este huésped las PRs caracterizadas no son responsables *per se* de la resistencia inducida frente a TMV, sino más bien que la inducción de PRs y de SAR son el resultado de un mecanismo de resistencia general que en pimiento no presentan una expresión coordinada. Esto podría sugerir que el inductor de SAR no es el mismo que el inductor de PRs, si bien ambos fenómenos están asociados a la HR, ya que la inoculación con PMMoV-S que no induce reacción hipersensible tampoco induce SAR.

En conclusión nuestros resultados muestran que la inducción de proteínas PR esta relacionada con la reacción hipersensible desencadenada en las hojas inoculadas con TMV y con un mecanismo más generalizado de stress en el que se incluyen la infección sistémica por PMMoV-S, así como las lesiones producidas por la inoculación de los virus, si bien el mayor número y cantidad de PRs se induce en la respuesta hipersensible. Por otra parte, al menos en los tiempos analizados, el fenómeno de SAR observado en las hojas superiores no se puede atribuir a la acumulación de PRs en estas hojas, sino mas bien a la inducción de HR en las hojas inoculadas. Por ultimo el hecho de que esta forma de resistencia no sea eficaz frente a PMMoV-S hace necesario abordar otras formas de introducir en las plantas de pimiento resistencia estable frente a los diferentes tobamovirus que infectan esta plantas. En este sentido, la transformación de plantas de pimiento con genes quiméricos derivados del genoma viral abre un abanico de posibilidades realmente interesante para obtener resistencia frente a PMMoV-S en estas plantas.

CAPÍTULO III

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS DE *Nicotiana clevelandii* Gray
CON LA SECUENCIA COMPLETA DEL GEN DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA
DE PMMoV-S Y ANÁLISIS DE LA PROTECCIÓN FRENTE A LA INFECCIÓN POR
PMMoV-S.

III.1. INTRODUCCIÓN

La teoría de la "resistencia derivada del patógeno" expresada por Sanford y Johnston (1985) propone que determinadas secuencias génicas de origen viral insertadas en el genoma del huésped, y capaces de expresarse de forma constitutiva en éste, pueden dar lugar a una protección frente a la infección por los virus. El uso con este fin de secuencias codificadoras de las proteínas de la cápsida, abre la posibilidad de imitar en las células vegetales el fenómeno natural de protección cruzada observado por primera vez por McKinney (1929), según el cual, la infección de plantas con estirpes atenuadas de un virus protegía a éstas de una infección posterior con estirpes virulentas de este virus. El término "protección mediada por la proteína de la cápsida" (CPMP) se utiliza para referirse a la protección debida a la expresión de un gen quimérico de la proteína de la cápsida de un virus en una planta transgénica. De manera que, la acumulación de esta proteína en las células, confiere a la planta protección frente a la infección y/o al desarrollo de la enfermedad producida por el virus del cual procede dicha proteína, o frente a la infección por virus relacionados. En los últimos diez años, este tipo de protección ha sido descrita frente a virus que infectan plantas de doce familias diferentes, entre las que se encuentran algunas de gran interés económico como son, tabaco, tomate y patata (Revisiones en; Beachy y col., 1990; Fitchen y Beachy, 1993; Gonsalves y Slightom, 1993; Hackland y col., 1994).

El aislado español del virus del moteado suave del pimiento (PMMoV-S), pertenece al género Tobamovirus y causa una grave enfermedad que afecta a los cultivos bajo plástico de pimiento (Alonso y col., 1989; García-Luque y col., 1990). La transformación de plantas de pimiento con el gen de la proteína de la cápsida de PMMoV-S permitiría introducir en los cultivos de pimiento protección frente a la infección por este virus y por virus relacionados. Sin embargo, en la actualidad no existe un sistema de transformación de plantas de pimiento suficientemente eficaz como para abordar la transformación con genes virales (Liu y col., 1990; Arroyo y col., 1991 y 1993), por lo que hemos elegido para el estudio de la CPMP frente a PMMoV-S un sistema modelo de plantas de *Nicotiana clevelandii* Gray, que constituye un huésped idóneo, pues a una mayor facilidad

para su transformación con genes quiméricos (Tavazza y col., 1988), une el hecho de ser junto a *N. bentamiana*, los únicos huéspedes del género *Nicotiana* susceptibles a la infección por PMMoV-S y por otros tobamovirus (Alonso y col., 1989).

En este capítulo se describe la construcción de un gen quimérico de la proteína de la cápsida de PMMoV-S, para la transformación de plantas de *N. clevelandii* y la posterior detección de la expresión constitutiva de dicha proteína en las plantas transgénicas de las generaciones R₀ y R₁. También se realiza un estudio sobre la protección frente a PMMoV-S en las plantas transgénicas, la acumulación de virus en estas plantas y la sintomatología que produce, en un intento por adquirir un mejor conocimiento sobre el mecanismo o mecanismos de actuación de la CPMP frente a este tobamovirus.

III.2. MATERIALES Y MÉTODOS

III.2.1. PLANTAS Y VIRUS.

Se han utilizado plantas de *Nicotiana clevelandii* Gray. Para su germinación, las semillas fueron sumergidas durante 24 horas en una solución 3 μM de ácido giberélico (GA_3), y posteriormente sembradas en tierra. Las plantas fueron mantenidas en cámaras de cultivo a una temperatura de 25 °C, 60% de humedad, con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad y una intensidad lumínica de 10.000 lux.

El virus del moteado suave del pimiento estirpe S (PMMoV-S) es un aislado español del PMMoV obtenido de plantas de pimiento infectadas, procedentes de cultivos de la región de Almería (Alonso y col., 1989). El virus se conservó en forma de desecado a 4 °C, y se propagó en plantas de *Nicotiana clevelandii* Gray.

III.2.2. PURIFICACIÓN DE PMMoV-S Y DEL RNA VIRAL.

El virus fue purificado a partir de plantas de *N. clevelandii*, a los 10 días posteriores a su inoculación (d.p.i.) con 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PMMoV-S, siguiendo el mismo método empleado en la purificación de TMV que se describe en el apartado I.2.2 de la presente tesis.

El RNA viral fue extraído de viriones purificados mediante dos extracciones con fenol-cloroformo, después de la disociación de las partículas virales a 100 °C durante 30 segundos en tampón disociador¹. El RNA fue precipitado² y posteriormente resuspendido en agua desionizada estéril.

Las concentraciones de virus y de RNA se calcularon tras la determinación del espectro de absorción, utilizándose valores de $E_{260,0.1\%} = 3$ para el virus y $E_{260,0.1\%} = 25$ para el RNA monocatenario.

¹ Tampón fosfato sódico 20 mM, pH=7.
SDS 0,5%

² Acetato sódico 0,3 M
Etanol 75%

III.2.3. PREPARACIÓN DE UN SUERO FRENTE A PMMoV-S: PURIFICACIÓN DE LAS IgG Y CONJUGACIÓN CON FOSFATASA ALCALINA.

El suero frente a PMMoV-S fue obtenido en conejos albinos de la raza Nueva Zelanda, mediante la siguiente pauta de inmunización: una inyección intravenosa con 0,5 mg de virus purificado en 1 ml de PBS³ y 3 inyecciones por vía subcutánea de 1 mg de virus emulsionado con adyuvante incompleto de Freund, a intervalos de 15 días. El inmunosuero se recogió a los 8 días de la última inmunización. La titulación del inmunosuero se realizó por doble inmunodifusión, según el método de Ouchterlony y Nilsson (1984), utilizando una concentración de virus de 3 mg/ml y diluciones crecientes del inmunosuero, .

Las inmunoglobulinas G (IgG) fueron purificadas a partir del inmunosuero, por medio de una columna de afinidad de Proteína-A Sepharosa CL 4B (Pharmacia) siguiendo las indicaciones de la firma proveedora. Los rendimientos de la purificación de inmunoglobulinas oscilaron entre 7 y 8 mg de IgG por ml de suero. Las IgG purificadas se marcaron con la enzima fosfatasa alcalina Type VII-T (Sigma) utilizando glutaraldehído como puente de unión (IgG-FA) (Avrameas, 1969; Clark y Adams, 1977).

III.2.4. ELISA-DAS (ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO-DOBLE SANDWICH DE ANTICUERPOS) PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PMMoV-S.

El soporte sólido que utilizamos como inmunoabsorbente consistió en microplacas de poliestireno de 96 pocillos (E.I.A./R.I.A. Plate, COSTAR). Los pocillos se tapizaron con las IgG frente a PMMoV-S, mediante incubación de 200 μ l de una dilución de las inmunoglobulinas en tampón carbonato⁴, durante 16 h a 4 °C. Para eliminar los anticuerpos no fijados, las placas se lavaron tres veces con PBS-Tw⁵.

³ Tampón Fosfato Sódico... 10 mM, pH 7,2.
NaCl 150 mM

⁴ Carbonato sódico 50 mM, pH =9,6.

⁵ PBS
Tween 20 ... 0,05%

Las muestras se prepararon triturando las hojas de las plantas con PBS-Tw en la proporción de 10 μ l por mg de tejido fresco, y posterior centrifugación a 13.000 rpm durante 10 min en una Biofuge A de HERAEUS. En cada pocillo de la microplaca se depositaron 200 μ l del sobrenadante diluido en PBS-Tw-BSA⁶ y se incubaron 3 h a 37 °C o bien 16 h a 4 °C. Los restos vegetales se eliminaron lavando las celdillas 4 veces con PBS-Tw. A continuación, se añadieron 200 μ l por pocillo de las IgG-FA diluidas en PBS-Tw-BSA, y se incubaron durante 4 h a 37 °C.

Después de lavar las placas en las condiciones anteriormente indicadas, se añadieron a cada pocillo 200 μ l del sustrato⁷, y las placas se incubaron a 37 °C durante 15 min. La reacción enzimática se detuvo con 50 μ l de KOH 5M. El producto de la reacción fue cuantificado colorimétricamente a una longitud de onda de 405 nm, usando un lector de microplacas EAR 400 SLT-Labinstruments.

Todas las diluciones de las IgG, IgG-FA, muestras y sustrato, así como los tampones de extracción de la muestra se determinaron empíricamente.

III.2.5. CLONAJE E INSERCIÓN DE UN DNA COMPLEMENTARIO AL RNA DEL GEN DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE PMMoV-S EN DOS VECTORES DE EXPRESIÓN EN PLANTAS.

Se ha utilizado un DNA complementario a una región del RNA de PMMoV-S, clonado en el plásmido pUC18 (Yanisch-Perron y col., 1985), tal y como se describe en Alonso y col., (1991). Este cDNA esta constituido por 479 pares de bases (pb) correspondientes a la secuencia codificadora completa de la proteína de la cápsida (ORF-CP), 37 pb de la región 5' y 250 pb correspondientes a la totalidad de la secuencia 3' no codificadora del RNA viral (Fig 1).

El plásmido pUC18-174 se digirió con las enzimas de restricción KpnI y PstI, y tras la electroforesis en geles de agarosa⁸, el fragmento de DNA de 479 pb se

⁶ PBS-Tw
BSA 0,2%

⁷ Dietanolamina 1 M
p-nitrofenil fosfato .. 3 mM
Cl₂Mg 0,5 mM
pH = 9,8.

⁸ Tris Borato 45 mM
EDTA 1 mM
Agarosa 0.8%

↓ ▶CP
 5641 CAGAACTCGGAGTCATCGGACGCCGAGTCTTCTTCGTTTTAACTATGGCTTACACAGTTT
 Q N S E S S D A E S S S F M A Y T V S
 5701 CCAGTGCCAATCAATTAGTGTATTTAGGTTCTGTATGGGCTGATCCATTAGAGTTACAAA
 S A N Q L V Y L G S V W A D P L E L Q A
 5761 ATCTGTGTACTTCGGCGTTAGGCAATCAGTTTCAAACACAACAGGCTAGAACTACGGTTC
 L C T S A L G N Q F Q T Q Q A R T T V G
 5821 AACAGCAGTTCTCTGATGTGTGGAAGACTATTCCGACCGCTACAGTTAGATTTCTCTGCTA
 Q Q F S D V W K T I P T A T V R F P A T
 5881 CTGGTTTTCAAAGTTTTCCGATATAATGCCGTGCTAGATTCTCTAGTGTCCGCACTTCTCG
 G F K V F R Y N A V L D S L V S A L L G
 5941 GAGCCTTTGATACTAGGAACAGGATAATAGAAGTTGAAAATCCGCAAAATCCTACAACCTG
 A F D T R N R I I E V E N P Q N P T T A
 6001 CCGAGACGCTTGATGCGACGAGGCGGGTAGACGATGCGACGGTGGCCATTAGGGCCAGTA
 E T L D A T R R V D D A T V A I R A S I
 6061 TAAGTAACCTCATGAATGAGTTAGTTCGTGGCACGGGAATGTACAATCAAGCTCTGTTCCG
 S N L M N E L V R G T G M Y N Q A L F G
 6121 AGAGCGCGAGTGGACTCACCTGGGCTACAACCTCTTAAACATGATGGCATAAATAAGTTG
 S A S G L T W A T T P *
 6181 AACGAACATTAACGTCCGTGGCGAGTACGATAACTCGTAGTGTTTTTCCCTCCACTTAA
 6241 ATCGAAGGGTGTGCGTTGGGATGGAACGCAATTAATACATGTGTGACGTGTATTTGCGA
 6301 ACGACGTAATTATTTTTTCAGGGTTCGAATCCCCCGAACC GCGGGTAGCGGCCCA_{OH} (6357)

Fig. 1. Secuencia nucleotídica parcial del genoma de PMMoV-S, mostrado como DNA, y secuencia aminoacídica deducida de la ORF del gen de la proteína de la cápsida. ▶CP indica el codón de iniciación del gen mientras que el codón de terminación se indica con un asterisco. La flecha señala el primer nucleótido del fragmento de cDNA clonado en pUC18 (pUC18-174) a partir del cual se construyó un gen quimérico para su expresión en plantas. (Tomado de Alonso *et al.*, 1991)

eluyó del gel mediante una membrana NA45. Este fragmento se clonó, en sentido positivo, en el sitio KpnI/PstI del plásmido pMPK110-35S, entre una secuencia de 530 pb del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35S-CaMV) y una secuencia de 190 pb de la región de terminación 3'-poly A del gen de la octopina sintetasa (OCS-3'). Se originó así, un gen quimérico de la proteína de la cápsida viral capaz de expresarse en plantas, clonado en un plásmido de 6,18 kb, al que se denominó pCPJ174 (Fig. 2a).

Este gen quimérico, se subclonó en el vector binario de expresión pBI121 (Jefferson y col., 1987), sustituyendo al gen GUS. Para ello, el fragmento de 1.486 pb correspondiente al gen quimérico de la proteína de la cápsida de PMMoV-S, se obtuvo por digestión del plásmido pCPJ174 con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII y posterior electroforesis y elución de un gel de agarosa al 1%, mediante una membrana NA45. Este fragmento se clonó en el sitio EcoRI/HindIII del plásmido pBI121. El plásmido resultante de 13,45 kb lo denominamos pBI174 (Fig. 2b).

El tamaño y la orientación de los fragmentos clonados se confirmó por análisis de restricción y secuenciación (Maxam y Gilbert, 1977).

Células competentes de *E. coli* HB101 (Bolívar y Backman, 1979), fueron transformadas con los plásmidos pMPK110-35S, portador de la construcción vacía (C0), y con los plásmidos pCPJ174 y pBI174, portadores de la construcción del gen quimérico (C1). Además de las construcciones C0 y C1, los tres plásmidos poseen un gen quimérico de la neomicina fosfotransferasa (NPTII), el cual confiere a las células vegetales transformadas, el fenotipo de resistencia al antibiótico kanamicina (Km^R), lo que permite su selección en los medios de cultivo que contienen este antibiótico.

Los plásmidos pMPK110-35S y pCPJ174 se movilaron mediante cruce triparental (Van Haute y col., 1983), a la cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* (Larebeke y col., 1974), que contiene el plásmido pGV3850:Km^R (Jones y col., 1985). El plásmido pBI174 se transfirió directamente por congelación (An y col., 1988), a la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* portadora del plásmido pAL4404 (Hoekema y col., 1983).

La presencia de los plásmidos en cada uno de los clones de *A. tumefaciens* obtenidos, se analizó extrayendo el DNA total de las bacterias (Dhaese y col.,

Fig. 2. Diagrama de la construcción del gen quimérico de la proteína de la cápsida de PMMoV S y su clonaje en los vectores de expresión en plantas pMPK110-35S y pBI121, para dar lugar a los plásmidos pCPJ174 (a) y pBI174 (b) respectivamente. El fragmento de cDNA KpnI/PstI, conteniendo la secuencia codificadora completa de la proteína de la cápsida de PMMoV-S (ORF-CP) más una región de 37 pares de nucleótidos en el extremo 5' y la región de 250 pares de nucleótidos del extremo 3' no codificador (Fig. 1), se subclonó desde el plásmido pUC18 al vector pMK110-35S entre el promotor 35S del CaMV (35S) y la señal de terminación del gen de la octopina sintetasa (OCS-3'), dando lugar a un plásmido de 6.18 kb que denominamos pCPJ174, el cual contiene el origen de replicación del plásmido pBR322 (ORI pBR) y los genes de resistencia a estreptomomicina (SmR) y a espectinomomicina (SPR). El fragmento EcoRI/HindIII que comprende la totalidad del gen quimérico de la proteína de la cápsida de PMMoV-S se subclonó en el plásmido pBI121, del que previamente se había eliminado un fragmento EcoRI/HindIII correspondiente al gen quimérico GUS. El plásmido resultante de 13.45 kb denominado pBI174 contiene el gen de resistencia al antibiótico kanamicina (Km^R) de expresión en eucariotas, así como las secuencias flanqueantes del T-DNA de *A. tumefaciens* (LB y RB) necesarias para la inserción en el genoma de las plantas.

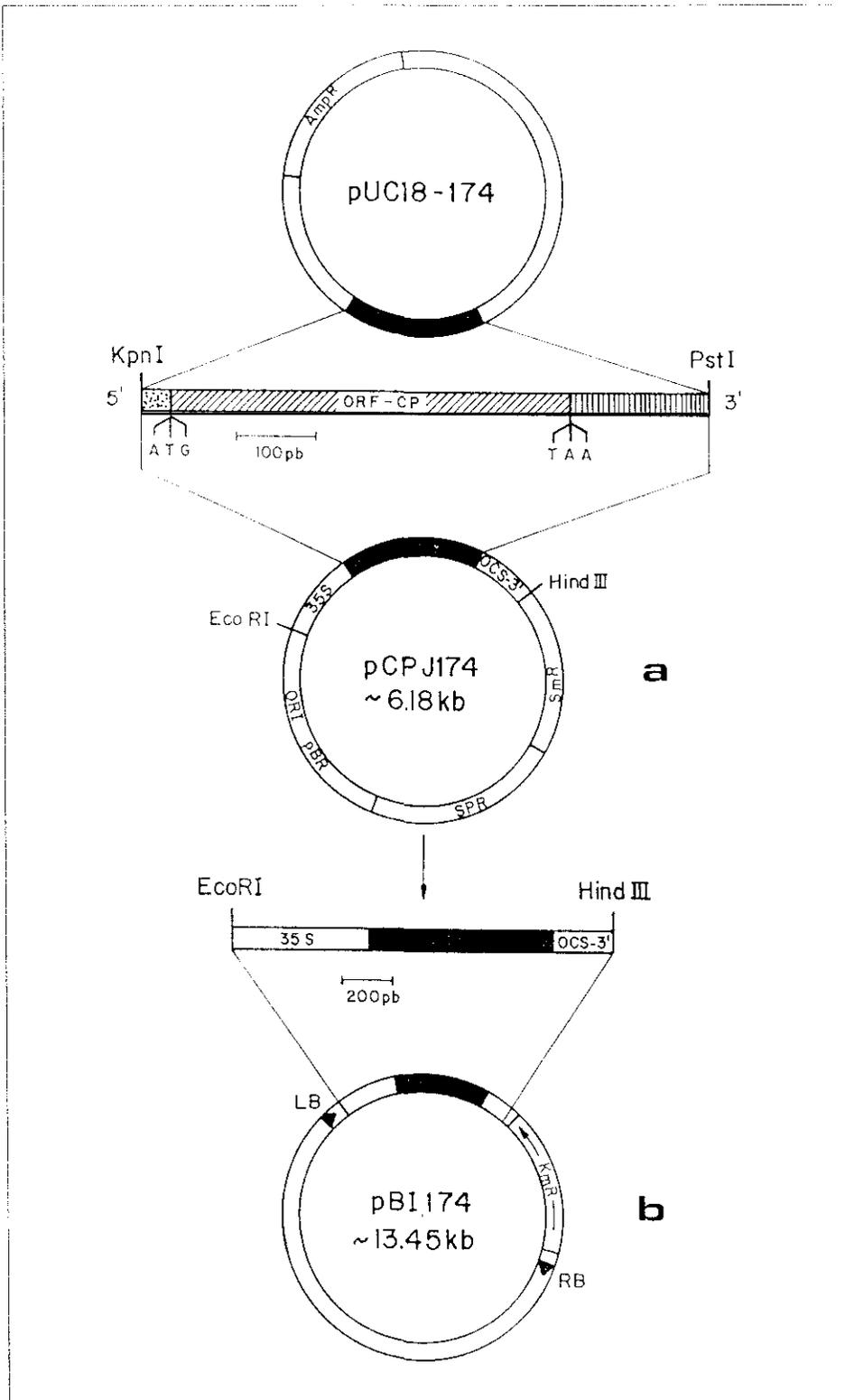


FIG. 2

1979). Los fragmentos obtenidos tras la digestión de este DNA con las enzimas de restricción EcoR1 y HindIII se separaron en un gel de agarosa al 1% y fueron transferidos a filtros de nitrocelulosa para una posterior hibridación con sondas realizadas frente a cada una de las construcciones (Southern, 1975)

Todas las técnicas de DNA recombinante y manipulaciones de clonaje se realizaron según se describe en Sambrook y col., (1989).

III.2.6. TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS DE *Nicotiana clevelandii* Gray CON EL GEN QUIMÉRICO DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE PMMoV-S.

La naturaleza de la planta utilizada nos obligó a establecer las concentraciones hormonales óptimas para obtener una adecuada respuesta morfogénica. Para ello, semillas de *N. clevelandii* fueron esterilizadas superficialmente durante 20 minutos con una solución al 5% de lejía comercial, lavadas cuatro veces con agua estéril y sumergidas en una solución 3 μM de ácido giberélico (GA_3) durante 4 horas a 25 °C en oscuridad. Las semillas posteriormente germinaron "in vitro" sobre medio sólido Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962). Fragmentos de 40 mm² cortados asépticamente de las hojas de las plantas germinadas "in vitro" fueron cultivados en un medio constituido por las sales del medio MS y las vitaminas del medio B5 (MS/B5), suplementado con distintas concentraciones hormonales de las citoquininas 6-benzil aminopurina (BA), zeatina (ZEA) y kinetina (KIN), bien solas o bien en combinación con las auxinas ácido indol acético (IAA) y ácido naftalén acético (NAA). Los explantes que dieron brotes se transfirieron para su elongación a un medio de cultivo MS/B5 suplementado con 3 μM de GA_3 y 0,5 μM de NAA. Cuando los brotes alcanzaron un tamaño de 1-2 cm fueron cortados del explante y colocados sobre un medio MS/B5 con 0,25 μM de NAA, hasta la inducción de raíces. Las plantas completas fueron transferidas a macetas con tierra donde prosiguieron su desarrollo hasta la floración y formación de frutos.

Todos los medios empleados contenían 3% de sacarosa, a excepción del medio de enraizamiento que solo contenía un 1%. Los medios se solidificaron con 0,7% de agar (Oxoid) y el pH se ajustó a 5,9 antes de autoclavarlos a 121 °C durante 20 minutos. Los cultivos de las plantas y los explantes se realizaron en

cámaras a 25 °C, con 16 horas de fotoperiodo y 10.000 lux de intensidad lumínica.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de regeneración se abordó la transformación de *N. clevelandii* Gray mediante el procedimiento de transformación de plantas a partir de discos de hojas descrito por Horsch et al., (1985). Para ello las estirpes de *A. tumefaciens* C58C1 y LBA4404 conteniendo las construcciones C0 y C1 se cultivaron en agitación a 200 rpm durante 16 horas y a una temperatura de 28°C, en medio LB con los antibióticos de selección, estreptomycin (300 µg/ml), espectinomycin (100 µg/ml), cloranfenicol (40 µg/ml) y eritromicina (50 µg/ml) para la cepa C58C1, y kanamicina (50 µg/ml) y rifampicina (50 µg/ml) para la cepa LBA4404. Posteriormente las bacterias fueron diluidas en medio MS líquido a la concentración de $2,5-3 \times 10^8$ bact./ml. Fragmentos de las hojas de las plantas cultivadas "in vitro" se precultivaron durante 24 horas en medio MS/B5 suplementado con las hormonas BA 4,5 µM y NAA 0,5 µM (MST). Posteriormente los fragmentos se sumergieron en la dilución de las estirpes de *A. tumefaciens* durante 30 min, se secaron sobre papel de filtro y se cultivaron de nuevo sobre medio MST durante 48 horas. Durante este tiempo de cocultivo se produce la transformación de las células de la planta con el T-DNA de *A. tumefaciens*. Las células transformadas fueron regeneradas hasta obtener plantas completas.

Para controlar el crecimiento de *A. tumefaciens* sobre los medios de regeneración, se incluyó en éstos el antibiótico cefotaxime a una concentración de 250 µg/ml, y para seleccionar las plantas transformadas se incluyó el antibiótico kanamicina a la concentración de 100 µg/ml.

III.2.7. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA EN EL GENOMA Y DE LA EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DEL GEN QUIMÉRICO DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE PMMoV-S EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE LA GENERACIÓN R₀.

El análisis de la presencia del gen de la proteína de la cápsida de PMMoV-S en el genoma de las plantas transgénicas de la generación R₀ se realizó mediante la técnica de reacción de polimerización en cadena de la DNA polimerasa (PCR).

A partir de un extracto de los ácidos nucleicos totales de las plantas se

amplificaba, a niveles fácilmente detectables, un fragmento de DNA perteneciente al gen quimérico de la proteína de la cápsida de PMMoV-S, solo en el caso de que este gen se encontrara insertado en el genoma de la planta e independientemente de su nivel de expresión constitutiva.

El extracto de ácidos nucleicos totales de las plantas se realizó según el método de Edwards *y col.*, (1991). Un disco de hoja de cada planta, recogido usando la tapa de un tubo Ependorff estéril, se trituró durante 15 segundos. A continuación se añadieron 400 μ l del tampón de extracción⁹ y se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 min en una Biofuge A de HERAEUS. Un volumen de 300 μ l del sobrenadante se transfirió a nuevos tubos, se añadieron 300 μ l de isopropanol y tras 2 min a temperatura ambiente, se centrifugaron de nuevo a 13.000 rpm durante 5 minutos. El precipitado se secó a vacío y fue resuspendido en 100 μ l de tampón TE¹⁰.

Cada reacción de polimerización se realizó en un volumen final de 100 μ l, conteniendo 10 μ l de los extractos de ácidos nucleicos totales y 90 μ l de tampón de reacción¹¹. Se utilizaron dos cebadores¹² de 20 nucleótidos cada uno, el CP1 correspondiente a la secuencia nucleotídica situada entre los nucleótidos 5.763 y 5.782 de la secuencia codificadora del gen de la proteína de la cápsida, y el CP2 que es complementario a la secuencia nucleotídica comprendida entre el nucleótido 6.139 y el 6.157. El número de nucleótidos existentes entre los extremos de ambos cebadores es de 395. La PCR se realizó en un termociclador B. Braun Diessel (Biotech) mediante treinta ciclos de reacción constituidos por 1 min de desnaturalización a 92 °C, 1 min de hibridación a 61 °C y 2 min de polimerización

⁹ TrisClH 200 mM pH = 7,5
NaCl 250 mM
EDTA 25 mM
SDS 0,5%

¹⁰ TrisClH 10 mM
EDTA 1 mM
pH=7,4

¹¹ TrisClH 10 mM pH = 8,3
KCl 50 mM
MgCl₂ 1,5 mM
Cebadores 0,10 mM
dNTPs 0,25 mM
Apli TAQ DNApol 2 Unidades

¹² Cebador CP1: 5' CTG TGTACTTCGGCGTTAGG- 3'
Cebador CP2: 5' TTAAGGAGTTGTAGCCCAGG- 3'

a 72 °C , con un último ciclo de 10 min a 72 °C. Un volumen de 10 µl del total de cada una de las muestras amplificadas por PCR, se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0,8%.

El análisis de la expresión constitutiva del gen de la proteína de la cápsida en las plantas transgénicas Ro se realizó por Radio-Immunodetección sobre membranas de nitrocelulosa. Para ello, se tomaron muestras de 100 mg de hojas y se homogeneizaron con 100 µl de tampón disociador¹³, se incubaron durante 5 minutos a 95 °C y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 min. Alícuotas de 40 µl se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5% en condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970), según se describe en el apartado 1.2.4.

Las proteínas separadas en el gel se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (Towbin y col., 1979), tal y como se describe en el apartado 1.2.6. Las membranas se trataron con una solución de bloqueo¹⁴ para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos (Johnson y col., 1984). A continuación se incubaron durante 14 horas a temperatura ambiente, con el inmunosuero específico de la CP de PMMoV-S, a la dilución 1:100, tras lo cual se realizaron tres lavados de 15 min con TBS¹⁵. Por último las membranas se incubaron durante tres horas con Proteína A marcada con ¹²⁵I 30 µCi/µg, a la dilución de 1,5x10⁶ cpm/ml en solución bloqueante, se lavaron de nuevo durante 30 minutos con TBS y se autorradiografiaron a -70 °C durante 48 horas.

La cantidad de CP que se expresa constitutivamente en las plantas transgénicas se determinó por ELISA-DAS. La cuantificación de proteínas totales de la planta se realizó utilizando el ensayo colorimétrico de Bradford (1976).

¹³ TrisClH 325 mM pH = 6,8
β-mercaptoetanol 8,8%
SDS 5,0%
Azul de bromofenol .. 0,04%

¹⁴ TBS
Leche descremada en polvo 5%
Azida sódica 0,01%

¹⁵ Tris base 0,3%
NaCl 0,8%
KCl 0,038%
pH = 7,4

III.2.8. SELECCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE LA GENERACIÓN R₁.

Por autofecundación de las plantas transgénicas de *N. clevelandii* de la generación R₀ se obtuvieron semillas de la generación R₁. Las plantas transformadas de la generación R₁ se seleccionaron germinando las semillas en medios de cultivo MS conteniendo 100 µg/ml de sulfato de kanamicina. Las plantas que crecían se transfirieron a tierra y se mantuvieron en cámaras de cultivo.

En 20 plantas de las líneas transgénicas C14 y C16 se realizó el análisis de la presencia en el genoma y la expresión constitutiva del gen de la proteína de la cápsida, tal y como se ha descrito en el apartado III.2.5.

III.2.9. ANÁLISIS DE LA PROTECCIÓN MEDIADA POR LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE PMMoV-S.

En cada experimento de protección, 10 plantas de las líneas transgénicas C14, C16 y C06 y 10 plantas no transgénicas NT, de unos 30 días de edad, se inocularon mecánicamente en las dos primeras hojas verdaderas con 20 µl de PMMoV-S a diferentes concentraciones en tampón de inoculación¹⁶.

El desarrollo de los síntomas en las plantas inoculadas se siguió diariamente hasta los 15 d.p.i., y a este tiempo se recogieron muestras de las hojas superiores. Por otra parte, de las plantas que fueron inoculadas con 0,1 y 1 µg/ml se tomaron muestras de las hojas inoculadas a 3, 5 y 7 d.p.i. y de las hojas superiores a 4, 8 y 10 d.p.i. La cuantificación de los niveles de acumulación de PMMoV-S tanto en hojas inoculadas como en hojas superiores, se realizó por ELISA-DAS. Las IgG se utilizaron entre 2 y 4 µg/ml, y las IgG-FA a la dilución 1:300. En todos los ensayos se incluyó una escala de concentraciones conocidas de PMMoV-S purificado, con la que se realizó una recta de regresión en la que se extrapolaron las concentraciones correspondientes a las muestras analizadas. Los valores obtenidos en los diferentes experimentos realizados, fueron comparados mediante el test "t de Student", con un nivel de confianza del 95%. El test se realizó mediante el programa informático Statistix (NH Analytical Software. IBM)

¹⁶ Tampón fosfato sódico ... 20 mM
pH = 7

ABRIR III.3.- RESULTADOS

