



ABRIR III.2.- MATERIALES Y MÉTODOS

III.3. RESULTADOS

III.3.1. ELISA-DAS PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PMMoV-S.

Se han establecido las condiciones óptimas de este inmunoensayo utilizando el inmunosuero específico de PMMoV-S. Las concentraciones de anticuerpos para tapizar los pocillos de las microplacas han quedado establecidas entre 2 y 4 $\mu\text{g/ml}$. Estos mismos anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina se han utilizado para visualizar la reacción antígeno-anticuerpo. La concentración de IgG-FA seleccionada fue de 5 $\mu\text{g/ml}$, la cual permite obtener una densidad óptica de 1 para 125 ng de virus purificado. La sensibilidad de este ensayo permite detectar 15 ng de virus.

Las muestras se prepararon en PBS-Tw, mientras que la solución más apropiada para las IgG-FA fue PBS-Tw conteniendo BSA al 0,2%.

III.3.2. TRANSFORMACIÓN Y REGENERACIÓN DE *Nicotiana clevelandii* Gray.

Se han ensayado distintas combinaciones de auxinas y citoquininas para determinar las más favorables para la inducción de brotes en los explantes de *N. clevelandii* (Tabla 1).

Con la más baja de las concentraciones de BA, 4,5 μM , no se obtuvo una respuesta regenerativa, mientras que con las concentraciones más altas de 9 y 18 μM se inducían brotes en los bordes del explante, que eran más numerosos cuando se incluía alguna de las auxinas IAA o NAA. Si bien no se observaron diferencias apreciables en la inducción de brotes y en el número de estos al emplear una u otra auxina, los brotes inducidos en los medios con NAA enraizaban posteriormente mejor que los inducidos con IAA.

También se ensayaron las citoquininas ZEA y KIN a las concentraciones de 4,5 y 9 μM , y si bien la ZEA resultó más eficaz en la inducción de brotes que la KIN, con ambas fitohormonas se inducía una gran cantidad de callo alrededor del explante que ahogaba los brotes (Fig. 3).

Tabla 1. Concentraciones hormonales empleadas en los medios de regeneración de explantes de *Nicotiana clevelandii*.

| AUXINAS | CITOQUININAS | | | | | | |
|--------------------|-------------------|-----------------|------------------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|
| | BA 4,5 μ M | BA 9 μ M | BA 18 μ M | ZEA 4,5 μ M | ZEA 9 μ M | KIN 4,5 μ M | KIN 9 μ M |
| - | s.r.r. | b (+) | b (+) | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| IAA 0,5 μ M | s.r.r. | b (+) | b (++) | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| NAA 0,5 μ M | c | b (++) | b (++) | c/b (+) | c/b (+) | c/b (+) | c |

s.r.r.- sin respuesta regenerativa.

c - callo verde alrededor del explante.

b - brotes verdaderos en el borde del explante.

(-) - menos de tres brotes.

(++) - más de tres brotes.

n.d. - no determinado.

Cuando estas combinaciones hormonales se probaron con discos de hojas de *N. clevelandii*, que habían estado en contacto con las dos estirpes de *A. tumefaciens*, se confirmó que la combinación BA 9 μ M y NAA 0,5 μ M era con la que mayor número de brotes viables se obtenían. Por otro lado, en todos los casos se observó que la eficiencia de regeneración sobre los medios de selección con sulfato de kanamicina (100 mg/l), era mayor cuando se usaba la estirpe LBA4404 que con la estirpe C58C1. En el primer caso el 90% de los explantes desarrollaron brotes por todo el borde, mientras que en el segundo caso, solo el 40% de los explantes desarrollaron brotes.

De todos los brotes que se indujeron, tan solo el 10% fue capaz de elongar en un medio de cultivo MS-B5 suplementado con GA₃ 3 μ M y NAA 0,5 μ M. La inclusión en el medio del ácido giberélico fue absolutamente necesaria para conseguir la elongación de los brotes.

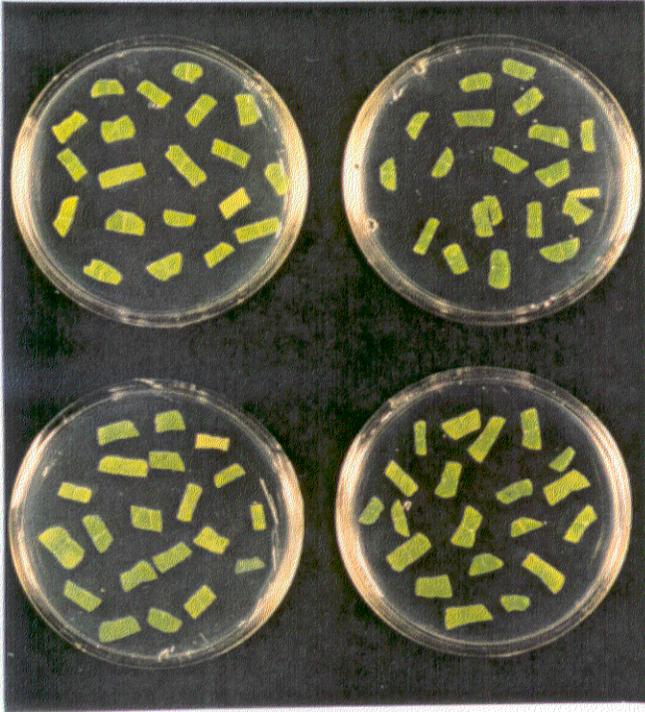
La mayoría de los brotes elongados enraizaron en el medio de cultivo MS suplementado con NAA 0,25 μ M. (Fig. 3)

Fig. 3. a: Fragmentos de hojas de plantas de *N. clevelandii* cultivadas "in vitro" sobre medios de cultivo MS/B5 suplementados con hormonas vegetales.

b: Brotes (izquierda) y callos (derecha) inducidos en los explantes.

c: Plántula en el medio de enraizamiento suplementado con kanamicina, para seleccionar las plántas transgénicas.

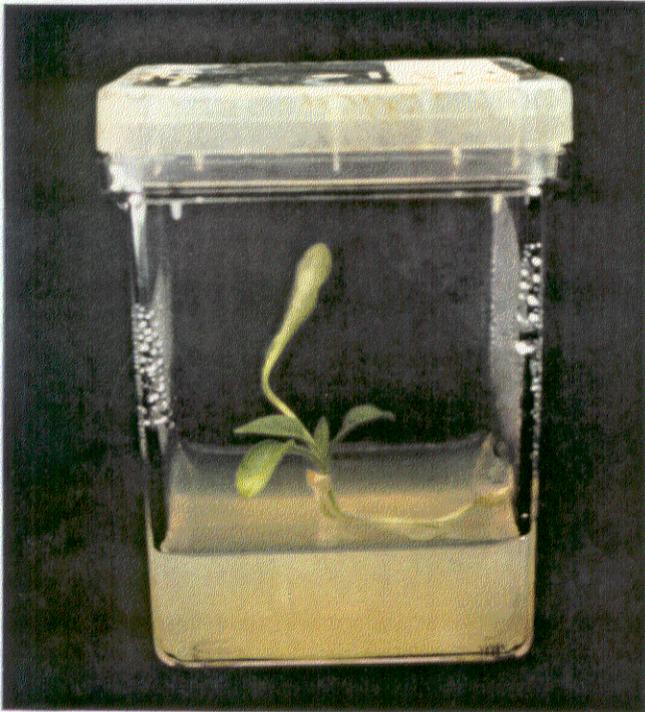
d: Plantas transgénicas traspasadas a macetas, mostrando un aspecto normal.



a



b



c



d

FIG. 3

III.3.3. DETECCIÓN EN EL GENOMA Y EXPRESIÓN DEL GEN QUIMÉRICO DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE PMMoV-S EN PLANTAS TRANSGÉNICAS R₀.

Solamente en tres de las plantas regeneradas y seleccionadas en presencia de kanamicina, las denominadas C14, C15 y C16, se detectó por PCR el fragmento de 396 pb correspondiente a parte de la ORF de la proteína de la cápsida de PMMoV-S. Estas plantas habían sido transformadas con la estirpe LBA4404 de *A. tumefaciens* portadora de la construcción C1. Sin embargo, la planta C06 que se utilizó como control en los posteriores análisis de resistencia, fue transformada con la estirpe C58C1 portadora de la construcción C0. En la Fig. 4 se puede observar el fragmento amplificado en las plantas C14 y C16.

Por otro lado, en las plantas C14 y C16 se comprobó la expresión constitutiva del gen de la proteína de la cápsida de PMMoV-S, detectándose una proteína de idéntico peso molecular a la CP viral y que reaccionó con el suero específico frente a la cápsida de PMMoV-S, mientras que en la planta C06 no se detectó esta proteína (Fig. 5). La cantidad de CP constitutiva en la planta C16 fue considerablemente mayor que en la planta C14, de manera que la cantidad media de proteína determinada por ELISA-DAS en la planta C16 fue de $3,8 \pm 0,3$ ng/ μ g de proteínas totales, lo que representa un 0,38%, mientras que en la planta C14 la cantidad fue de $0,43 \pm 0,06$ ng/ μ g de proteínas totales, lo que representa el 0,043%.

III.3.4. HERENCIA DEL GEN NPTII. DETECCIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE PMMoV-S EN PLANTAS TRANSGÉNICAS R₁.

Por autofecundación de las plantas C14, C16 y C06 se obtuvieron semillas de la generación R₁ que al germinar y crecer en medio MS conteniendo km (100 μ g/ml), dieron un porcentaje de supervivencia del 75%, correspondiente a una segregación 3:1 del gen NPTII. A partir del DNA total de varias plantas de las líneas C14 y C16, elegidas al azar de entre las que crecieron en medios con Kanamicina, se observó la amplificación por PCR del fragmento de 396 pb correspondiente a parte de la secuencia codificadora del gen de la proteína de la cápsida de PMMoV-S (Fig. 6).

Fig. 4. Análisis en gel de agarosa al 0,8% de los fragmentos de DNA amplificados por PCR a partir de los extractos de ácidos nucleicos totales de plantas transgénicas de *N. clevelandii*. El fragmento amplificado de 395 pb corresponde a parte de la secuencia codificadora del gen de la proteína de la cápsida de PMMoV-S. Carril 1; planta C14. Carril 2; planta C16. Carril 3; planta C06. Carril 4; plásmido pBI174 purificado. Carril P; marcadores de tamaño de DNA obtenidos por digestión del plásmido pUC18 con HinfI.

Fig. 5. Autorradiografía de una membrana de nitrocelulosa tras la inmunodetección de la proteína de la cápsida de PMMoV-S, con un inmunosuero específico y Proteína A marcada con ¹²⁵I. Carriles 1 y 2; 10 y 20 ng respectivamente de PMMoV-S purificado. Carril 3; 40 µl de extracto de proteínas totales de una planta de *N. clevelandii* transgénica control C06. Carriles 4 y 5; 40 µl de extractos proteicos totales de las plantas transgénicas C14 y C16 respectivamente.

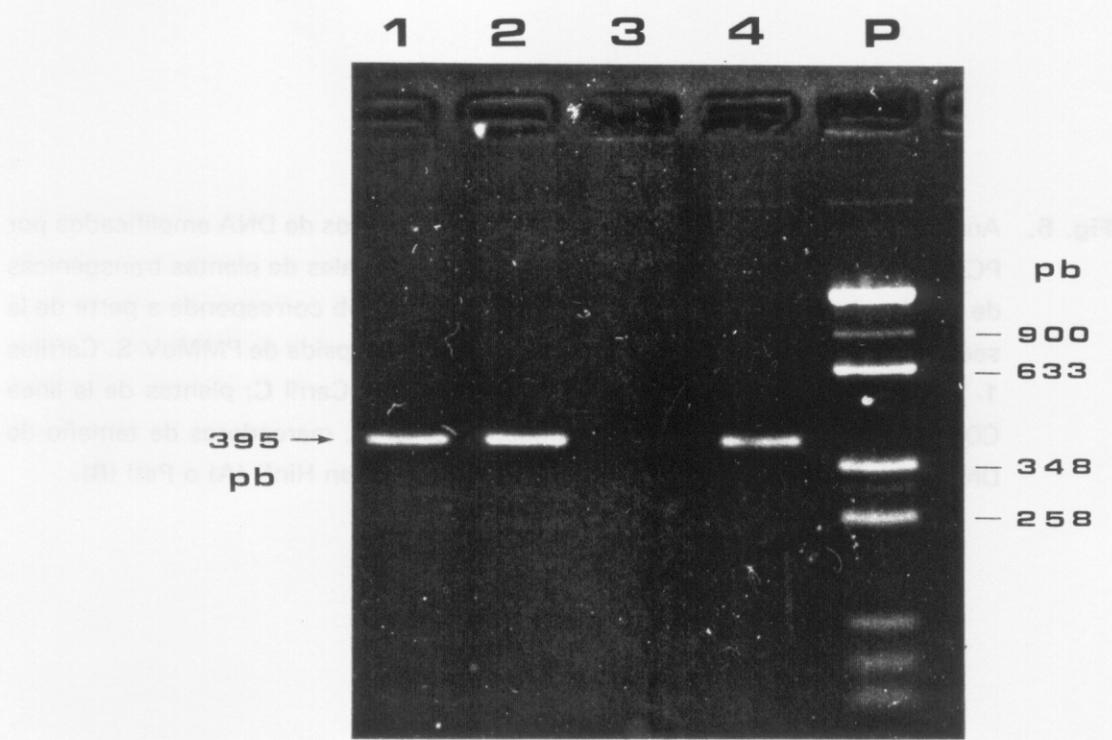


FIG. 4

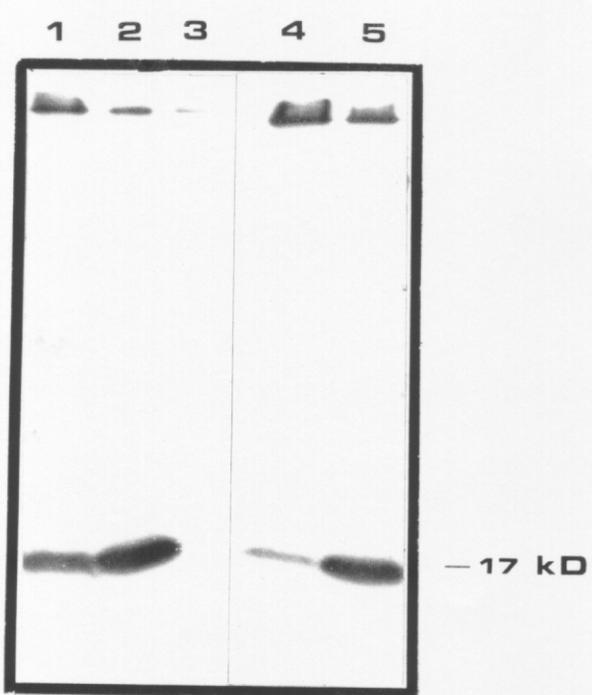
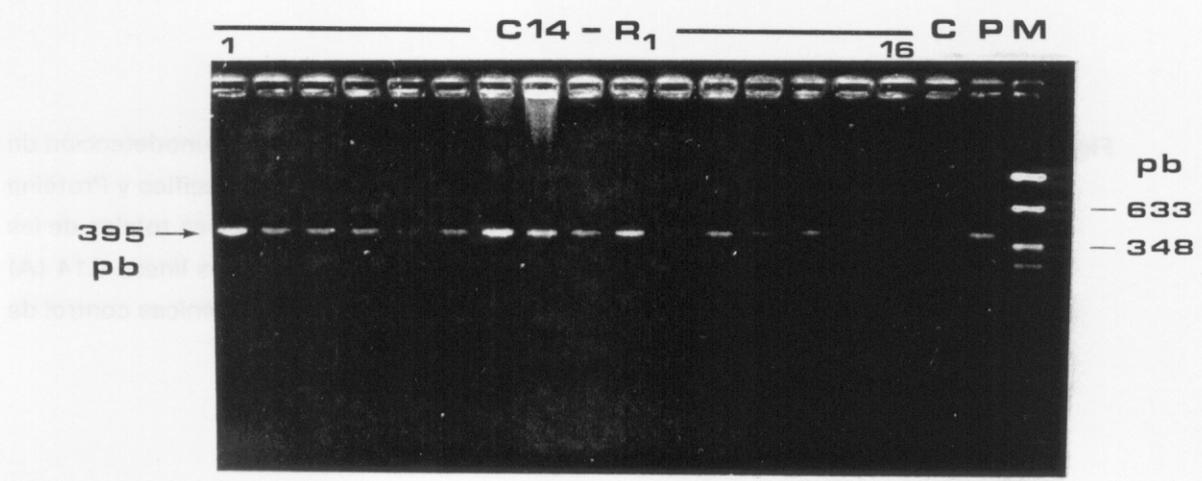
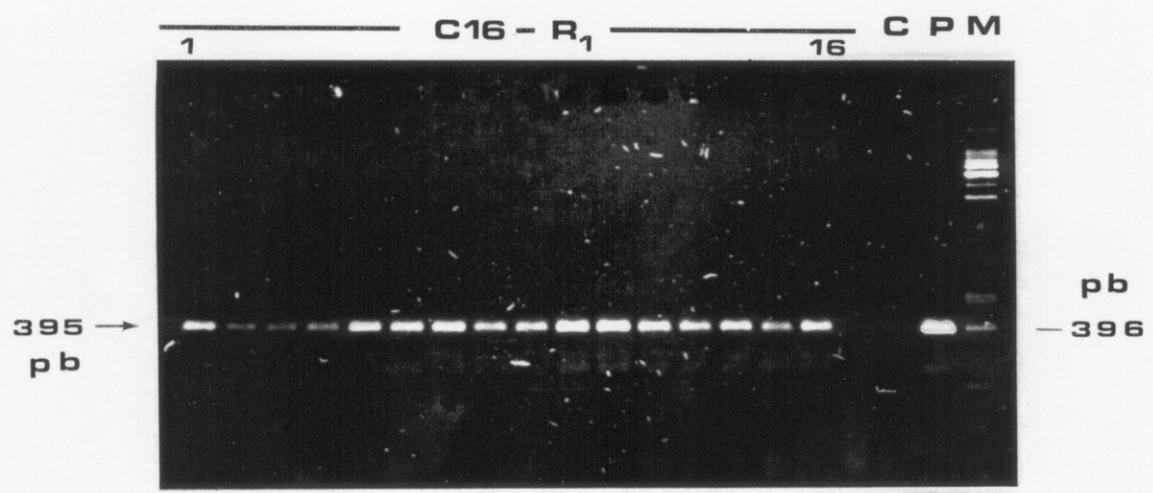


FIG. 5

Fig. 6. Análisis en geles de agarosa al 0,8% de los fragmentos de DNA amplificados por PCR a partir de los extractos de ácidos nucleicos totales de plantas transgénicas de *N. clevelandii*. El fragmento amplificado de 395 pb corresponde a parte de la secuencia codificadora del gen de la proteína de la cápsida de PMMoV-S. Carriles 1-16; plantas R1 de las líneas C14 (**A**) y C16 (**B**). Carril C; plantas de la línea C06. Carril P; plásmido pBI174 purificado. Carril M; marcadores de tamaño de DNA obtenidos por digestión del plásmido pUC18 con HinfI (**A**) o PstI (**B**).



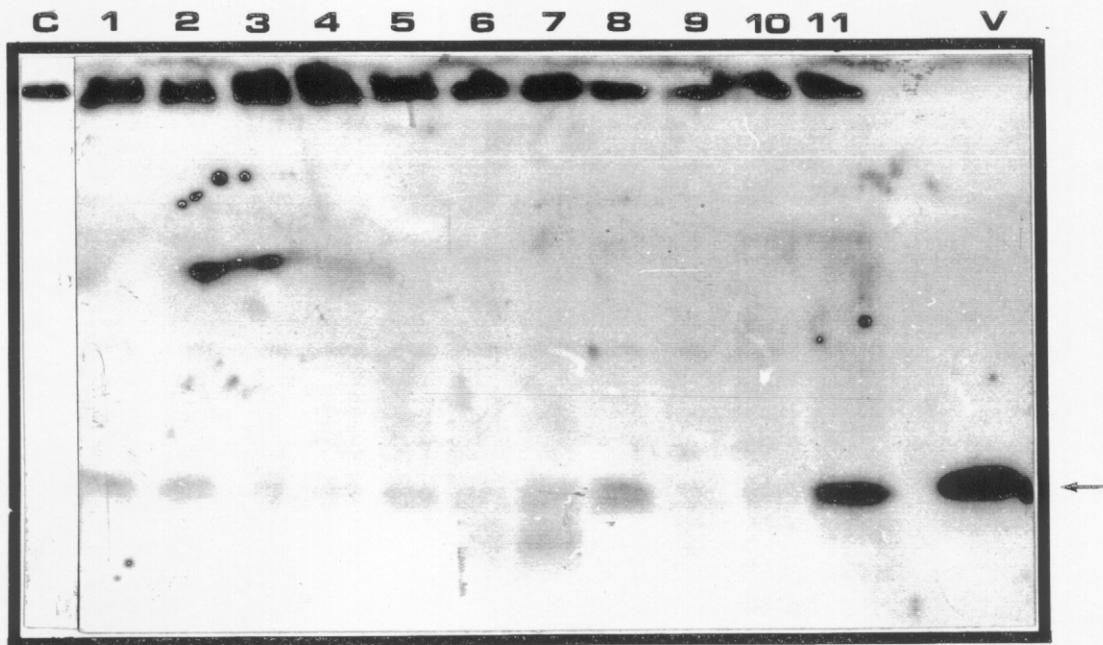
A



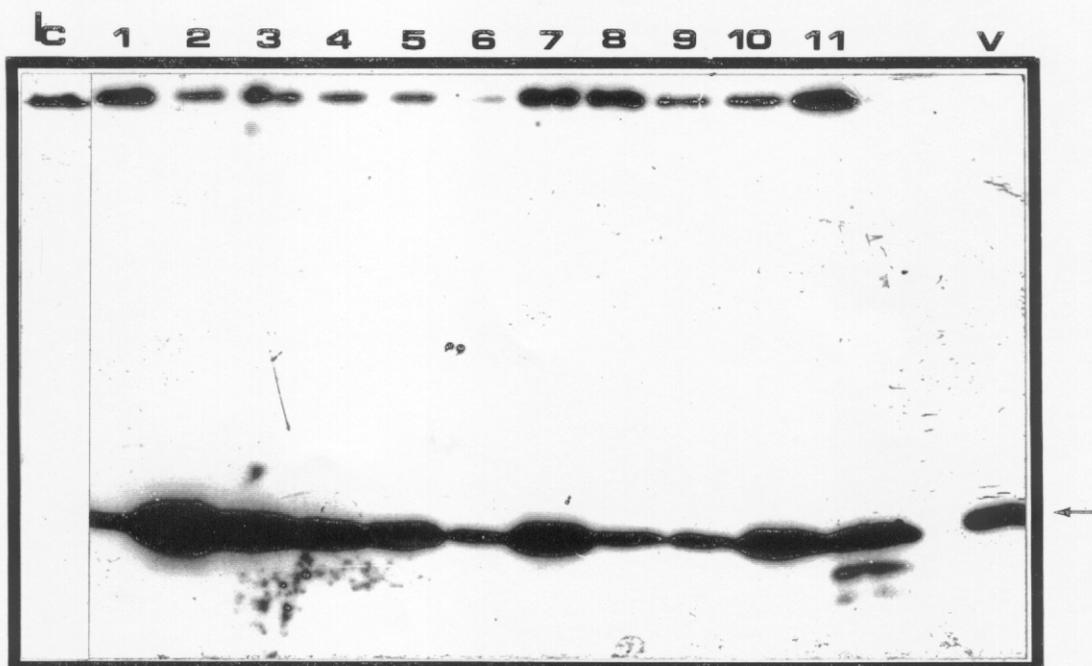
B

FIG. 6

Fig. 7. Autorradiografías de dos membranas de nitrocelulosa tras la inmunodetección de la proteína de la cápsida de PMMoV-S, con un inmunosuero específico y Proteína A marcada con ^{125}I . Carriles 1-11; 40 μl de extractos de proteínas totales de las plantas transgénicas de *N. clevelandii* de la generación R1 de las líneas C14 (**A**) y C16 (**B**). Carril C; 40 μl del extracto proteico de plantas transgénicas control de la línea C06. Carril V; 20 ng de PMMoV-S purificado.



A



B

FIG. 7

Por otro lado, en la mayoría de estas plantas se detectó la expresión constitutiva de la CP de PMMoV-S, observándose que en las plantas de la línea C16 se mantuvieron las diferencias de expresión con respecto a las plantas de la línea C14, que ya fueron observadas en la generación R_0 (Fig. 7).

III.3.5. ANÁLISIS DE LA PROTECCIÓN MEDIADA POR LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE PMMoV-S FRENTE A LA INFECCIÓN POR ESTE VIRUS.

Para estudiar la protección, se inocularon con 0,1 y 1 $\mu\text{g/ml}$ de PMMoV-S 10 plantas de la generación R_1 de las líneas C14, C16 y C06, así como 10 plantas no transgénicas de *N. clevelandii* (NT), y se recogieron muestras de hojas a diferentes d.p.i. para cuantificar por ELISA-DAS los niveles de acumulación del virus en las hojas inoculadas (Fig. 8) y en las hojas superiores (Fig. 9).

Tanto en las hojas inoculadas como en las hojas superiores de las plantas control (C06 y NT) inoculadas con ambas concentraciones, se observó un patrón creciente de acumulación de virus, que es mayor en las hojas infectadas sistémicamente que en las hojas inoculadas. Mientras que, en la mayoría de las plantas de la línea C14 y en la totalidad de las C16 no se apreció acumulación de virus, pues los niveles de CP que se detectaron en estas dos líneas correspondían a la expresión constitutiva de dicha proteína en estas plantas. Sin embargo, entre las plantas de la línea C14, al ser inoculadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de virus se observaron dos poblaciones diferentes; la población P1, en cuyas plantas se detectó virus en las hojas inoculadas a los 5 y 7 d.p.i. (Fig. 8), y en las hojas superiores a los 10 d.p.i. (Fig. 9); y la población P2, constituida por plantas donde no hay acumulación de virus en las hojas inoculadas ni en las superiores. Por otra parte, los niveles de acumulación de virus en las plantas de la población P1, fueron menores que los detectados a los mismos días en las plantas control.

Para conocer el porcentaje de plantas que resultaron infectadas por PMMoV-S se inocularon plantas de las líneas C14, C16, C06 y NT con 0,05 , 0,1 y 1 $\mu\text{g/ml}$ de virus purificado, se tomaron muestras de las hojas superiores a los 15 d.p.i. y se analizó por ELISA-DAS la presencia de virus (Fig. 10a y b)

Concentraciones inferiores a 1 $\mu\text{g/ml}$ no fueron infectivas en el 100% de las plantas control, a pesar de lo cual la diferencia con las líneas C14 y C16 fue

Fig. 8. Acumulación viral en las hojas de plantas transgénicas de *N. clevelandii* inoculadas con 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (izquierda) y 1 $\mu\text{g/ml}$ (derecha) de PMMoV-S. Las muestras se recogieron a los 3 (**a**), 5 (**b**) y 7 (**c**) días postinoculación y se analizaron por ELISA-DAS.

Los valores representados son la media de los resultados de tres experimentos independientes y de 10 plantas de cada línea analizadas en cada experimento. Los valores numéricos se representan en la tabla inferior con su correspondiente error estándar.

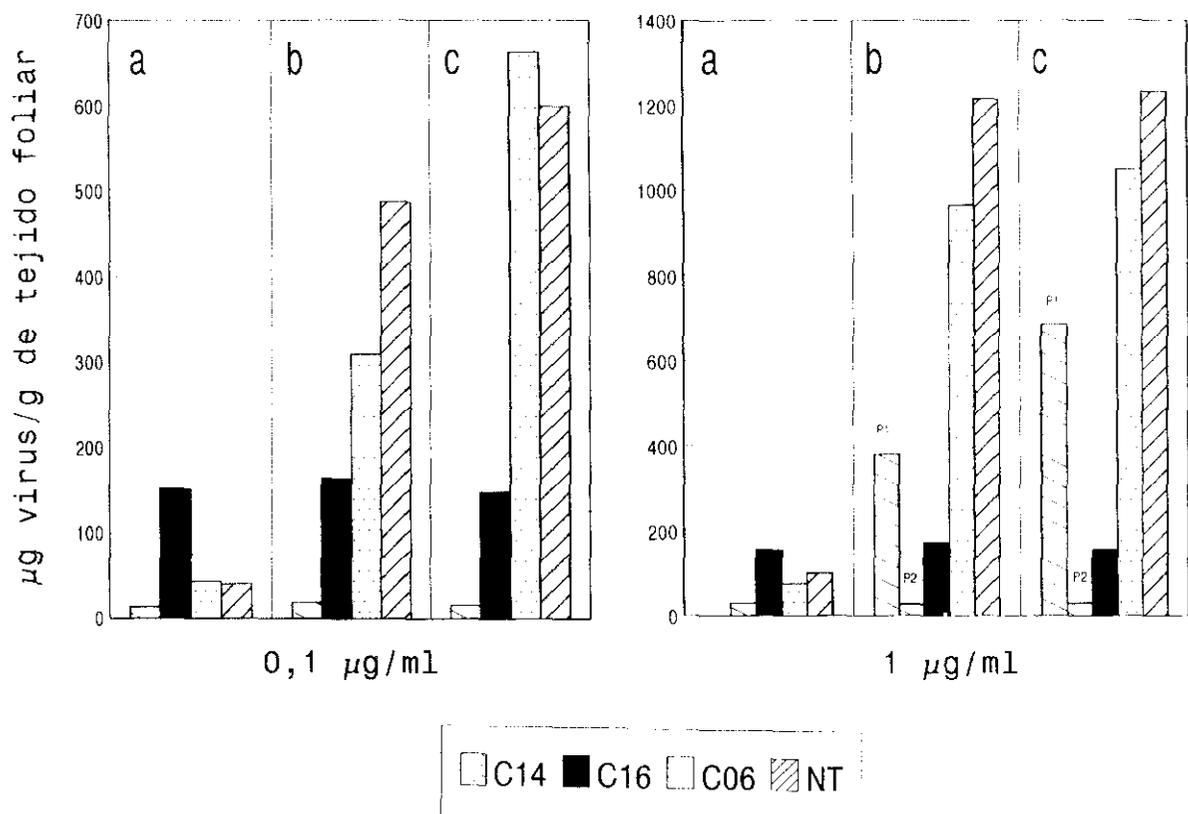


FIG. 8

| | 0,1 µg/ml | | | 1 µg/ml | | |
|-----|-------------------------|-----------|----------|----------|-------------------------|-------------------------|
| | 3 DPI | 5 DPI | 7 DPI | 3 DPI | 5 DPI | 7 DPI |
| C14 | 13,5±2,6 ⁽¹⁾ | 18,4±4,6 | 15±3,8 | 18,5±3,4 | 16,4±2,6 ⁽²⁾ | 19,2±3,3 ⁽³⁾ |
| C16 | 153±12,6 | 164±23,6 | 149±16,7 | 155±24,5 | 172±22,5 | 156±13,2 |
| C06 | 45,7±43,3 | 319±79,5 | 663±135 | 75±49 | 964±120 | 1050±137 |
| NT | 40±39,2 | 487±106,2 | 600±128 | 100±60,3 | 1216±163 | 1233±175,4 |

(1) µg de virus/g de tejido foliar: media ± error estándar

(2) en plantas P1, 379±25

(3) en plantas P1, 686±97

Fig. 9. Acumulación viral en las hojas superiores de plantas transgénicas de *N. clevelandii* inoculadas con 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (izquierda) y 1 $\mu\text{g/ml}$ (derecha) de PMMoV-S. Las muestras se recogieron a los 4 (a), 8 (b) y 10 (c) días postinoculación y se analizaron por ELISA-DAS.

Los valores representados son la media de los resultados de tres experimentos independientes y de 10 plantas de cada línea analizadas en cada experimento. Los valores numéricos se representan en la tabla inferior con su correspondiente error estándar.

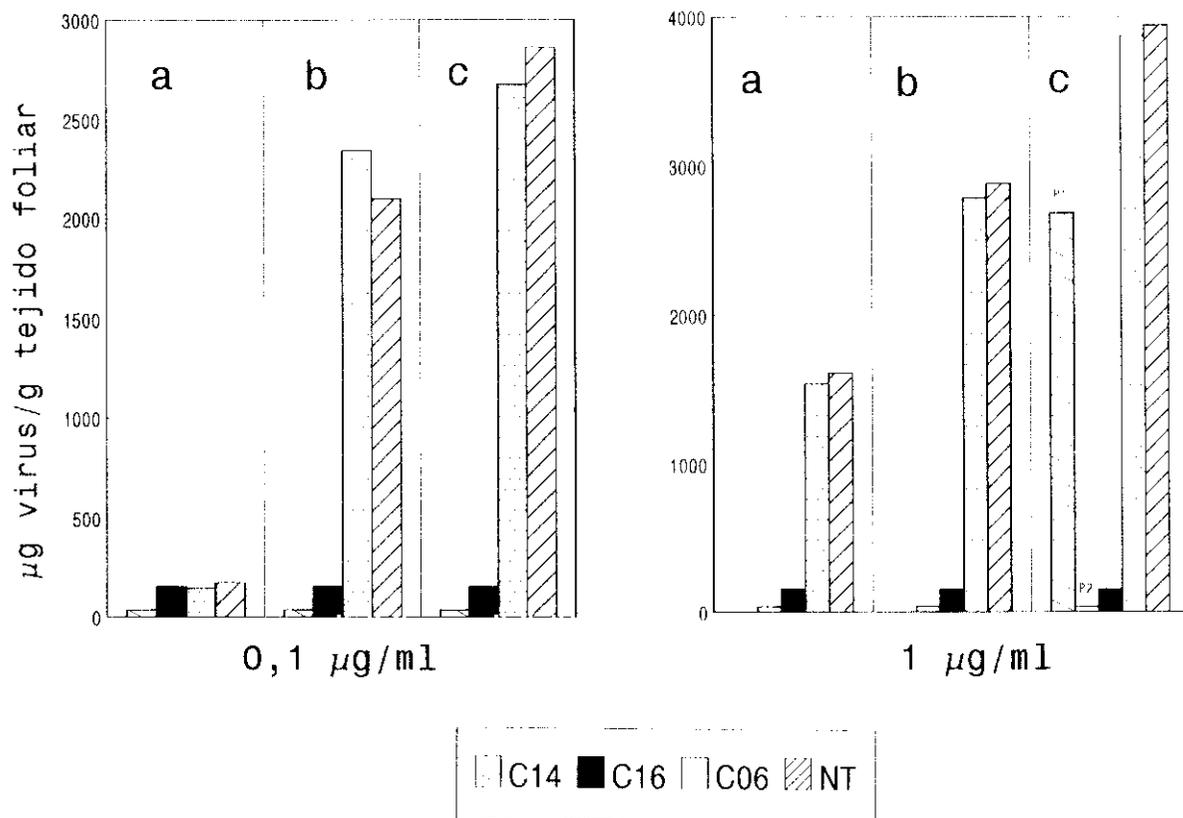


FIG. 9

| | 0,1 µg/ml | | | 1 µg/ml | | |
|-----|-------------------------|--------------|------------|------------|------------|---------------------------|
| | 4 DPI | 8 DPI | 10 DPI | 4 DPI | 8 DPI | 10 DPI |
| C14 | 14 ± 6,3 ⁽¹⁾ | 17,5 ± 4,4 | 18,6 ± 3,7 | 15 ± 6,7 | 19,2 ± 6,5 | 14,5 ± 2,6 ⁽²⁾ |
| C16 | 153 ± 25,6 | 147 ± 15,4 | 167 ± 32,7 | 134 ± 12,6 | 156 ± 23,8 | 158 ± 18,2 |
| C06 | 145 ± 36,8 | 2345 ± 187 | 2678 ± 204 | 1540 ± 145 | 2780 ± 235 | 3869 ± 287 |
| NT | 175 ± 87 | 2100 ± 124,6 | 2865 ± 276 | 1610 ± 123 | 2879 ± 278 | 3940 ± 324 |

(1) µg de virus/g de tejido foliar : media ± error estándar

(2) en plantas Pt. 26/8+28/

Fig. 10. Porcentaje de plantas transgénicas de *N. clevelandii* infectadas con PMMoV-S a los 15 d.p.i. La presencia o ausencia de virus en las hojas superiores de las plantas inoculadas se analizó por ELISA-DAS. **a;** plantas inoculadas con 0,05, 0,1 y 1 $\mu\text{g/ml}$ de virus purificado. **b;** plantas inoculadas con 10, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de virus purificado. **c;** plantas inoculadas con 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de RNA purificado de PMMoV-S.

Los valores representados son la media de los resultados de tres experimentos independientes y de 10 plantas de cada línea analizadas en cada experimento.

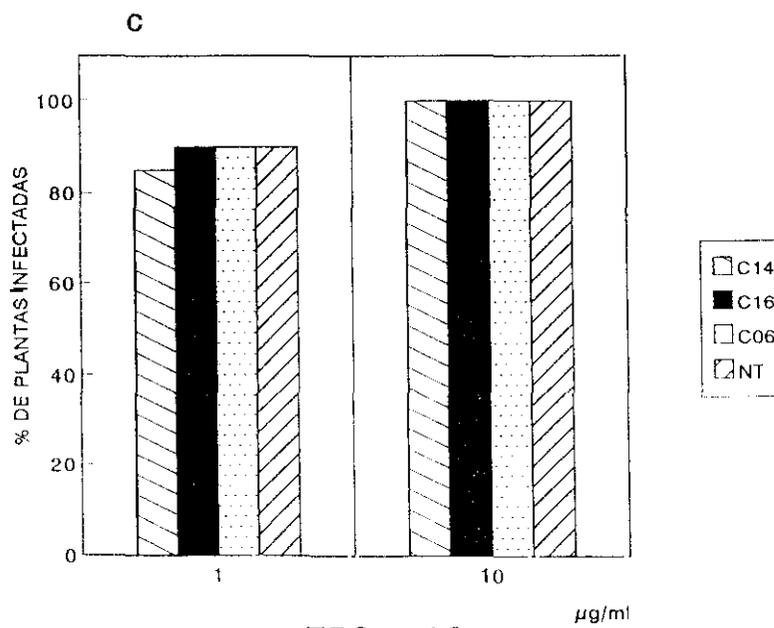
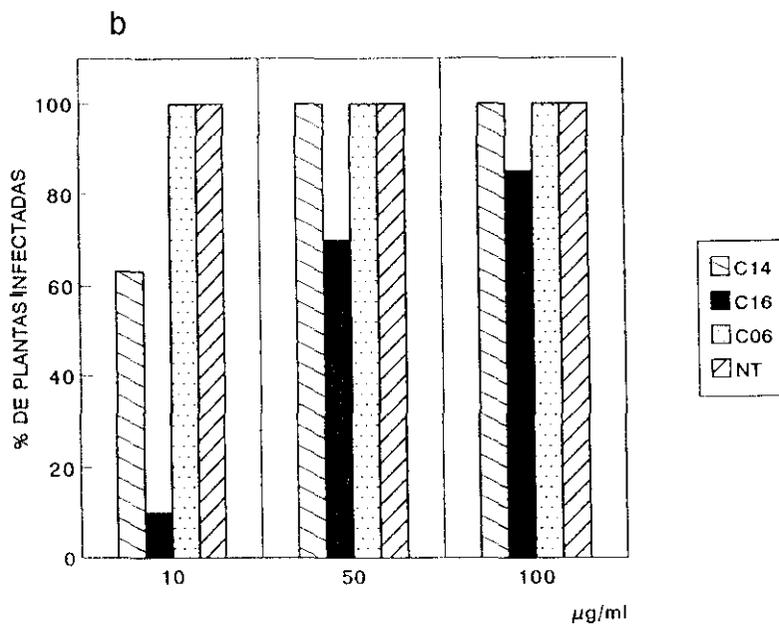
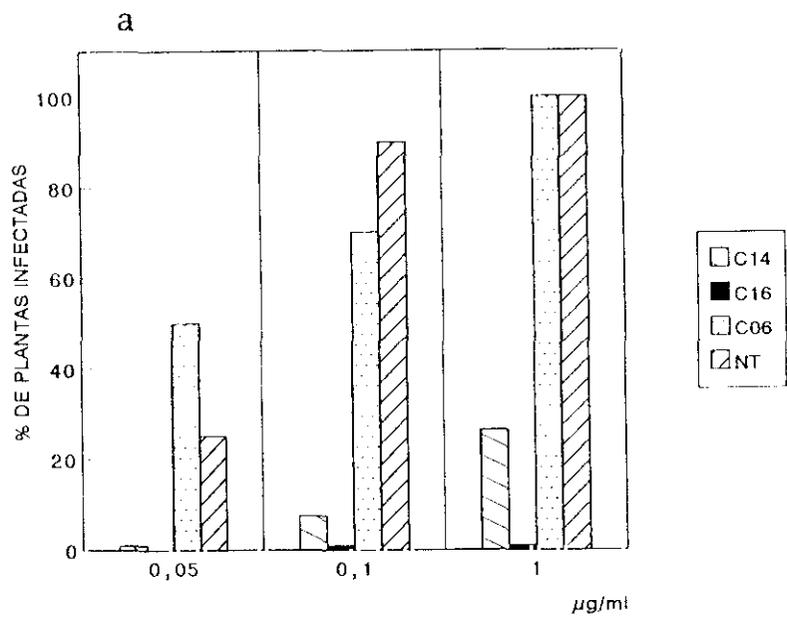


FIG. 10

muy clara, ya que ninguna de las plantas de la línea C16 inoculadas con 0,1 ó 1 $\mu\text{g/ml}$ de virus resultaron infectadas sistémicamente a los 15 d.p.i., al igual que ocurre con las plantas de la línea C14 que se inocularon con 0,05 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, un 8% de las plantas C14 inoculadas con 0,1 $\mu\text{g/ml}$ y un 26% de las inoculadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ estaban infectadas sistémicamente con el virus a los 15 d.p.i. (Fig. 10a)

Para conocer el efecto de la concentración de inóculo sobre las plantas transgénicas, se inocularon plantas de las diferentes líneas con 10, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de PMMoV-S purificado. Todas las plantas de la línea C14 inoculadas con 50 ó 100 $\mu\text{g/ml}$ de virus resultaron infectadas sistémicamente a los 15 d.p.i. Cuando se inocularon con 10 $\mu\text{g/ml}$, se detectó virus en las hojas superiores de un 65% de las plantas, si bien en un 40% de estas plantas infectadas, la concentración de virus era menor (0,3-1 mg/g) que en el 60% restante o en las plantas control (10-20 mg/g). A esta misma concentración de inóculo se infectaron muy pocas plantas de la línea C16, mientras que en las inoculadas con 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ el porcentaje de plantas con virus se incrementó hasta el 70 y 85% respectivamente. Si bien, en este caso hay también un 60% de plantas que acumulan virus a concentraciones inferiores (0,3-1 mg/g) que en el resto de las plantas infectadas o en las plantas control (10-20 mg/g). Finalmente, un 15% de plantas de la línea C16 no se infectaron, incluso al inocularlas con la mayor concentración de PMMoV-S ensayada (Fig. 10b).

Al utilizar como inóculo de estas plantas el RNA desnudo del virus en lugar de la partícula viral, el porcentaje de plantas infectadas de las líneas C14 y C16 es igual al de las C06 y NT, siendo de un 90 y de un 100% cuando se inocula con 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de RNA respectivamente (Fig. 10c).

La sintomatología de las plantas infectadas por PMMoV-S se manifestó como un fuerte arrugamiento de las hojas apicales que puede ir acompañado de malformaciones en estas hojas y enanismo de la planta (Fig. 11). La evolución diaria de los síntomas de las plantas de las distintas líneas inoculadas con virus o RNA viral de PMMoV-S se representa en las figuras 12, 13 y 14.

En las plantas de las líneas C14 y C16 que desarrollaban síntomas, se producían retrasos de entre 3 y 8 días en la aparición de los mismos, incluso cuando la concentración de inóculo era muy alta, tal y como ocurre en las plantas

Fig. 11. Síntomas inducidos por PMMoV-S en las hojas superiores de plantas de *Nicotiana clevelandii* a los 15 d.p.i. **a;** planta sana. **b;** planta infectada.

a



b



FIG. 11

Fig. 12. Porcentaje de plantas con síntomas sistémicos a diferentes d.p.i. en las plantas transgénicas de *N. clevelandii* inoculadas con 0,05 $\mu\text{g/ml}$ (a), 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (b) y 1 $\mu\text{g/ml}$ (c) de PMMoV-S purificado.

El porcentaje que se expresa corresponde a la media de los resultados de tres experimentos independientes con 10 plantas de cada línea.

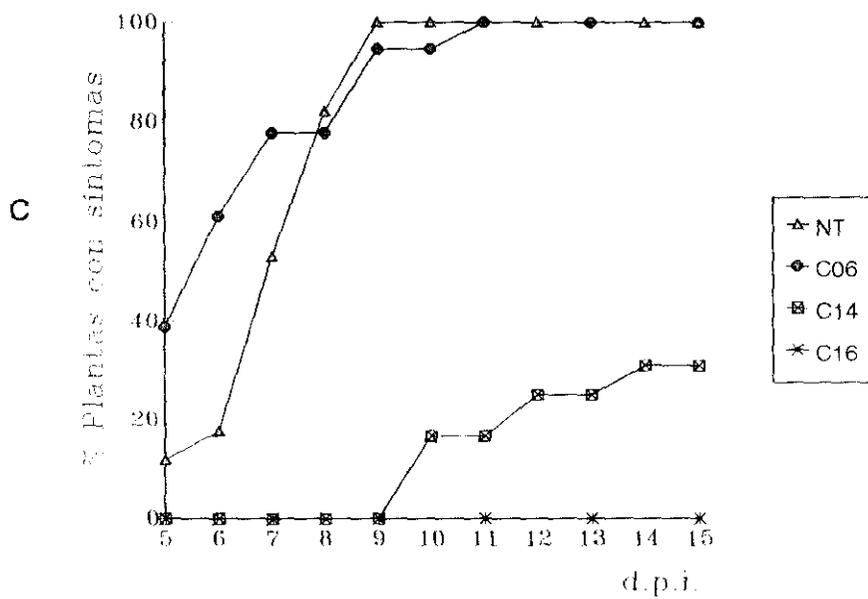
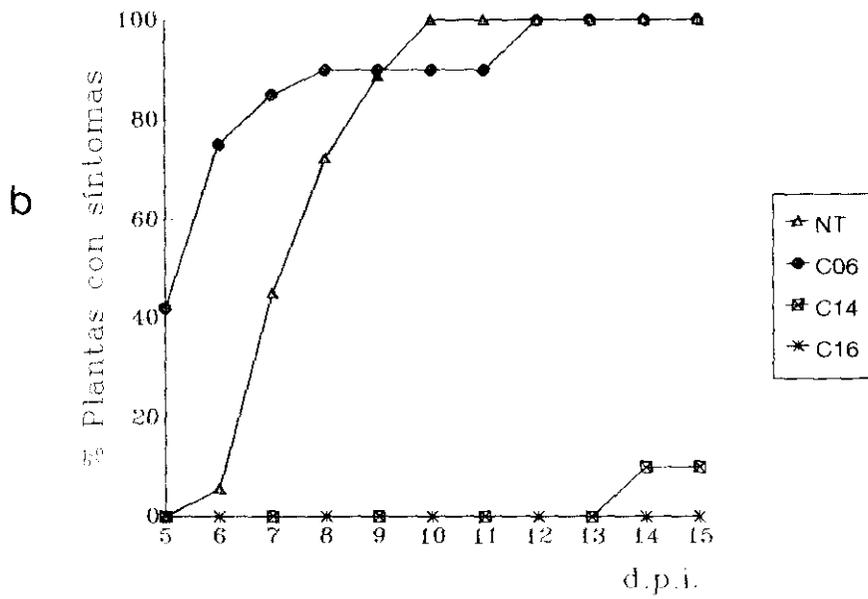
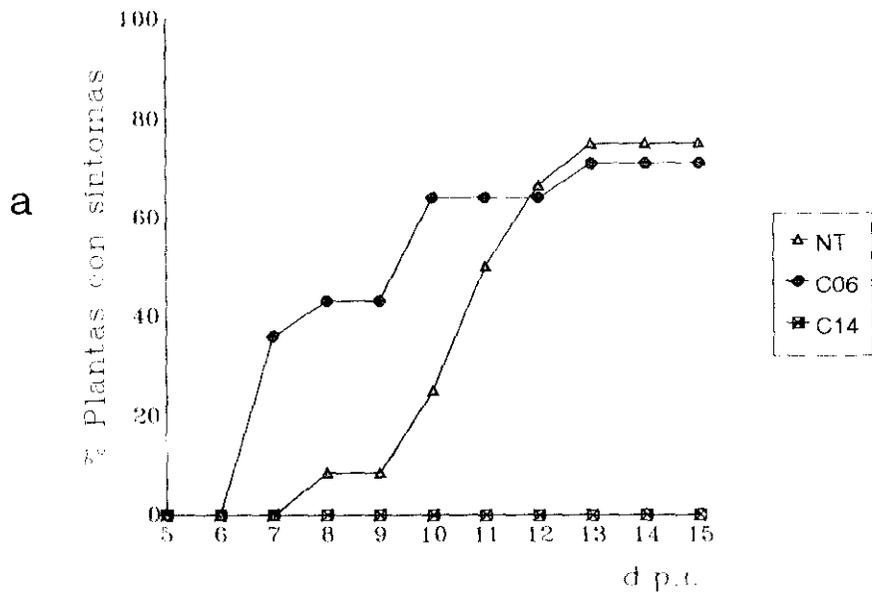


FIG. 12

Fig. 13. Porcentaje de plantas con síntomas sistémicos a diferentes d.p.i. en las plantas transgénicas de *N. clevelandii* inoculadas con 10 $\mu\text{g/ml}$ (a), 50 $\mu\text{g/ml}$ (b) y 100 $\mu\text{g/ml}$ (c) de PMMoV-S purificado. El porcentaje que se expresa corresponde a la media de los resultados de tres experimentos independientes con 10 plantas de cada línea.

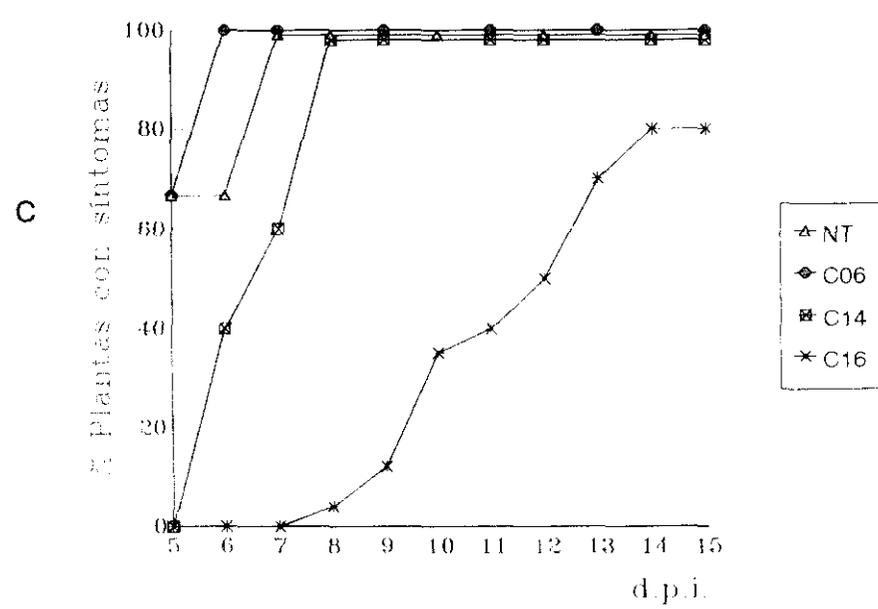
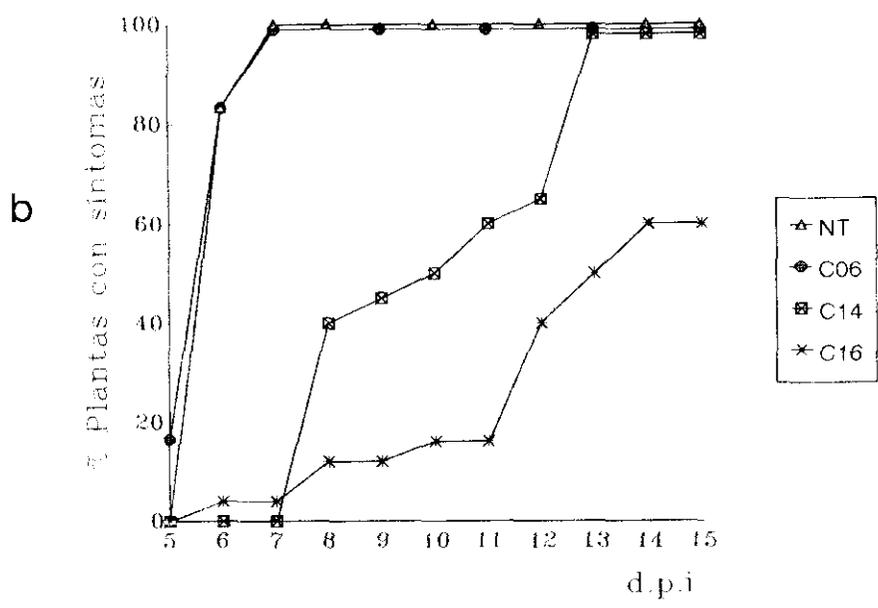
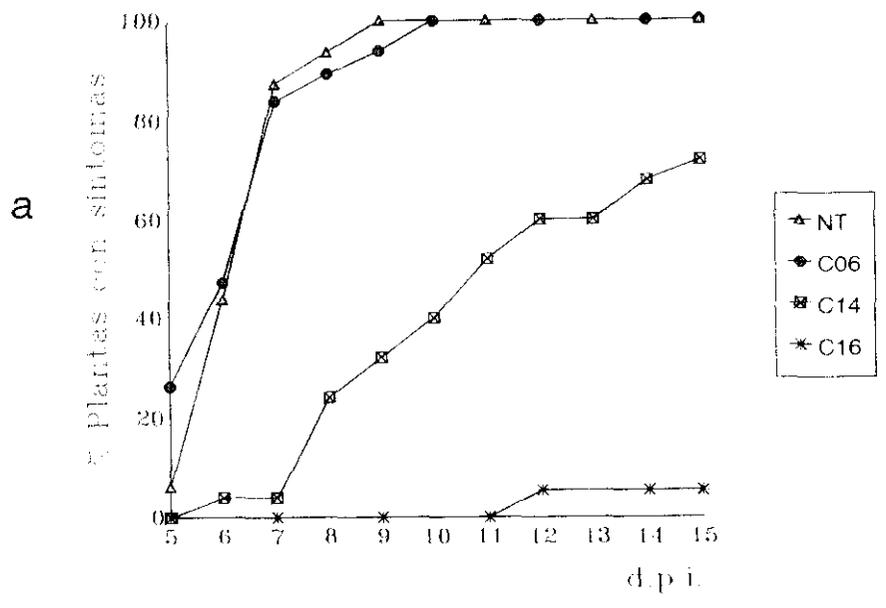


FIG. 13

de la línea C16 inoculadas con 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 13b y 13c). Por otro lado, en las plantas inoculadas con bajas concentraciones de virus y que posteriormente desarrollaban síntomas, se observó una atenuación que se manifestaba en un arrugamiento más suave de las hojas apicales (Fig. 15)

Cuando las plantas se inocularon con RNA del virus no fue posible observar en las líneas C14 y C16 ni retraso (Fig. 14), ni atenuación de síntomas con respecto a las plantas control (Fig. 15)

Fig. 14. Porcentaje de plantas con síntomas sistémicos a diferentes d.p.i. en las plantas transgénicas de *N. clevelandii* inoculadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ (a) y 10 $\mu\text{g/ml}$ (b) de RNA purificado de PMMoV S.

El porcentaje que se expresa corresponde a la media de los resultados de tres experimentos independientes con 10 plantas de cada línea.

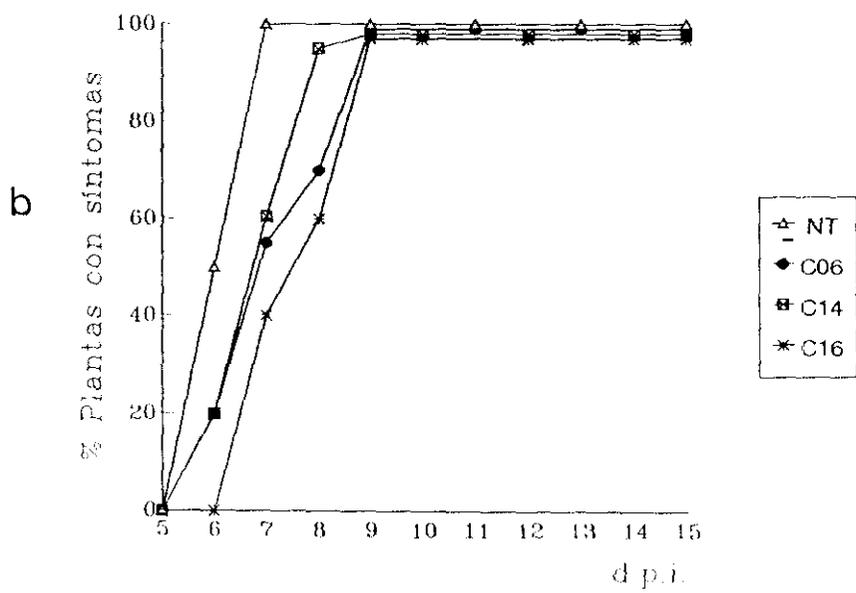
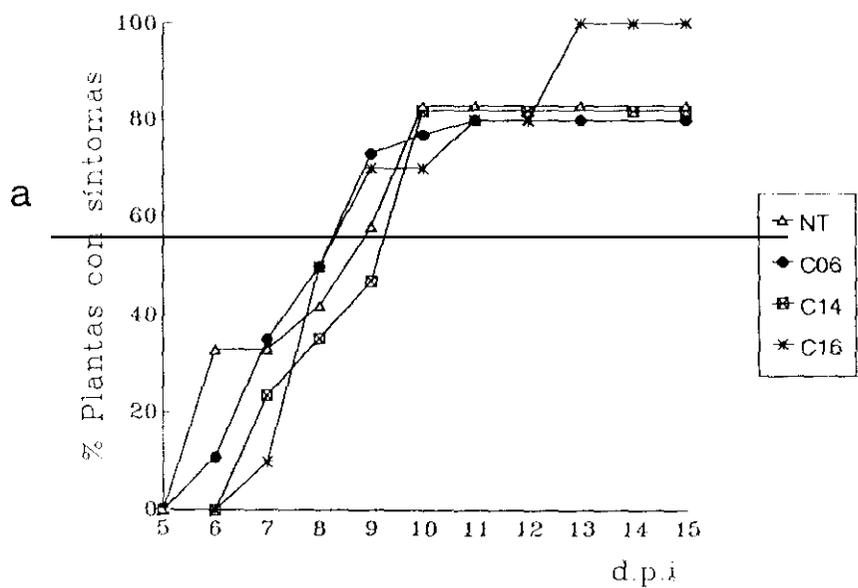


FIG. 14

Fig. 15. Síntomas en las hojas superiores de plantas de *N. clevelandii* transgénicas de las líneas C14, C16 y C06 y de plantas no transgénicas NT. **a;** plantas inoculadas con 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de PMMoV-S. **b;** plantas inoculadas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de PMMoV-S. **c;** plantas inoculadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de RNA purificado de PMMoV-S.

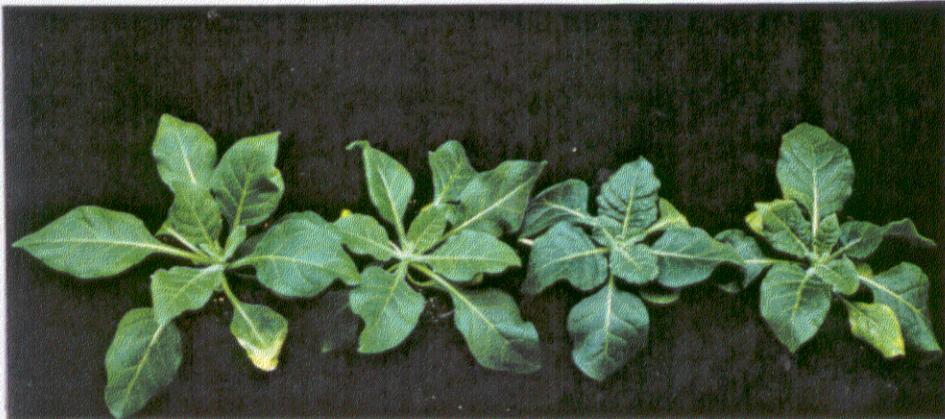
C16

C14

C06

NT

a



b



c

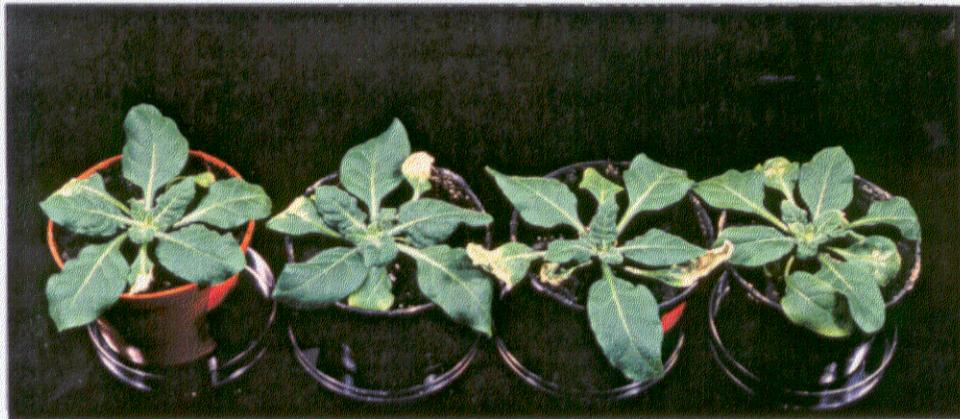


FIG. 15

III.4. DISCUSIÓN

Se ha llevado a cabo la transformación de plantas de *Nicotiana clevelandii* con un gen quimérico de la proteína de la cápsida de PMMoV-S, para lo cual se han utilizado las estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 y C58C1. Los mejores resultados en el proceso de transformación se obtuvieron con la estirpe LBA4404, que portaba el gen quimérico en un vector binario de transformación. La eficacia de los sistemas binarios de transformación se ha comprobado en la transformación de plantas de diferentes especies del género *Nicotiana*, tales como *N. alata* (Edbert y Clark 1990), *N. bentamiana* (Van der Vlugt y col., 1992) y *N. clevelandii* (Regner y col., 1992).

El medio de regeneración de plantas que incluía BA 9 μM y NAA 0,5 μM fue con el que se obtuvieron más brotes transgénicos viables, si bien fue necesaria la adición posterior al medio de cultivo de GA₃ 3 μM , con el fin de que estos brotes pudieran elongar para su posterior enraizamiento. La utilización de la giberelina fue absolutamente necesaria en nuestro caso a diferencia de lo descrito por Tavazza y col., (1988). El carácter arrosetado, sin apenas tallo, de la variedad de *N. clevelandii* empleada por nosotros, puede ser la causa del requerimiento de un aporte exógeno de giberelinas para favorecer la elongación de las plantas.

Se han conseguido de esta forma plantas transgénicas que expresaban de forma constitutiva la CP de PMMoV-S. Se han seleccionado las líneas C14 y C16, de baja y alta expresión de la CP de PMMoV-S respectivamente, de manera que la cantidad relativa de esta proteína respecto al total de proteínas solubles de la planta es de 0,04% en las plantas de la línea C14 y de 0,38% en las de la línea C16. Esta gran diferencia entre líneas de plantas transformadas con el mismo gen quimérico se observa también en plantas de tabaco transformadas con el gen de la proteína de la cápsida de TMV (Powel y col., 1986 y 1990), y de AMV (Loesch-Fries y col., 1987; Tumer y col., 1987), donde las diferencias de expresión entre distintas líneas de plantas transgénicas están relacionadas con el número de copias del gen quimérico que se insertan en el genoma de la planta. Sin embargo esto no parece ocurrir en las líneas C14 y C16, pues en ambas la herencia del gen NPTII es 3:1, y se transmitió a la descendencia ligado al gen quimérico de la proteína de

la cápsida. Esto indicaría que las dos líneas contienen un único locus activo para ambos genes, si bien no podemos descartar la posible existencia de más de una copia del gen en locis muy próximos. No siempre el número de copias de un gen actúa de forma positiva en la expresión de éste, así Hobbs y col., (1993) obtienen líneas de plantas con expresión elevada del gen *uidA* con una única copia situada en un único locus y plantas de expresión baja con dos copias del gen insertadas en el mismo locus de forma invertida.

Otra posible explicación de la diferente expresión de un mismo gen quimérico en distintas líneas de plantas transgénicas esta relacionada con la cantidad de mRNA detectado en las plantas, o lo que es lo mismo con los niveles de transcripción del gen y/o de la estabilidad del mensajero, tal y como observaron Stark y Beachy (1989), en diferentes líneas de tabaco transformadas con el gen de la proteína de la cápsida de SMV. Se ha comprobado que el promotor 35S de CaMV presenta múltiples elementos reguladores, cada uno de los cuales puede estar afectado de forma diferente según su posición en el cromosoma, pudiendo ser esta la causa de la diferente expresión de los genes quiméricos en las plantas transgénicas (Bentf y Chua, 1989).

En las hojas de plantas de las líneas transgénicas C14 y C16, inoculadas con concentraciones pequeñas de PMMoV-S, se observó a distintos d.p.i. una menor acumulación de virus con respecto a las hojas de las plantas control, hasta el punto de no poder ser detectado en la mayoría de las plantas analizadas. Esta reducción en la cantidad de virus acumulado en hojas inoculadas se ha observado también en las hojas de plantas transgénicas que expresaban la CP de TMV (Nelson y col., 1987), AMV (Tumer y col., 1987), CMV (Cuozzo y col., 1988), PVX (Hemenway y col., 1988 ; Hoekema y col., 1989) y PVY (Lawson y col., 1990) cuando se inoculan con sus correspondientes virus.

La reducción de la cantidad de virus en las hojas inoculadas de plantas transgénicas, al menos en el caso de TMV, parece estar relacionada con la imposibilidad del virus de establecer puntos de infección en la hoja, más que en la capacidad de éste para moverse de una célula a otra (Wisniewski y col., 1990). De manera que la CPMP actuaría en las plantas a un nivel muy temprano de la infección viral (Register III y Beachy. 1988 ; Register III y col., 1989 ; Register III y Nelson, 1992), posiblemente impidiendo el desnudamiento de la secuencia del

RNA viral correspondiente al extremo 5' (Mundry y col., 1991), tal y como se ha demostrado en protoplastos de plantas que expresaban la CP de TMV, infectados con este virus (Osbourn y col., 1989b; Wu y col., 1990). En el caso de las líneas C14 y C16 la CPMP frente a PMMoV-S podría también estar actuando impidiendo el desnudamiento del RNA viral tal y como se desprende del hecho de que al inocular estas plantas con RNA de PMMoV-S, no se observaron diferencias apreciables respecto a las plantas control, tanto en los porcentajes de plantas infectadas a los 15 d.p.i., como en el desarrollo de los síntomas. Un resultado similar se obtiene en las plantas de tabaco que expresan la proteína de la cápsida de TMV (Nelson y col., 1987), y en los protoplastos de estas plantas (Register III y Beachy, 1988). Sin embargo en otros casos la CPMP sí es efectiva cuando se inoculan las plantas con RNA viral, como sucede en plantas de tabaco que expresan la proteína de la cápsida de PVX (Hemenway y col., 1988), o de AMV (Tumer y col., 1991), lo cual parece indicar un mecanismo de protección distinto al de TMV y PMMoV-S.

En las plantas transgénicas de las líneas C14 y C16, en las que no se detectó virus en las hojas inoculadas, tampoco fue posible detectar virus en las hojas superiores. Por otra parte, se observó una correlación entre la acumulación de virus en hojas superiores y el desarrollo de los síntomas, de tal forma que los porcentajes de plantas sin síntomas a los 15 d.p.i., coincidía en gran medida con los porcentajes de plantas que no presentaban virus en las hojas superiores a los mismos d.p.i. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en las plantas transgénicas de *N. tabacum* cv. Xanthi que expresan la CP de TMV y en las que también las dos manifestaciones más frecuentes de la CPMP, la ausencia de virus sistémico y la ausencia de síntomas, están relacionadas con la reducción en la cantidad de virus en las hojas inoculadas (Nelson y col., 1987).

No todas las plantas de la línea C14 fueron resistentes a la infección con bajas concentraciones de PMMoV-S, de manera que en las plantas de la población P1, un 8% de las inoculadas con 0,1 $\mu\text{g/ml}$ y un 26% de las inoculadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ presentaban virus en las hojas superiores. Estos porcentajes coincidían con los de las plantas que mostraban síntomas a los 15 d.p.i., si bien en estas plantas se observó también una cierta protección, ya que además de ser menor la cantidad de virus detectado respecto a las plantas control, se apreció un retraso en la

inducción de síntomas y una atenuación de éstos, al igual que ocurre en la CPMP de plantas de tabaco frente a TMV (Beachy y col., 1990).

Por otro lado, en las plantas de la línea C14 correspondientes a la población P1 se observó un retraso en la cinética de acumulación de virus en hojas superiores, no pudiendo ser detectado hasta los 10 d.p.i., mientras que en las plantas control era detectado a partir de los 4 d.p.i. El retraso observado en la acumulación de virus en hojas superiores y en la inducción de síntomas en las plantas P1 de la línea C14 no parecen ser la consecuencia de un retraso en la acumulación de virus en las hojas inoculadas, ya que tanto en estas plantas como en las plantas control el virus se detecta a partir de los 5 d.p.i. Este hecho parece indicarnos que además de un efecto sobre fases tempranas de la infección viral que se manifestaría en las hojas inoculadas, la CPMP podría actuar también sobre fases más tardías, como puede ser el movimiento a larga distancia del virus. Los estudios realizados por Wisniewski y col., (1990), en plantas de tabaco que expresan la CP de TMV revelan también que fases tardías de la infección viral se ven afectadas en la CPMP.

Cuando se incrementaron las concentraciones de inóculo, el porcentaje de plantas infectadas fue mayor en las dos líneas transgénicas C14 y C16. Por otra parte, la línea C16 soporta una concentración de inóculo diez veces superior a la que soporta la línea C14, pudiéndose establecer una relación prácticamente lineal entre la concentración de inóculo para la que no es efectiva la protección y la concentración de proteína de la cápsida constitutiva. La relación entre la cantidad de proteína de la cápsida viral que se expresa en plantas transgénicas y el grado de resistencia de éstas frente al virus del cual procede, se ha demostrado en todos los estudios realizados de CPMP frente a TMV (Nejidat y Beachy. 1989 ; Powell y col., 1990; Beachy y col., 1990). Sin embargo Kaniewski y col., (1990), en experimentos de campo realizados con plantas de patata que expresaban los genes de la proteína de la cápsida de PVX y PVY no observaron relación entre el nivel de expresión de la CP de PVX y el grado de resistencia frente a este virus, de forma que la línea que menos proteína expresaba era la más resistente al virus. Por otro lado, plantas de tabaco transformadas con genes que codifican transcritos no traducibles o genes truncados de la proteína de la cápsida de TEV (Lindbo y Dougeherty. 1992), ZYMV (Fang y Grumet, 1993), o TSWV (De Haan y col.,

1992), son resistente a la infección por estos virus, todo lo cual parece indicar que en estos casos la protección es el resultado de la actuación directa del RNA del transgen y no de la proteína.

Si bien la CPMP podría actuar mediante múltiples mecanismos, y operar con diferente eficacia en las distintas plantas transgénicas y en los diferentes sistemas virus/huésped, de este estudio se deduce que los mecanismos de protección que actúan en el sistema PMMoV-S/*Nicotiana clevelandii* son similares a los que actúan en las distintas combinaciones TMV/*Nicotiana* spp. que han sido ensayados con anterioridad.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS DE LA PROTECCIÓN FRENTE A LA INFECCIÓN POR TMV, PaMMV Y PMMoV-I EN PLANTAS DE *N. clevelandii* TRANSFORMADAS CON EL GEN DE LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE PMMoV-S.

IV.1. INTRODUCCIÓN

Plantas transgénicas que expresan el gen que codifica la proteína de la cápsida de un virus, generalmente no solo resultan protegidas de la infección por este virus, sino que además presentan distintos grados de protección frente a la infección por otros virus más o menos relacionados, fenómeno conocido como "protección heteróloga" (Nelson y col., 1987, 1988; Van Dun y Bol, 1988; Anderson y col., 1989; Stark y Beachy, 1989; Nejidat y Beachy 1990; Ling y col., 1991). Esta protección es mayor cuanto mayores son los porcentajes de homología de las secuencias aminoacídicas de las proteínas de la cápsida de los virus heterólogos con la que se expresa de forma constitutiva en las plantas transgénicas. Así, plantas de tabaco transgénicas que expresan la proteína de la cápsida de TMV presentan elevados niveles de protección frente a virus de alta homología de secuencia aminoacídica como ToMV y PMMoV, y niveles bajos de protección frente a virus de baja homología de secuencia aminoacídica como el virus de las manchas anulares del *Odontoglossum* (ORSV; odotoglossum ringspot virus) y el virus del mosaico del plantago (RMV; ribgrass mosaic virus) (Nejidat y Beachy, 1990). Por otra parte la inoculación de estas plantas con virus no relacionados con TMV como PVX, PVY y AMV dio como resultado un escaso grado de protección, que se manifestaba en un retraso en la inducción de los síntomas (Anderson y col., 1989).

No siempre la CPMP frente a virus heterólogos esta relacionada con el grado de homología de secuencia aminoacídica entre las proteínas de las cápsidas, tal y como ocurre en las plantas de tabaco transformadas con los genes de la proteína de la cápsida de la estirpe C de CMV (Quemada y col., 1991), o con los genes de las proteínas de la cápsida de los potyvirus SMV (Stark y Beachy, 1989), PRSV (Ling y col., 1991), o LMV (Dinat y col., 1993), en las que se observa un mayor grado de protección frente a virus con menor homología de secuencia aminoacídica de sus CP, que frente a virus heterólogos en los que ésta es mayor.

Los diferentes tobamovirus descritos como patotipos que infectan las plantas de *Capsicum* spp. presentan diferentes grados de homología entre las secuencias aminoacídicas de sus proteínas de la cápsida (García-Luque y col.,

1993), siendo por tanto de extraordinaria importancia determinar la eficacia que puede tener la protección mediada por la proteína de la cápsida de PMMoV-S frente a los distintos patotipos.

En las plantas de pimiento y tabaco inoculadas con mezclas de los diferentes virus representantes de los patotipos P_1 , $P_{1,2}$ y $P_{1,2,3}$, se ha observado coexistencia de estos virus en las hojas infectadas. Si bien en las diferentes muestras analizadas de plantas pimiento procedentes del campo, no se han encontrado dos patotipos infectando la misma planta, no podemos descartar, a la vista de los resultados obtenidos sobre la coexistencia de estos virus, la posibilidad de que se puedan producir infecciones mixtas de dos o más patotipos diferentes (Tenllado, 1995).

En este capítulo se estudia el efecto de la inoculación con TMV (patotipo P_0), PaMMV (patotipo P_1) y PMMoV-I (patotipo $P_{1,2,3}$) sobre plantas de *N. clevelandii* que expresan el gen de la proteína de la cápsida de PMMoV-S (patotipo $P_{1,2}$), tratando de determinar la existencia en estas plantas de protección heteróloga frente a estos virus y la posible relación de ésta con el grado de homología de las secuencias aminoacídicas y nucleotídicas de los distintos patotipos.

Por otra parte se estudia la CPMP en estas plantas frente a la infección con inóculos mixtos constituidos por PMMoV-S y TMV o PaMMV, con el fin de conocer qué efecto tiene sobre la protección, la infección de las plantas transgénicas con dos virus representantes de diferentes patotipos.

IV.2. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.2.1. PLANTAS Y VIRUS.

Se han utilizado plantas transgénicas de la generación R₁ de *Nicotiana clevelandii* Gray de las líneas C14 y C16, transformadas con el gen de la proteína de la cápsida de PMMoV-S, las cuales se seleccionaron en presencia de kanamicina, tal y como se describe en el apartado III.2.8. Como controles se utilizaron plantas transgénicas de la línea C06 y plantas no transgénicas NT.

La estirpe U1 del virus del mosaico del tabaco (TMV) fue cedido por el Prof. Dr. F. García-Arenal (E.T.S.I. Agrónomos. U.P. Madrid). El virus del moteado suave del pimiento estirpe I (PMMoV-I) es un aislado italiano del PMMoV cedido por el Dr. M. Conti (Italia) (Wetter y col., 1984). El virus del moteado suave de la páprika (PaMMV) es un aislado holandés cedido por el Dr. A. Th. B. Rast (Holanda) (Tobias y col., 1982). Los virus se mantuvieron en forma de desecado en nuestro laboratorio y se propagaron en plantas de *Nicotiana clevelandii* Gray.

IV.2.2. PURIFICACIÓN DE TMV, PaMMV Y PMMoV-I.

Los tres virus se purificaron a partir de plantas de *Nicotiana clevelandii* infectadas con cada uno de los virus. El método de purificación seguido es el descrito en el apartado I.2.2. para la purificación de TMV. Los rendimientos obtenidos para cada uno de los virus fueron de 7-11 g/kg de TMV, de 3-5 g/kg de PaMMV y de 1-3 g/kg de PMMoV-I.

IV.2.3. PREPARACIÓN DE INMUNOSUEROS 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.

Los sueros frente a TMV y PaMMV fueron obtenidos en conejos albinos de la raza Nueva Zelanda siguiendo la misma pauta de inmunización que la descrita

para PMMoV-S. A partir de estos inmunosueros se purificaron las correspondientes inmunoglobulinas G (IgG), parte de las cuales se conjugaron con fosfatasa alcalina (IgG-FA). Las concentraciones de las IgG, IgG-FA, muestras y sustrato, empleadas en los sistemas ELISA-DAS para detectar y cuantificar TMV y PaMMV, se determinaron de forma empírica. Todos los métodos utilizados son iguales a los descritos para PMMoV-S en los apartados III.2.3. y III.2.4

IV.2.4. ANÁLISIS DE LA PROTECCIÓN MEDIADA POR LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE PMMoV-S FRENTE A TMV, PaMMV Y PMMoV-I .

En cada experimento, 10 plantas transgénicas de 30 días de edad, de la generación R₁ de *N. clevelandii* de las líneas C14, C16 y CO6, y 10 plantas no transgénicas NT, se inocularon en las dos primeras hojas verdaderas completamente expandidas con 20 μ l de TMV, PaMMV o PMMoV-I a diferentes concentraciones en tampón de inoculación¹. De todas las plantas inoculadas se tomaron muestras de las hojas superiores a los 15 d.p.i. El desarrollo de los síntomas en las plantas inoculadas con cada uno de estos virus se siguió diariamente hasta los 15 d.p.i.

Los niveles de acumulación de los virus en hojas inoculadas y superiores se cuantificaron por ELISA-DAS. El análisis de la acumulación de PMMoV-I se realizó utilizando las inmunoglobulinas específicas (IgG e IgG-FA) de PMMoV-S y a las diluciones descritas en el apartado III.2.4. Para el análisis de la acumulación de TMV y PaMMV se emplearon sus correspondientes IgG a la concentración de 1-2 μ g/ml, e IgG-FA a 5 μ g/ml. En todos los ensayos se incluyó una escala de concentraciones conocidas de cada virus 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)

¹ Tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7

IV.3. RESULTADOS

IV.3.1. ELISA-DAS PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE TMV, PaMMV Y PMMoV-I.

La comparación mediante ELISA-DAS de los distintos virus frente al inmunosuero de PMMoV-S permitió comprobar la existencia de una fuerte reacción cruzada de este inmunosuero con PMMoV-I, mientras que no existía ninguna reacción con los otros dos virus (Fig. 1a). Por este motivo para la detección y cuantificación de PMMoV-I se utilizó el mismo sistema que el desarrollado para PMMoV-S, mientras que para TMV y PaMMV fue necesario establecer sistemas específicos. Al comparar los diferentes virus frente a los inmunosueros específicos de TMV y PaMMV se observó también la especificidad de ambos inmunosueros, los cuales o bien reaccionaban débilmente con los virus heterólogos o bien reaccionaban solo con el virus homólogo (Figs. 1b y 1c).

La sensibilidad de los sistemas ELISA-DAS permitió detectar 7 ng de cada uno de los virus.

IV.3.2. PROTECCIÓN MEDIADA POR LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE PMMoV-S FRENTE A TMV EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *N. clevelandii*.

Se inocularon 10 plantas de la generación R₁ de las líneas transgénicas C14, C16 y C06, así como 10 plantas no transgénicas NT, con 0,05 y 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de TMV purificado, y se recogieron muestras de las hojas inoculadas a 3, 5 y 7 d.p.i. para cuantificar por ELISA-DAS los niveles de acumulación del virus (Fig. 2).

En las hojas de las plantas control, C06 y NT inoculadas con ambas concentraciones de TMV se observó un patrón creciente de acumulación de proteína de la cápsida viral, que es mayor a los 3 y 5 d.p.i. en las plantas inoculadas con 0,1 $\mu\text{g/ml}$ que en las inoculadas con 0,05 $\mu\text{g/ml}$, siendo la cantidad máxima detectada a los 7 d.p.i. de $882,4 \pm 63,3 \mu\text{g}$ de virus/g de tejido foliar.

Las plantas transgénicas de la línea C14 siguieron un patrón de acumulación similar al descrito en las plantas control, tan solo se observaron diferencias a los

Fig. 1. Densidades ópticas a 405 nm, obtenidas en los ensayos ELISA-DAS específicos de PMMoV-S (**a**), TMV (**b**) y PaMMV (**c**), utilizando concentraciones crecientes de virus purificados.

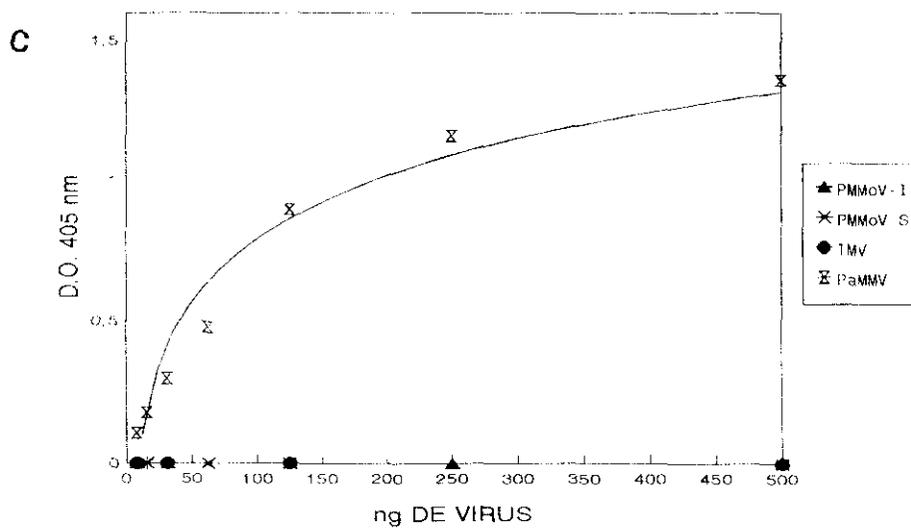
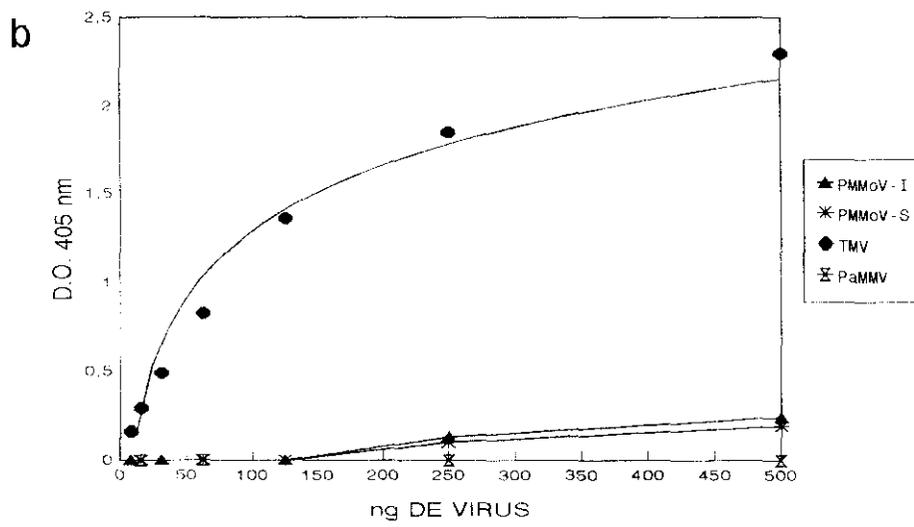
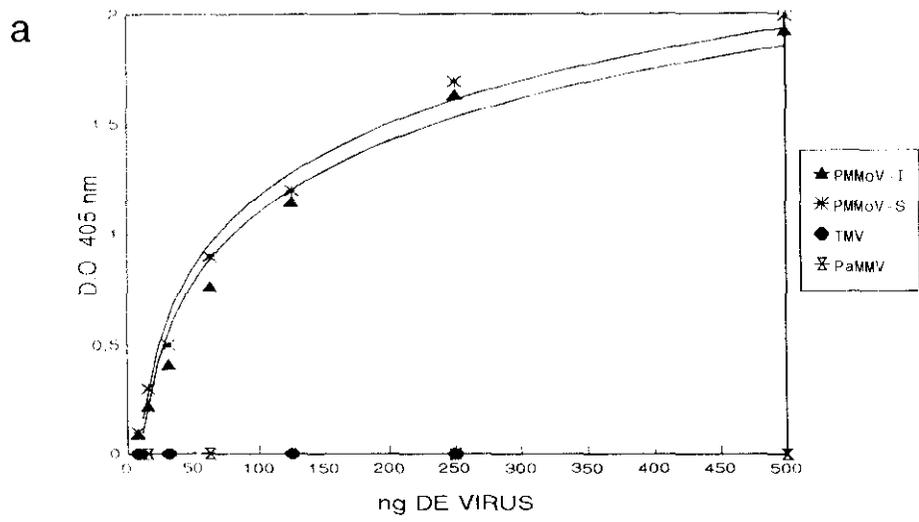


FIG. 1

Fig. 2. Acumulación viral en las hojas de plantas transgénicas de *N. clevelandii* inoculadas con 0,05 $\mu\text{g/ml}$ (izquierda) y 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (derecha) de TMV. Las muestras se recogieron a los 3 (**a**), 5 (**b**) y 7 (**c**) días postinoculación y se analizaron por ELISA-DAS.

Los valores representados son la media de los resultados de tres experimentos independientes y de 10 plantas de cada línea analizadas en cada experimento. Los valores numéricos se representan en la tabla inferior con su correspondiente error estándar.

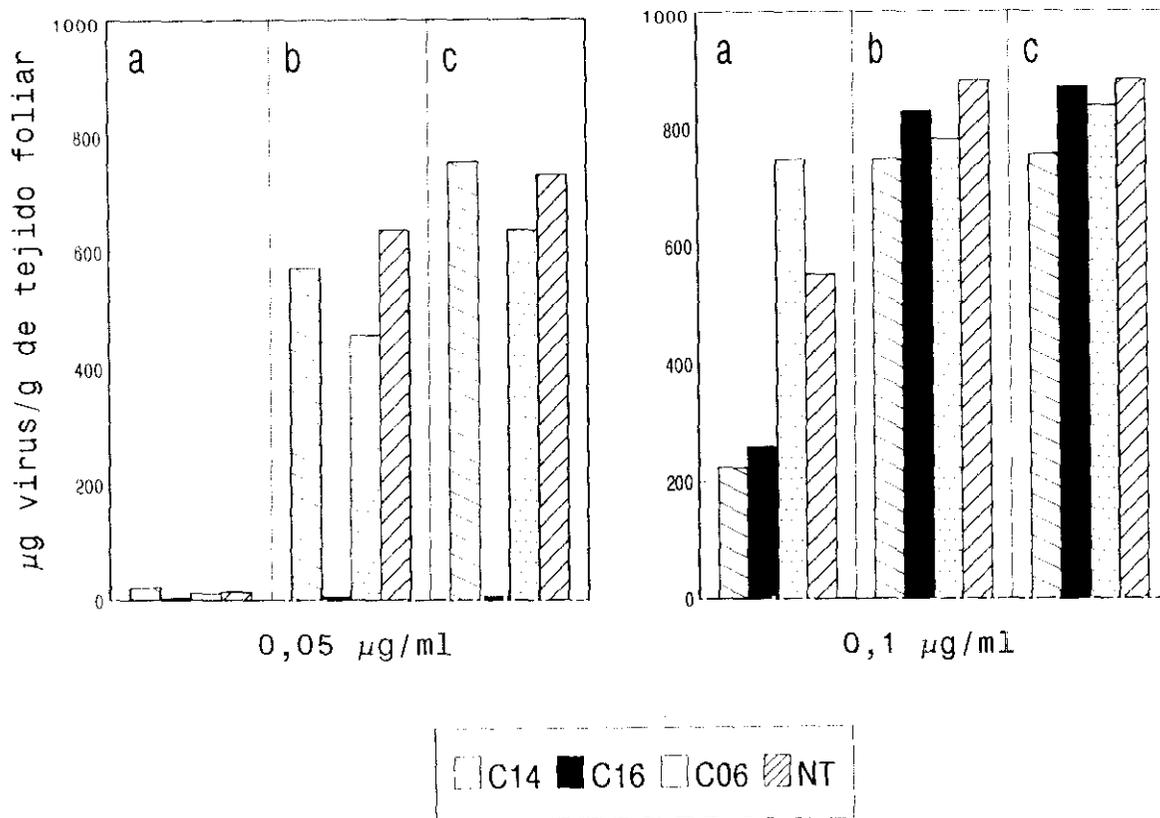


FIG. 2

| | 0,05 µg/ml | | | 0,1 µg/ml | | |
|-----|-------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| | 3 DPI | 5 DPI | 7 DPI | 3 DPI | 5 DPI | 7 DPI |
| C14 | 21 ± 30,5 | 571 ± 83,2 | 755,5 ± 124,8 | 223,5 ± 92,7 | 748,2 ± 40,8 | 756,3 ± 45,7 |
| C16 | 3,5 ± 3,9 | 5,25 ± 3,4 | 5,25 ± 3,43 | 258,3 ± 71,9 | 829,8 ± 74,8 | 869,6 ± 84,6 |
| C06 | 11,5 ± 11,3 | 456,5 ± 75,6 | 635,6 ± 133 | 748,3 ± 93,2 | 782,6 ± 87,6 | 837,6 ± 61 |
| NT | 14,3 ± 14,5 | 535,5 ± 105,6 | 732,6 ± 116,4 | 551,3 ± 131 | 881,4 ± 77,7 | 882,4 ± 65,3 |

(f) µg de virus/g de tejido foliar : media ± error estándar

3 d.p.i. en las plantas que fueron inoculadas con $0,1 \mu\text{g/ml}$ de virus, en las que se detectó una concentración de $223,5 \pm 92,7 \mu\text{g}$ de virus/g de tejido foliar, sensiblemente menor a los $748,3 \pm 93,2$ detectados en las plantas de la línea C06.

En algunas de las plantas de esta línea, inoculadas con la concentración $0,05 \mu\text{g/ml}$ de virus, no se observó acumulación de virus en las hojas inoculadas a ninguno de los tiempos analizados, ni tampoco presentaron síntomas posteriormente. Este hecho pudo observarse también en algunas plantas control debido, probablemente en ambos casos, a la baja concentración de inóculo utilizada.

En las hojas de las plantas de la línea C16 inoculadas con $0,1 \mu\text{g/ml}$ de TMV se detectaron concentraciones de virus a los 3, 5 y 7 d.p.i. similares a las detectadas en las plantas de la línea C14, observándose también una menor acumulación de virus a los 3 d.p.i., y siendo prácticamente iguales a las detectadas en las plantas control, a los 5 y 7 d.p.i. Este resultado contrasta con lo que ocurre cuando las plantas se inocularon con $0,05 \mu\text{g/ml}$, ya que en este caso no se detectó acumulación de virus a ninguno de los tiempos estudiados en la mayoría de las plantas que fueron analizadas, si bien en un pequeño porcentaje de las mismas se pudo detectar la presencia de TMV.

Con el fin de conocer el porcentaje de plantas que resultaron infectadas sistémicamente por TMV, se inocularon 10 plantas de las líneas transgénicas C14, C16, C06 y 10 plantas no transgénicas NT, con $0,05$, $0,1$ y $1 \mu\text{g/ml}$ de TMV purificado y a los 15 d.p.i. se tomaron muestras de las hojas superiores para analizar por ELISA-DAS la presencia de virus (Fig 3)

Cuando las plantas se inocularon con la concentración de $1 \mu\text{g/ml}$ tanto las plantas control como las de las líneas C14 y C16 resultaron infectadas sistémicamente a los 15 d.p.i. (Fig. 11a). Al inocular con $0,1 \mu\text{g/ml}$ de virus el porcentaje de plantas infectadas de las líneas C14 y C16 se redujo al 70 y 60 % respectivamente. Este porcentaje se mantiene en la línea C14 al inocular las plantas con $0,05 \mu\text{g/ml}$ y es muy similar al de las plantas C06 y NT. Solamente en las plantas de la línea C16 inoculadas con esta concentración se observó una importante reducción en el porcentaje de plantas infectadas, quedando establecido en un 20%.

Los síntomas que produce la infección de TMV en *N. clevelandii* son,

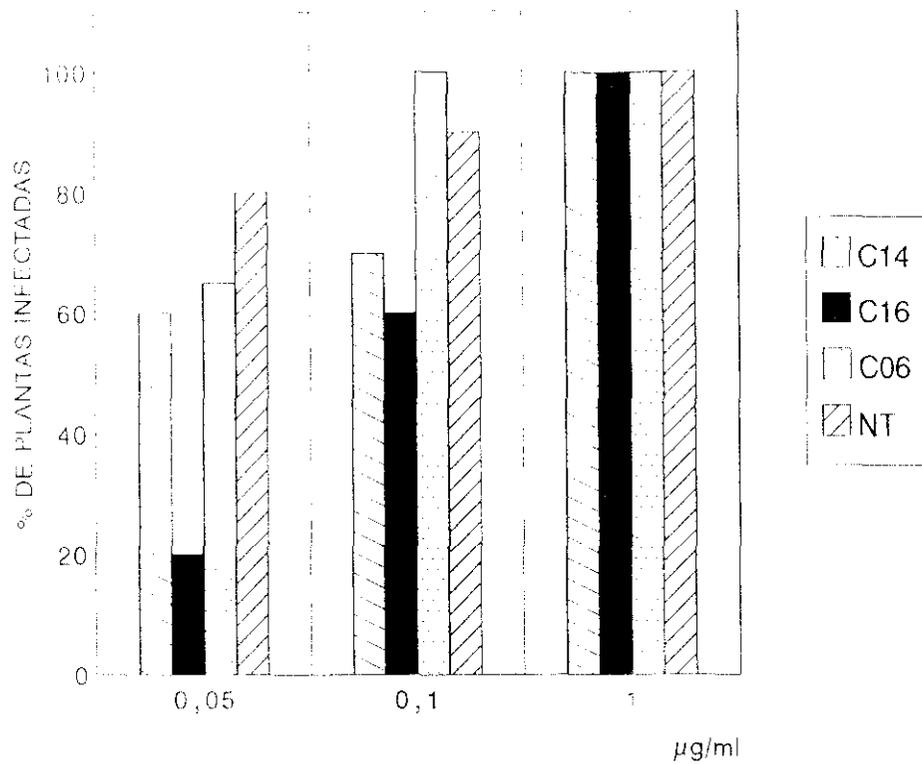


FIG. 3. Porcentaje de plantas transgénicas de *Nicotiana clevelandii* infectadas con TMV, a los 15 d.p.i. Las plantas se inocularon con 0,05, 0,1 y 1 µg/ml de virus. La presencia o ausencia de virus en las hojas superiores se analizó por ELISA-DAS. Los valores representados son la media de los resultados de tres experimentos independientes y de 10 plantas de cada línea analizadas en cada experimento.

arrugamiento de hojas apicales, malformaciones, enanismo de la planta y en numerosas ocasiones necrosis apical y total de la planta (Fig. 4).

El seguimiento diario de los síntomas de las plantas de las distintas líneas inoculadas con diferentes concentraciones de TMV se representa en las gráficas de la Fig. 5.

Con las diferentes concentraciones ensayadas se pudo observar que el porcentaje de plantas con síntomas a los 15 d.p.i. fue muy similar al de plantas que acumulaban virus en las hojas superiores a los mismos días posteriores a la inoculación.

Solamente un 20% de plantas de la línea C16, inoculadas con 0,05 $\mu\text{g/ml}$ de virus, desarrollaron síntomas, aunque en este caso se produjo un retraso de tres días en la aparición de los mismos, que además fueron más suaves que los inducidos en las plantas de la línea C14 o en las plantas control. Cuando las plantas se inocularon con 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de virus, no se observó un retraso apreciable en el desarrollo de síntomas en las plantas de las líneas C14 y C16 con respecto a las plantas control, ni tampoco una atenuación de los mismos, si bien había un 40% de plantas que no presentaban síntomas a los 15 d.p.i. Todas las plantas que se inocularon con 1 $\mu\text{g/ml}$ de virus, desarrollaron los síntomas a los mismos d.p.i. y la severidad de éstos fue igual en todas ellas.

IV.3.3. PROTECCIÓN MEDIADA POR LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE PMMoV-S FRENTE A PaMMV EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *N. clevelandii*.

Se inocularon 10 plantas de las líneas transgénicas C14, C16 y C06 y 10 plantas no transgénicas NT, con 0,1 y 1 $\mu\text{g/ml}$ de PaMMV purificado. En la Fig. 6 se pueden observar los porcentajes de plantas de las distintas líneas que resultaron infectadas sistémicamente por PaMMV a los 15 d.p.i.

La inoculación de plantas control con 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de virus dio como resultado un 55% de plantas infectadas de la línea C06 y un 75% de plantas infectadas de la línea NT, a los 15 d.p.i. La inoculación, con esta misma concentración de virus, de plantas de las líneas C14 y C16 dio como resultado unos porcentajes de infección del 25 y 18% respectivamente, a los mismos días posteriores a la inoculación. Al aumentar diez veces la concentración de inóculo, prácticamente

Fig. 4. Síntomas inducidos por TMV en las hojas superiores de plantas de *Nicotiana clevelandii* a los 15 d.p.i. **a;** planta sana. **b;** planta infectada.

a



b

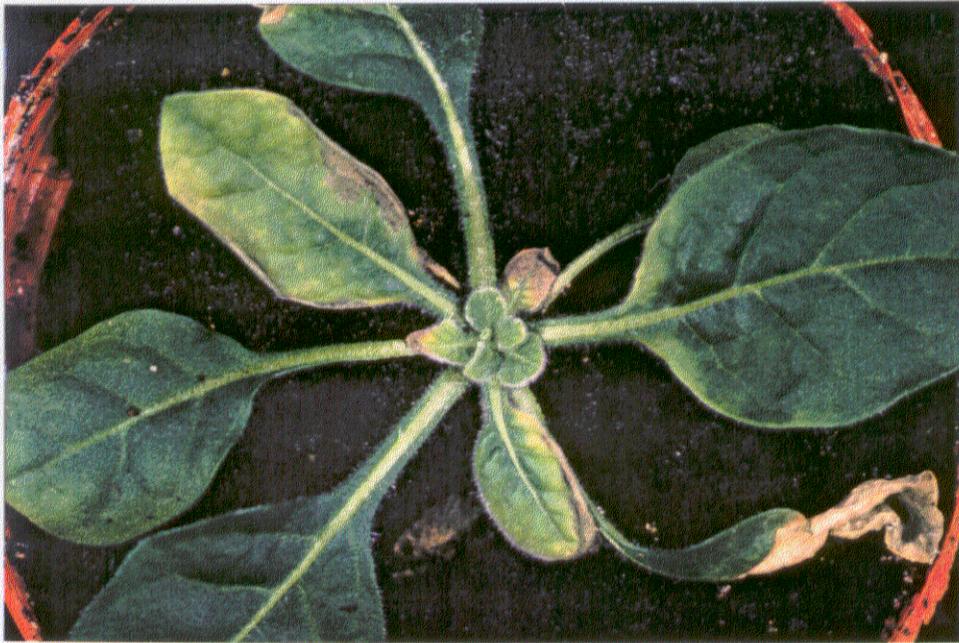


FIG. 4

Fig. 5. Porcentaje de plantas con síntomas sistémicos a diferentes d.p.i. en las plantas transgénicas de *N. clevelandii* inoculadas con 0,05 $\mu\text{g/ml}$ (a), 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (b) y 1 $\mu\text{g/ml}$ (c) de TMV. El porcentaje que se expresa corresponde a la media de los resultados de tres experimentos independientes con 10 plantas de cada línea.

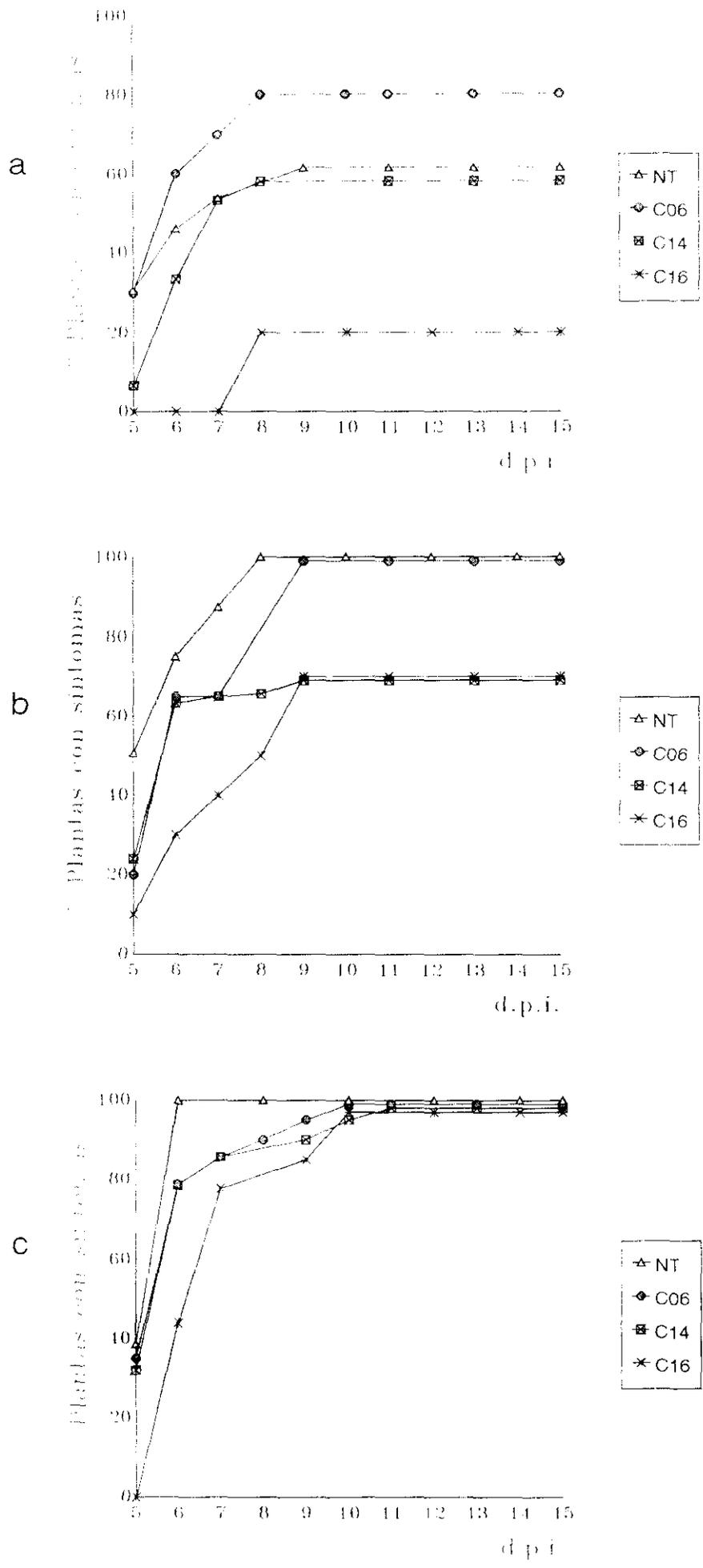


FIG. 5

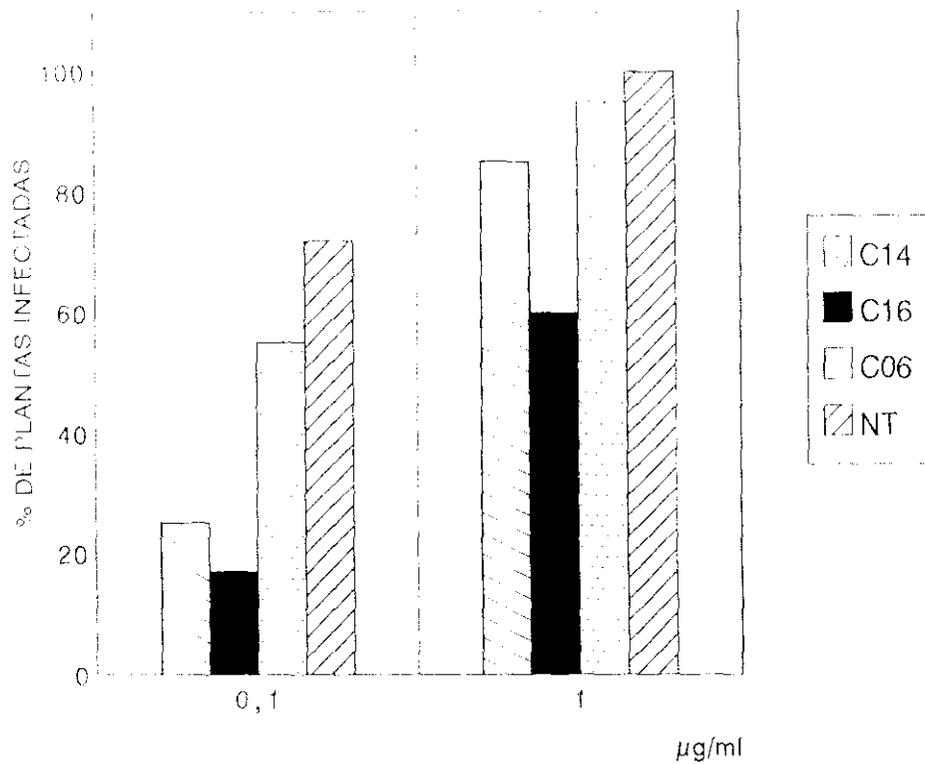


FIG. 6. Porcentaje de plantas transgénicas de *Nicotiana clevelandii* infectadas con PaMMV, a los 15 d.p.i. Las plantas se inocularon con 0,1 y 1 µg/ml de virus. La presencia o ausencia de virus en las hojas superiores se detectó por ELISA-DAS. Los valores representados son la media de los resultados de tres experimentos independientes y de 10 plantas de cada línea analizadas en cada experimento.

todas las plantas control y un 85% de las plantas de la línea C14 resultaron infectadas sistémicamente. Sin embargo, solo se estableció infección en el 60% de las plantas de la línea C16.

Los síntomas inducidos por PaMMV en las plantas infectadas son en general más suaves que los inducidos por TMV y algo más severos que los inducidos por PMMoV-S (Fig. 7). El resultado del seguimiento diario de los síntomas en las plantas de las distintas líneas inoculadas con 0,1 y 1 $\mu\text{g/ml}$ de PaMMV se recoge en las gráficas de la Fig. 8.

Cuando las plantas se inocularon con 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de virus los porcentajes de plantas control que mostraban síntomas fueron también inferiores al 100%, a pesar de lo cual se observó una reducción en el número de plantas con síntomas de las líneas C14 y C16. Cuando la concentración de inóculo fue 1 $\mu\text{g/ml}$ de virus, la reducción del porcentaje de plantas con síntomas a los 15 d.p.i. solo se observó en la línea C16, mientras que en la línea C14 este porcentaje fue similar o igual al de plantas de la línea C06 y plantas NT (Fig. 11b). Las plantas infectadas de las líneas C14 y C16 presentaban un retraso entre 2 y 3 días en la manifestación de los síntomas respecto a las plantas control. Sin embargo, no fue posible observar atenuación de los síntomas en las plantas infectadas de las líneas C14 y C16.

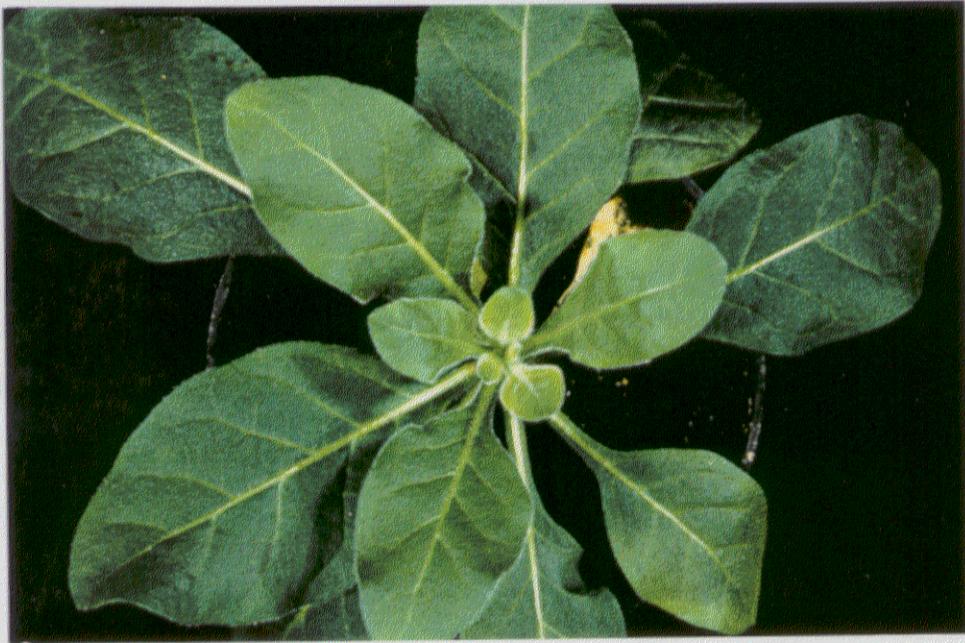
IV.3.4. PROTECCIÓN MEDIADA POR LA PROTEÍNA DE LA CÁPSIDA DE PMMoV-S FRENTE A PMMoV-I EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE *N. clevelandii*.

Se inocularon 10 plantas transgénicas de las líneas C14, C16, C06 y plantas no transgénicas NT, con 0,1, 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de PMMoV-I purificado. El porcentaje de plantas con virus en las hojas superiores, a los 15 d.p.i., se muestra en la Fig. 9.

Las plantas de las líneas C14 y C16 no resultaron infectadas sistémicamente al ser inoculadas con 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de virus y tan solo un 10% de las plantas de la línea C14 se infectaron al inocularlas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de PMMoV-I, mientras que todas las plantas control se infectaron sistémicamente al inocularlas con cualquiera de las dos concentraciones. Si se incrementa diez veces la concentración de inóculo aumenta el porcentaje de plantas infectadas de la línea C14, que llegó a ser el 80% de las plantas inoculadas, mientras que solo un 10% de las plantas inoculadas de

Fig. 7. Síntomas inducidos por PaMMV en las hojas superiores de plantas de *N. clevelandii* a los 15 d.p.i. **a;** planta sana. **b;** planta infectada.

a



b



FIG. 7

Fig. 8. Porcentaje de plantas con síntomas sistémicos a diferentes d.p.i. en las plantas transgénicas de *N. cleavelandii* inoculadas con 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (a) y 1 $\mu\text{g/ml}$ (b) de PaMMV. El porcentaje que se expresa corresponde a la media de los resultados de tres experimentos independientes con 10 plantas de cada línea.

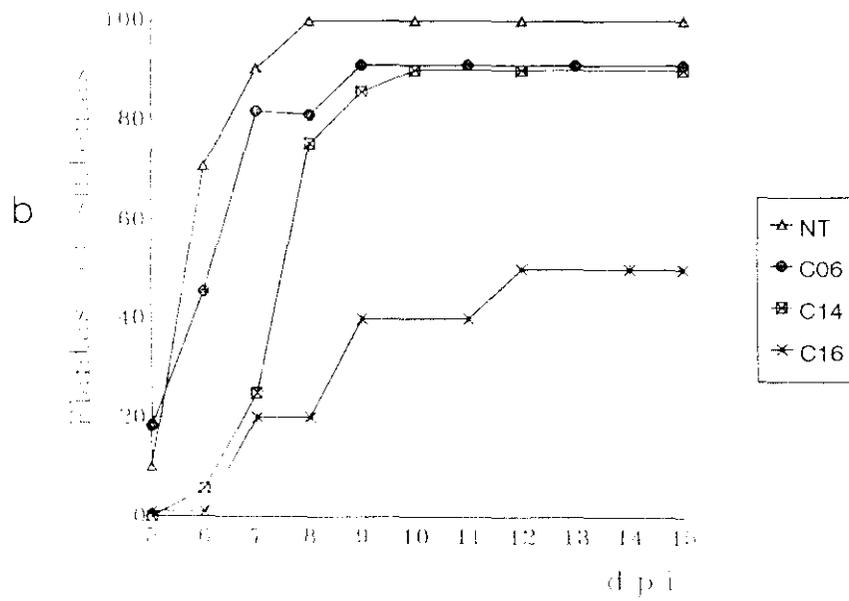
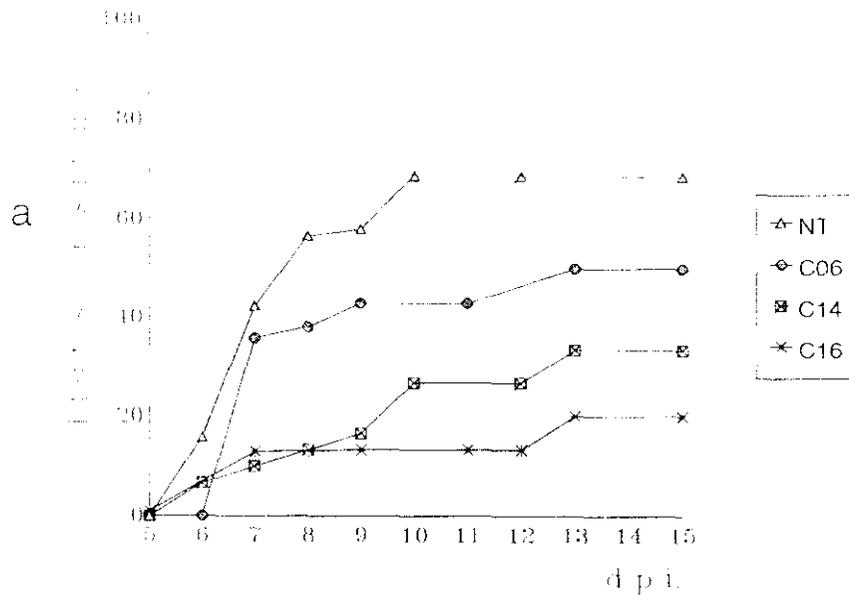


FIG. 8

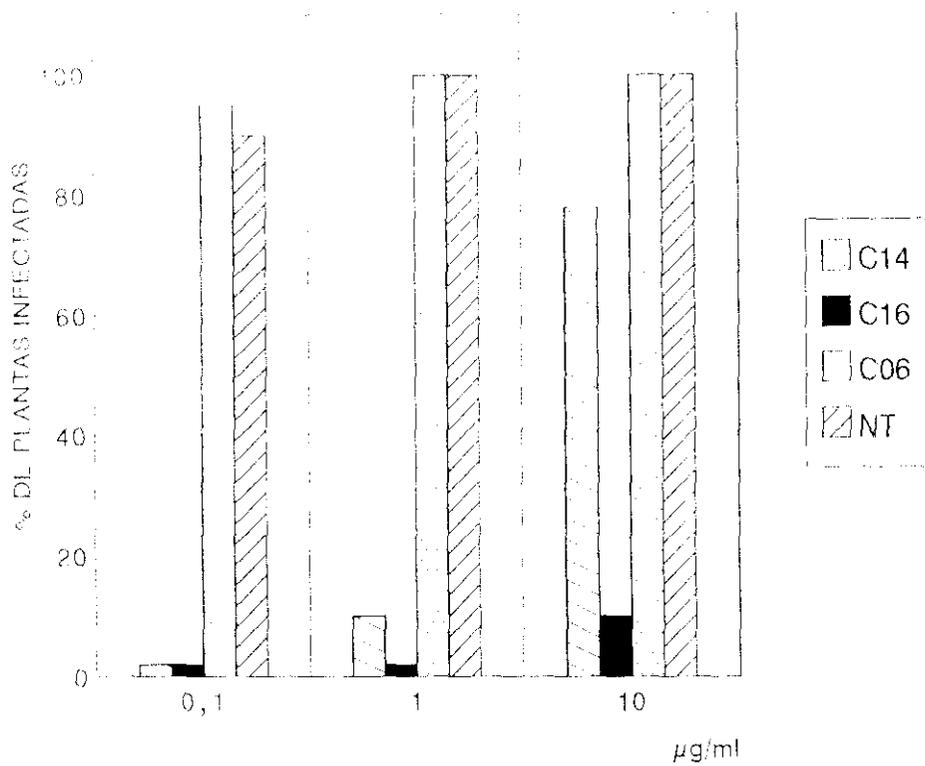


FIG. 9. Porcentaje de plantas transgénicas de *Nicotiana clelandii* infectadas con PMMoV-I,a los 15 d.p.i. Las plantas se inocularon con 0,1, 1 y 10 µg/ml de virus. La presencia de virus en las hojas superiores se analizó por ELISA-DAS. Los valores representados son la media de los resultados de tres experimentos independientes y de 10 plantas de cada línea analizadas en cada experimento

la línea C16 se infectaron de forma sistémica a los 15 d.p.i.

Los síntomas inducidos por PMMoV-I en *N.clevelandii* son idénticos a los inducidos por PMMoV-S. El seguimiento diario de los síntomas de las plantas de las diferentes líneas inoculadas con PMMoV-I se recoge en las gráficas de la Fig.10.

En ninguna planta de la línea C16 inoculada con cualquiera de las tres concentraciones se desarrollaron síntomas durante los 15 d.p.i. Esto mismo ocurre en las plantas de la línea C14 cuando son inoculadas con la concentración de virus más baja (Fig. 11c). Sin embargo, al ser inoculadas con 1 ó 10 $\mu\text{g/ml}$ de PMMoV-I se inducen síntomas en un 20 y un 70% de las plantas, respectivamente. Por otra parte, también fue posible observar en estas plantas un retraso apreciable en la aparición de los síntomas con respecto a las plantas control, además de una atenuación en los mismos, que es más notable en las plantas inoculadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de virus.

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 *N. clevelandii*.

Con el fin de conocer el efecto de las infecciones mixtas de PMMoV-S con los virus TMV y PaMMV, se inocularon plantas transgénicas de la línea C14 y plantas no transgénicas NT con los inóculos que se detallan en la Tabla 1.

A los 15 d.p.i. se tomaron muestras de las hojas superiores y se analizó la presencia de virus por ELISA-DAS. Esta técnica nos permitió diferenciar en las hojas infectadas entre los distintos virus empleados. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 1.

Cuando se inocularon plantas NT con los inóculos constituidos por PMMoV-S 1 $\mu\text{g/ml}$ y TMV 0,05 ó 0,1 $\mu\text{g/ml}$, todas las plantas resultaron infectadas y el virus detectado en las hojas superiores fue PMMoV-S. Si bien, se detectó en estas plantas, pequeñas cantidades de TMV cuando el inóculo contenía a este virus a la concentración de 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Cuando se inocularon plantas de la línea C14 con estos mismo inóculos, también resultaron infectadas, aunque en este caso el virus detectado en las hojas superiores fue TMV junto a pequeñas

Fig. 10. Porcentaje de plantas con síntomas sistémicos a diferentes d.p.i. en las plantas transgénicas de *N. clevelandii* inoculadas con 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (a), 1 $\mu\text{g/ml}$ (b) y 10 $\mu\text{g/ml}$ (c) de PMMoV-1.
El porcentaje que se expresa corresponde a la media de los resultados de tres experimentos independientes con 10 plantas de cada línea.

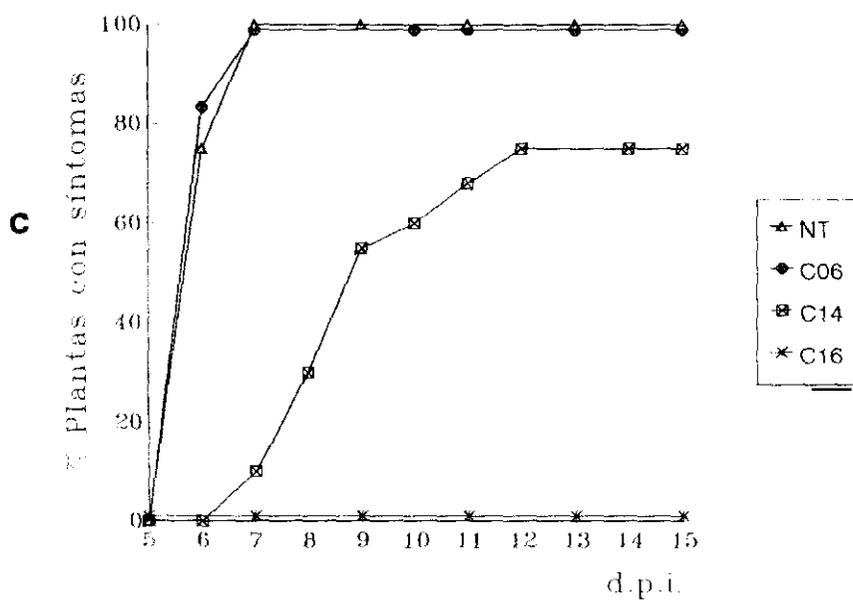
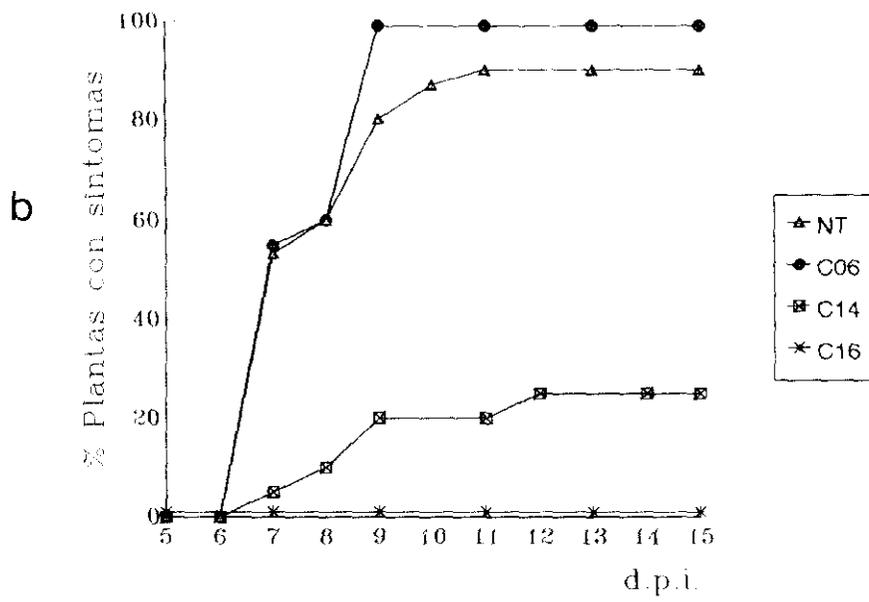
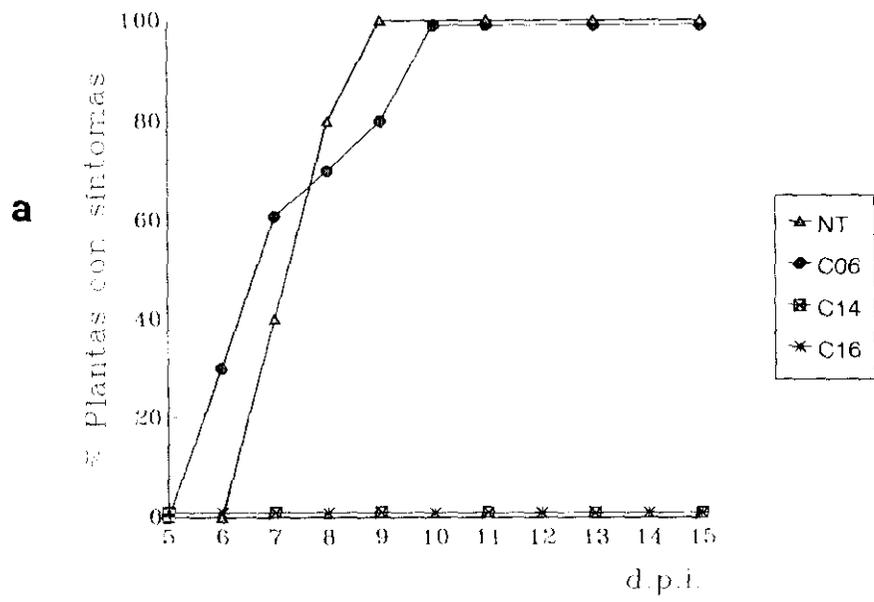


FIG. 10

Fig. 11. Síntomas en las hojas superiores de plantas de *N. clevelandii* transgénicas de las líneas C14, C16 y C06 y de plantas no transgénicas NT. **a;** plantas inoculadas con 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de TMV. **b;** plantas inoculadas con 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de PaMMV. **c;** plantas inoculadas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de de PMMoV-I.

C16

C14

C06

NT

a



b



c



FIG. 11

cantidades de PMMoV-S.

Al inocular con PMMoV-S 0,1 $\mu\text{g/ml}$ más TMV 0,05 $\mu\text{g/ml}$, se detectó TMV tanto en las hojas superiores de plantas de la línea C14 como en hojas superiores de plantas no transgénicas. Si bien, el número de plantas infectadas fue mayor en las plantas control que en las plantas de la línea C14.

Cuando se inocularon plantas de la línea C14 y plantas NT con los inóculos que contienen PaMMV, pocas plantas mostraron síntomas a los 15 d.p.i.. Por otra parte, en las plantas infectadas de la línea C14 se detectó PaMMV cuando fueron inoculadas con cualquiera de las concentraciones de inóculo empleadas, mientras que en las plantas infectadas NT, que fueron inoculadas con el inóculo que contiene PaMMV a 0,1 $\mu\text{g/ml}$, se detectó PaMMV, y en las plantas que se inocularon con el inóculo que contiene PaMMV 0,05 $\mu\text{g/ml}$ se detectó PMMoV-S.

Tabla 1. Número de plantas con síntomas y virus detectado en las hojas superiores de *N. clevelandii* de las líneas C14 y NT a los 15 d.p.i. con diferentes inóculos mixtos. Entre paréntesis se indica el número de plantas inoculadas.

| INÓCULOS MIXTOS | PLANTAS CON SÍNTOMAS | | VIRUS DETECTADO | |
|---|----------------------|---------|-----------------|----------------|
| | C14 | NT | C14 | NT |
| PMMoV-S + TMV 1 $\mu\text{g/ml}$ 0,05 $\mu\text{g/ml}$ | 13 (20) | 10 (10) | TMV | PMMoV-S |
| PMMoV-S + TMV 1 $\mu\text{g/ml}$ 0,1 $\mu\text{g/ml}$ | 15 (15) | 10 (10) | TMV | PMMoV-S TMV |
| PMMoV-S + TMV 0,1 $\mu\text{g/ml}$ 0,05 $\mu\text{g/ml}$ | 6 (20) | 10 (12) | TMV | TMV |
| PMMoV-S + PaMMV 0,1 $\mu\text{g/ml}$ 0,05 $\mu\text{g/ml}$ | 3 (20) | 7 (10) | PaMMV | PMMoV-S |
| PMMoV-S + PaMMV 0,1 $\mu\text{g/ml}$ 0,1 $\mu\text{g/ml}$ | 5 (20) | 8 (20) | PaMMV | PaMMV |

IV.4. DISCUSIÓN

La protección mediada por la proteína de la cápsida de PMMoV-S frente a PMMoV-I fue en las dos líneas de plantas transgénicas C14 y C16 tan eficaz como lo fue frente a PMMoV-S, ya que los porcentajes de plantas que escapan a la infección en ambas líneas fueron los mismos cuando se inoculaban con las mismas concentraciones de virus. La protección frente a PMMoV-I en las plantas se manifestaba igualmente como una drástica reducción en la acumulación de virus en las hojas superiores, así como un retraso y/o ausencia de síntomas y atenuación de los mismos. Resulta evidente la relación entre ambos fenómenos, pues las plantas sin síntomas o con atenuación de los mismos se encontraban libres de virus o con concentraciones muy inferiores a las detectadas en las plantas control. La CPMP frente a distintas estirpes de un virus se ha descrito en las plantas de *Nicotiana tabacum* transformadas con el gen de la proteína de la cápsida de la estirpe U₁ de TMV, las cuales resultaban protegidas frente al virus homólogo y frente a la estirpe PV230 de TMV (Nelson y col., 1987). También plantas de tomate transformadas con este mismo gen resultan protegidas frente a las estirpes L, 2 y 2² de ToMV, que es un tobamovirus estrechamente relacionado con TMV (Nelson y col., 1988).

En la mayoría de los casos de CPMP frente a estirpes del virus homólogo existe una fuerte relación serológica entre éste y las diferentes estirpes frente a las cuales las plantas transgénicas resultan protegidas. En el caso de PMMoV-I y PMMoV-S la relación serológica es muy estrecha, ambos virus son indistinguibles por doble inmunodifusión (Alonso y col., 1989) y presentan una fuerte reacción cruzada en ELISA-DAS directo.

Por otra parte, la CPMP actúa normalmente frente a estirpes de virus que presentan un alto grado de homología de secuencia aminoacídica entre sus proteínas de la cápsida y la del virus homólogo. El análisis de las secuencias aminoacídicas de las proteínas de la cápsida de PMMoV-S y PMMoV-I revela un porcentaje de homología del 98,1%, con solo tres cambios de aminoácidos de los cuales únicamente la sustitución Met-Asp en la posición 138 es no conservativa (García-Luque y col., 1993) y es la responsable de que PMMoV-I sea capaz de

superar la resistencia del gen L³ de *Capsicum* spp. (Berzal-Herranz y col., 1995). Un resultado similar se observa en plantas de tabaco transformadas con el gen de la proteína de la cápsida de la estirpe O de CMV (CMV-O), las cuales resultan protegidas frente a la estirpe CMV-Y que es un virus capaz de inducir síntomas más severos que CMV-O, posiblemente debido a una única sustitución aminoacídica en su CP (Nakajima y col., 1993). También plantas de tabaco transformadas con el gen de la proteína de la cápsida de la estirpe 425 de AMV resultan protegidas frente a la infección por la estirpe YSMV entre las cuales hay un 90% de homología en las secuencias aminoacídicas de sus CP. Sin embargo plantas de tabaco transformadas con el gen de la proteína de la cápsida de la estirpe TCM de TRV resultan protegidas frente a la infección por el virus homólogo, pero no frente a la estirpe PLB con la que tiene solo un 39% de homología en las secuencias aminoacídicas de sus CP. Por el contrario, estas plantas transgénicas resultan protegidas frente a un aislado alemán del virus del oscurecimiento precoz del guisante (PEBV; pea early-browning virus) con el que presenta una fuerte relación serológica y con el que tiene una homología de secuencia alta (Van Dun y Bol, 1988; Angenent y col., 1990).

Cuando la CPMP se ensaya en plantas de *N. tabacum* frente a virus estrechamente relacionados con el virus homólogo, se ha observado también la existencia de una protección heteróloga, en algunos casos igual a la obtenida frente al virus homólogo. Esta protección no actúa frente a virus con un porcentaje de homología con el virus homólogo inferior al 60% (Anderson y col., 1989; Nejidat y Beachy, 1990).

El análisis de las secuencias aminoacídicas de las proteínas de la cápsida de PMMoV-S y de TMV dio como resultado un porcentaje de homología de un 72% (Alonso y col., 1991). A pesar de este alto porcentaje, la CPMP frente a TMV en las plantas transgénicas de *N. cleveandii* no fue efectiva en las plantas de la línea C14, y tan solo en las plantas de la línea C16 inoculadas con la más baja concentración de inóculo (0,05 µg/ml), se observó un 80% de plantas protegidas. Este porcentaje es similar al que se obtuvo cuando se inocularon plantas de la línea C16 con una concentración de 1 µg/ml de PMMoV-S, lo que indica que la protección en estas plantas frente a TMV solo es posible con concentraciones 200 veces inferiores a PMMoV-S. Un resultado similar se observó en los experimentos

realizados en el campo con plantas de tomate que expresaban el gen de la proteína de la cápsida de TMV, las cuales no resultaban protegidas frente a la infección por diferentes estirpes de ToMV con las que posee una alta homología de secuencia aminoacídica en las proteínas de la cápsida (Sanders y col., 1992). Por otro lado el resultado obtenido por nosotros contrasta con el obtenido por Nejidat y Beachy (1990) en plantas de *Nicotiana tabacum* cv Xanthi-nc transformadas con el gen de la proteína de la cápsida de TMV en las que se observa una alta protección frente PMMoV, que se manifiesta como una reducción en el número de lesiones locales necróticas en las hojas inoculadas, ya que este virus induce reacción hipersensible en este huésped y no infecta sistémicamente las plantas. Esta falta de reciprocidad en la CPMP se ha observado también entre estirpes de TMV, de manera que plantas de tabaco transformadas con el gen de la proteína de la cápsida de la estirpe U1 resultan protegidas frente a la estirpe U2, mientras que plantas transformadas con el gen de la proteína de la cápsida de U2 resultan infectadas por la estirpe U1 (Wilson, 1993).

El elevado porcentaje de homología de secuencia aminoacídica existente entre la CP de PMMoV-S y la CP de TMV no parece suficiente para que exista protección heteróloga frente a TMV en las plantas de *N. clevelandii* transformadas con el gen de la proteína de la cápsida de PMMoV-S. Por otro lado, TMV se replica de forma más eficiente que PMMoV-S en plantas de *N. clevelandii*, tal y como demuestran los resultados de acumulación de TMV en las hojas inoculadas de plantas control, que son entre 4 y 5 veces superiores a los de PMMoV-S, y los estudios de multiplicación viral de TMV y PMMoV-S en protoplastos, los cuales indican que, si bien la cinética de acumulación de proteína de la cápsida de ambos virus es similar, la acumulación final de CP de TMV es 4 veces mayor que la de PMMoV-S (Wicke, B. comunicación personal). Si tenemos en cuenta que la reducción en la cantidad de virus acumulado en las hojas inoculadas de las plantas transgénicas es un proceso clave en la CPMP (Nelson y col., 1987), posiblemente la mayor capacidad replicativa de TMV en las hojas inoculadas de las plantas transgénicas sea uno de los factores que condiciona la ausencia de CPMP frente a TMV en las plantas de *N. clevelandii* que expresan la CP de PMMoV-S.

La CPM frente a PaMMV en estas plantas fue también inferior a la obtenida frente al virus homólogo, si bien resultó algo mayor que frente a TMV a

pesar de que el porcentaje de homología de la secuencia aminoacídica de la CP de PMMoV-S con la de PaMMV es algo menor que con la de TMV (García-Luque y col., 1993). Tampoco en este caso el elevado porcentaje de homología existente entre las CP de PMMoV-S y PaMMV parece ser suficiente para que se produzca CPMP frente al virus heterólogo. Aunque no disponemos de datos sobre la replicación de este virus en las hojas inoculadas o en los protoplastos de *N. clevelandii*, sabemos que PaMMV se acumula entre 2 y 3 veces más que PMMoV-S en las hojas de plantas infectadas sistémicamente. Esto podría ser, también en este caso, una de las causas de la baja protección heteróloga existente frente a PaMMV en las plantas de *N. clevelandii* transformadas con el gen de la proteína de la cápsida de PMMoV-S.

La mayor eficacia replicativa de TMV y PaMMV frente a PMMoV-S se puede observar cuando se inoculan plantas de *Nicotiana clevelandii* con inóculos mixtos de estos virus. De tal forma que, las plantas control resultan infectadas sistémicamente solo por TMV aún cuando el inóculo contiene doble concentración de PMMoV-S que de TMV, y estas plantas resultan infectadas por PaMMV cuando las concentraciones de ambos virus son iguales. En las plantas transgénicas la protección frente a PMMoV-S sigue siendo efectiva cuando se inoculan con una mezcla de PMMoV-S y TMV o de PMMoV-S y PaMMV, ya que las plantas resultan infectadas sistémicamente solo por el virus heterólogo. Únicamente cuando en el inóculo la concentración de PMMoV-S es de 1 $\mu\text{g/ml}$ se detecta en las hojas superiores una pequeñísima cantidad de proteína de la cápsida de este virus, que puede ser debida a fenómenos de heteroencapsidación o de transporte junto a TMV.

Por tanto consideramos que para que exista protección heteróloga en las plantas transgénicas es necesario tener en cuenta no solo el porcentaje de homología de secuencia de los virus, sino también la virulencia de éstos en la planta huésped transformada.

Estudios de multiplicación viral de PMMoV-S y PMMoV-I realizados en plantas y protoplastos de pimiento de especies susceptibles y resistentes a TMV indican que estos virus se replican con igual eficacia en este huésped (Wicke y col., 1990). De manera que, la transformación de plantas de pimiento, que lleven incorporados genes de resistencia frente a TMV, con el gen de la proteína de la

cápsida de PMMoV-S, puede ser en el futuro una vía alternativa para obtener resistencia no convencional frente a la infección por las estirpe S e I de PMMoV en las variedades cultivables de esta planta.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1ª.- En plantas de *Capsicum annuum* cv. Dulce Italiano con el gen de resistencia L¹ frente a Tobamovirus, la inoculación con TMV induce en las hojas inoculadas una reacción hipersensible que cursa con lesiones locales necróticas, y que va asociada a la síntesis de nuevas proteínas que no se sintetizan en las hojas de las plantas control.

Estas proteínas tienen características comunes con las identificadas en otros huéspedes vegetales asociadas a la patogénesis y que reciben por ello el nombre de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs).

2ª.- Las PRs detectadas en las plantas de pimiento presentan diferentes isoformas de pl ácido y básico, siendo las isoformas ácidas mayoritarias.

Por otro lado, estas proteínas tienen una estrecha relación serológica con las PRs, p14, P23, P29, P35 y P36, aisladas de plantas de tomate y con las PRs, glucb y PRQ aisladas de plantas de tabaco.

3ª.- La especificidad de los inmunosueros de las PRs de los diferentes grupos descritos en las plantas de tabaco y tomate nos permite concluir que, en las plantas de pimiento se inducen isoformas ácidas y básicas de las proteínas PRs de al menos cuatro grupo diferentes: del grupo 1 la PR p16 de pl básico; del grupo 2 las PRs p30, p36 y p40 de pl ácido y la PR p34 con isoformas de pl ácido y básico; del grupo 3 las PRs p31 y p32 de pl ácido y las PRs p28 y p29 con isoformas de pl ácido y básico; y del grupo 5 la PR p23 de pl ácido.

La proteína p13 no reaccionó con ninguno de los inmunosueros ensayados, y únicamente atendiendo a su peso molecular, podría ser incluida en el grupo 4.

4ª.- En las hojas superiores de plantas de *C. annuum* L¹L¹ inoculadas con TMV, la inducción y acumulación sistémica de PRs, a los tiempos estudiados, esta limitada a algunas proteínas del grupo 2 y a la proteína p13. Estas PRs podrían ser utilizadas como marcadores de la activación del mecanismo de resistencia en plantas de *C. annuum*.

Algunas de las PRs caracterizadas, tales como la p16 y las PRs del grupo 3, están relacionadas con la infección viral, y se acumulan tanto en las hojas inoculadas con TMV como en las hojas infectadas sistémicamente por PMMoV-S.

5ª.- En las plantas de *C. annuum*, las isoformas ácidas y básicas de las proteínas PR con actividades enzimáticas β -1,3-glucanasa y quitinasa se acumulan, principalmente, en las hojas inoculadas con TMV, aunque en las plantas infectadas con PMMoV-S se inducen también, de forma sistémica, algunas isoformas ácidas.

6ª.- El fenómeno de resistencia sistémica adquirida, en las hojas superiores de plantas de *C. annuum*, aparece asociado a la reacción hipersensible inducida por TMV en las hojas inoculadas de estas plantas.

Esta forma de resistencia se manifiesta en una reducción del tamaño de las lesiones locales necróticas inducidas por TMV en las hojas inoculadas, si bien no existe disminución en la cantidad de virus acumulado en estas hojas.

La resistencia sistémica adquirida no impide la infección sistémica de PMMoV-S, de manera que en las plantas inducidas, tanto la sintomatología como la cantidad de virus en las hojas superiores es igual a la observada en las plantas control.

7ª.- Para la regeneración "in vitro" de plantas de *Nicotiana clelandii* Gray el medio idóneo fue el constituido por las sales del medio MS, las vitaminas del medio B5 y las hormonas BAP (9 μ M) y NAA (0,5 μ M). Para la elongación de los brotes inducidos en los explantes fue necesaria la sustitución en los medios de la hormona BAP por la hormona GA₃ (3 μ M).

8ª.- Se han obtenido plantas de *Nicotiana clelandii* transformadas con un gen quimérico de la proteína de la cápsida de PMMoV-S.

La transformación se realizó mediante *Agrobacterium tumefaciens*, resultando más eficaz la estirpe LBA4404 portadora de un sistema binario de transformación que la estirpe C58C1 portadora de un sistema cointegrado.

La expresión constitutiva de la proteína de la cápsida de PMMoV-S varía mucho de unas plantas transgénicas a otras, de manera que en la planta C16 la cantidad de proteína de la cápsida detectada fue 10 veces superior a la de la planta C14.

9ª.- La autofecundación de las plantas C14 y C16 originó dos líneas de plantas transgénicas de la generación R1. La segregación del gen marcador de resistencia a kanamicina ligado al gen de la proteína de la cápsida, permite concluir que existe una única copia de estos genes situada en un único locus del genoma de estas plantas.

Por otra parte, en las plantas de la generación R1 de ambas líneas se mantuvieron las diferencias en la expresión constitutiva de la proteína de la cápsida, observadas en las plantas de la generación R0.

10ª.- Las plantas de *N. clevelandii* de las líneas C14 y C16 resultaron protegidas frente a la infección por PMMoV-S. Esta protección fue completa frente dosis bajas del virus, y se manifestó por la ausencia de virus en la planta, acompañada de la ausencia de síntomas.

Con dosis superiores de inóculo, la protección se manifestaba como un retraso en el desarrollo de los síntomas y una atenuación de los mismos.

11ª.- El grado de protección mediado por la proteína de la cápsida frente a PMMoV-S esta en relación directa con los niveles de expresión constitutiva de la proteína de la cápsida del virus en las plantas transgénicas de las líneas C14 y C16.

12ª.- En las plantas de *N. clevelandii* de las líneas C14 y C16, en las que la protección mediada por la proteína de la cápsida fue completa, no se detectó virus en las hojas inoculadas a ninguno de los tiempos analizados. Por otra parte, todas las plantas de ambas líneas se infectaron cuando se inocularon con RNA del virus. Ambos resultados sugieren que la protección mediada por la proteína de la cápsida actúa en estas plantas sobre fases muy tempranas del ciclo replicativo viral.

13^a.- En las plantas de las líneas C14 y C16, en las que la protección mediada por la proteína de la cápsida no fue completa, se observó una menor acumulación de virus en las hojas superiores respecto a las plantas control, lo que sugiere que esta protección actúa también sobre fases más tardías del ciclo infectivo del virus, posiblemente sobre la capacidad de movimiento viral a larga distancia.

14^a.- En las plantas transgénicas de *N. clevelandii* la protección mediada por la proteína de la cápsida de PMMoV-S frente al virus PMMoV-I, refleja un fenómeno de protección homóloga frente a estirpes muy relacionadas del mismo virus

La protección heteróloga frente a TMV o PaMMV, únicamente pudo observarse en algunas plantas de la línea C16, y solo cuando la concentración de inóculo empleada fue 200 veces menor a la de PMMoV-S o PMMoV-I.

Concluimos por tanto, que en este sistema virus/huésped, la protección mediada por la proteína de la cápsida frente a virus homólogos es mucho más eficaz que frente a virus heterólogos.

15^a.- En el caso de la protección heteróloga frente a TMV y PaMMV, en las plantas transgénicas de *N. clevelandii*, es necesario considerar, no solo el porcentaje de homología existente entre las secuencias aminoacídicas de la proteína de la cápsida de los diferentes virus, sino también la virulencia de éstos en la planta huésped ensayada.

BIBLIOGRAFIA

AHL, P. y GIANINAZZI, S. (1982). b-Protein as a constitutive component in highly (TMV) resistant interspecific hybrids of *Nicotiana glutinosa* x *Nicotiana debneyi*. Plant Sci. Lett. **26**, 173-181.

ALONSO, E., GARCÍA-LUQUE, I., ÁVILA-RINCÓN, M.J., WICKE, B., SERRA, M.T. y DÍAZ-RUIZ, J.R. (1989). A tobamovirus causing heavy losses in protected pepper crops in Spain. J. Phytopathol. **125**, 67-76.

ALONSO, E., GARCÍA-LUQUE, I., DE LA CRUZ, A., WICKE, B., ÁVILA-RINCÓN, M.J., SERRA, M.T., CASTRESANA, C. y DÍAZ-RUIZ, J.R. (1991). Nucleotide sequence of the genomic RNA of pepper mild mottle virus, a resistance-breaking tobamovirus in pepper. J. Gen. Virol. **72**, 2875-2884.

AN, G., EBERT, P.R., MILTRA, A. y HA, S.B. (1988). Binary vectors. In Plant Molecular Biology Manual Gelwin, S.B. y Schilperoort, R.A. (eds). Kluwer Academic Publishers. A3:1-19.

ANDERSON, E.J., STARK, D.M., NELSON, R.S., TUMER, N.E. y BEACHY, R.N. (1989). Transgenic plants that express the coat protein gene of TMV or AIMV interfere with disease development of non-related viruses. Phytopathology **12**, 1284-1290.

ANGENENT, G.C., VAN DEN OUWELAND, J.M.W. y BOL, J.F. (1990). Susceptibility to virus infection of transgenic tobacco plants expressing structural and nonstructural genes of tobacco rattle virus. Virology **175**, 191-198.

ANTONIW, J.F. y PIERPOINT, W.S. (1978). The purification and properties of the "b" proteins from virus-infected tobacco plants. J. Gen. Virol. **39**, 343-350.

ANTONIW, J.F., RITTER, C.E., PIERPOINT, W.S. y VAN LOON, L.C. (1980). Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. J. Gen. Virol. **47**, 79-87.

ARROYO, R., PONZ, F. y MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M. (1991). Desarrollo de un sistema de transformación genética en pimiento (*Capsicum annuum* cv. Piquillo). I Reunión De Biología Molecular De Plantas. Nicolás, G. y Sabater, B. (eds.). Acta Salmanticensia. Biblioteca de las Ciencias, 71. Salamanca. pp 221.

ARROYO, R., PONZ, F. y MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M. (1993). Development of a pepper transformation system. Workshop on "Engineering Plants Against Pest and Pathogens". Instituto Juan March de Estudios e Investigaciones. Madrid. pp 81.

ARTEAGA, M.L. y ORTEGA, R.G. (1981). Primeras observaciones de "cepas de pimiento del virus del mosaico del tabaco" (TMV) en pimiento. ITEA **42**, 27-32.

AVGELIS, A.D. (1986). A pepper strain of TMV who is new in Crete (Geece). Phytopathol. Medit. **25**, 33-38.

ÁVILA-RINCÓN, M.J., FERRERO, M.L., ALONSO, E., GARCÍA-LUQUE, I. y DÍAZ-RUIZ, J.R.. (1989). Nucleotide sequences of 5' and 3' noncoding regions of pepper mild mottle virus strain S RNA. J. Gen. Virol. **70**, 3025-3031.

AVRAMEAS, S. (1969). Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Immunochemistry **6**, 43-53.

BARDONNET, N., HANS, F., SERGHINI, M.A. y PINCK, L. (1994). Protection against virus infection in tobacco plants expressing the coat protein of grapevine fanleaf nepovirus. Plant Cell Reports **13**, 357-360.

- BAULCOMBE, D.C., SANDERS, G.R., BEVAN, M.W., MAYO, M.A. y HARRISON, B.D.** (1986). Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. Nature **321**, 446-449.
- BAULCOMBE, D.C.** (1994a). Replicase mediated resistance: a novel type of virus resistance in transgenic plants?. Trends Microbiol. **2**, 60-63.
- BAULCOMBE, D.C.** (1994b). Novel strategies for engineering virus resistance in plants. Current Opinions in Biotechnology **5**, 117-124.
- BEACHY, R.N., LOESCH-FRIES, S. y TUMER, N.E.** (1990). Coat protein-mediated resistance against virus infection. Annu. Rev. Phytopathol. **28**, 451-474.
- BENFY, P.N. y CHUA, N. H.** (1989). Regulated genes in transgenic plants. Science **244**, 174-181.
- BERZAL-HERRANZ, A., DE LA CRUZ, A., TENLLADO, F., DÍAZ-RUIZ, J.R., LÓPEZ, L., SANZ, A.I., VAQUERO, C., SERRA, M.T. y GARCÍA-LUQUE, I.** (1995). The *Capsicum* L³ gene-mediated resistance against the tobamoviruses is elicited by the coat protein. Virology **209**, 498-505.
- BEVAN, M.W., MASON, S.E. y GOELET, P.** (1985). Expression of tobacco mosaic virus coat protein by a cauliflower mosaic virus promoter in plants transformed by *Agrobacterium*. EMBO J. **4**, 1921-1926.
- BOL, J.F., LINTHORST, H.I.M. y CORNELISSEN, B.I.C.** (1990). Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. Annu. Rev. Phytopathol. **28**, 113-138.
- BOLIVAR, F. y BACKMAN, K.** (1979). Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. Methods Enzymol. **68**, 245-267.
- BOLLER, T.** (1993). Antimicrobial functions of the plant hydrolases, chitinase and β -1,3-glucanase. In Mechanisms of Plant Defense Responses. Fritig, B. y Legrand, M. (eds). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. pp 391-400.
- BOUKEMA, I.W., JANSEN, K. y HOFMAN, K.** (1980). Strains of TMV and genes for resistance in *Capsicum*. Synopses 4th Meeting Eucarpia Capsicum Working Group (Wageningen). pp 44-48.
- BRADFORD, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. **72**, 248-254.
- BOWLES, D.J.** (1990). Defense-related proteins in higher plants. Annu. Rev. Phytopathol. **59**, 873-907.
- BOWLING, S.A., GUO, A., CAO, H., GORDON, A.S., KLESSIG, D.F. y DONG, X.** (1994). A mutation in *Arabidopsis* that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. Plant Cell **6**, 1845-1857.
- BRAULT, V., CANDRESSE, T., GALL, O., DELBOS, R.P., LANNEAU, M. y DUNEZ, J.** (1993). Genetically engineered resistance against grapevine chrome mosaic nepovirus. Plant Mol. Biol. **21**, 89-97.
- BREDERODE, F.T., LINTHORST, H.J.M. y BOL, J.F.** (1991). Differential induction of acquired resistance and PR expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding. Plant Mol. Biol. **17**, 1117-1125.
- BREGSTROM, G.C., JOHNSON, M.C. y KUC, J.** (1982). Effects of local infection of Cucumber by *Colletotrichum lagenarium*, *Pseudomonas lachrymans* or tobacco necrosis virus on systemic resistance to cucumber mosaic virus. Phytopathology **72**, 922-926.

- BROGLIE, R. y BROGLIE, K.** (1993). Chitinases and plant protection. In Mechanisms of Plant Defense Responses. Fritig, B. y Legrand, M. (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp 411-421.
- BRYNGELSSON, T. y GREEN B.** (1989). Characterization of a pathogenesis-related, thaumatin-like protein isolated from barley challenged with an incompatible race of mildew. Physiol. Mol. Plant Pathol. **35**, 45-52.
- CAMACHO ENRIQUEZ, A. y SÄNGER, H.L.** (1984). Purification and partial characterization of the major "pathogenesis-related" tomato leaf protein P14 from potato spindle tuber viroid (PSTV) infected tomato leaves. Arch. Virol. **81**, 263-284.
- CAO, H., BOWLING, S.A., GORDON, A.S. y DONG, X.** (1994). Characterization of an Arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. Plant Cell **6**, 1583-1592.
- CARR, J.P., BEACHY, R.N. y KLESSIG, D.G.** (1989). Are the PR1 proteins of tobacco involved in genetically engineered resistance to TMV?. Virology **169**, 470-473.
- CARR, J.P. y ZAITLIN, M.** (1993). Replicase-mediated resistance. Seminars in Virology **4**, 339-347.
- CASTRESANA, C., DE CARVALHO, F., GHEYSEN, G., HABETS, M., INZÉ, D. y VAN MONTAGU, M.** (1990). Tissue-specific and pathogen-induced regulation of a *Nicotiana plumbaginifolia* β -1,3-glucanase gene. Plant Cell **2**, 1131-1143.
- CLARK, M.F. y ADAMS, A.W.** (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. **34**, 475-483.
- CLARK, G.W., REGISTER III, J.C., NEJIDAT, A., EICHHOLTZ, D.A., SANDERS, P.R., FRALEY, R.T. y BEACHY, R.N.** (1990). Tissue-specific expression of the TMV coat protein in transgenic tobacco plants affects the level of coat-protein mediated virus protection. Virology **179**, 640-647.
- CLARK, G.W., FITCHEN, J.H. y BEACHY, R.N.** (1995). Studies of coat protein-mediated resistance to TMV. I. The PM2 assembly defective mutant confers resistance to TMV. Virology **208**, 485-491.
- COLLINGE, D.B., KRAGH, K.M., MIKKELSEN, J.D., NIELSEN, K.K., RASMUSSEN, U. y VAD, K.** (1993) Plant chitinases. Plant J. **3**, 31-40.
- CONEJERO, V., BELLES, J.M., GARCÍA-BREIJO, F., GARRO, R., HERNÁNDEZ-YAGO, J., RODRIGO, J. y VERA, P.** (1990). Signalling in viroid pathogenesis. In Recognition and Response in Plant-Virus Interactions., 141. Fraser, R. (ed). Springer Verlag, Berlin. 233-261.
- CORBIN, D.R. y KLEE, H.J.** (1991). Agrobacterium tumefaciens-mediated plant transformation systems. Current Opinion in Biotechnology **2**, 147-152.
- CORNELISSEN, B.J.C., HOOFT VAN HUISDIJNEN, R.A.M. y BOL, J.F.** (1986). A tobacco mosaic virus-induced tobacco protein is homologous to the sweet-tasting protein thaumatin. Nature **321**, 531-532.
- CULVER, J.N., LINDBECK, A.G.C. y DAWSON, W.O.** (1991). Virus-host interactions: induction of chlorotic and necrotic responses in plants by tobamoviruses. Annu. Rev. Phytopathol. **29**, 193-217.

- CUOZZO, M., O'CONNELL, K.M., KANIEWSKI, W., FANG, R.X., CHUA, N.H. y TUMER, N.E. (1988). Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. Bio/Technology **6**, 549-557.
- CUTT, J.R., DIXON, D.C., CARR, J.P. y KLESSIG, D.F. (1988). Isolation and nucleotide sequence of cDNA clones for the pathogenesis-related proteins PR1a, PR1b y PR1c of *Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi* nc induced by TMV infection. Nucleic Acids Res. **15**, 6799-6811.
- CUTT, J.R., HARPSTER, M.H., DIXON, D.C., CARR, J.P., DUNSMUIR, P. y KLESSIG, D.F. (1989). Disease response to tobacco mosaic virus in transgenic tobacco plants that constitutively express the pathogenesis-related PR 1b gene. Virology **173**, 89-97.
- CHIA, T.F., CHAN, Y.S. y CHUA, N.H. (1992). Characterization of cymbidium mosaic virus coat protein gene and its expression in transgenic tobacco plants. Plant Mol. Biol. **18**, 1091-1099.
- CHRIST, U. y MÖSINGER, E. (1989). Pathogenesis-related proteins of tomato: I. Induction by *Phytophthora infestans* and other biotic and abiotic inducers and correlations with resistance. Physiol. Mol. Plant Pathol. **35**, 53-65.
- DAY, A.G., BEJARANO, E.R., BUCK, K.W., BURRELL, M. y LICHTENSTEIN, C.P. (1991). Expression of an antisense viral gen in transgenic tobacco confers resistance to the DNA virus tomato golden mosaic virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 6721-6725
- DE HAAN, P., GIELEN, J.J.L., PRINS, L., WIJKAMP, I.G. VAN SCHEPEN, A., PETERS, D., VAN GRINSVEN M.O.J.M. y GOLBACH, R. (1992). Characterization of RNA-mediated resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco plants. Bio/Technology **10**, 1133-1137.
- DEAN, R.A. y KUC, J. (1985). Induced systemic protection in plants. Trends Biotechnol. **3**, 125-129.
- DEOM, C.M., OLIVER, M.J. y BEACHY, R.N. (1987). The 30-kilodalton gene product of tobacco mosaic virus potentiates virus movement. Science **237**, 389-394.
- DHAESE, P., DE GREVE, H., DECRAEMER, H., SCHELL, J. y VAN MONTAGU, M. (1979). Rapid mapping of transposon insertion and deletion mutations in the large Ti-plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. Nucleic Acids Res. **7**, 1837-1849.
- DINANT, S., BLAISE, F., KUSIAK, C., ASTIERMANIFACIER, S. y ALBOUY, J. (1993). Heterologous resistance to potato virus Y in transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of Lettuce mosaic potyvirus. Phytopathology, **83**, 818-824.
- DORE, I., LEGRAND, M., CORNELISSEN, B.J.C. y BOL, J.F. (1991). Subcellular localization of acidic and basic PR proteins in tobacco mosaic virus-infected tobacco. Arch. Virol. **120**, 97-109.
- EDBERT, P.R. y CLARKE, A.E. (1990). Transformation and regeneration of the self-incompatible species *Nicotiana glauca* Link & Otto. Plant Mol. Biol. **14**, 815-824.
- EDWARDS, K., JOHNSTONE, C. y THOMPSON, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Res. **19**, 1349.
- ENYEDI, A.J., YALPANI, N., SILVERMAN, P. y RASKIN, I. (1992). Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. Cell **70**, 879-886.
- ERKAN, S. y YORGANCI, U. (1983). A strain of tobacco mosaic virus affecting pepper plants. J. Turk. Phytopathol. **12**, 83-101.

- FANG, G. y GRUMET, R. (1993). Genetic engineering of potyvirus resistance using constructs derived from the zucchini yellow mosaic virus coat protein gene. Mol. Plant Microbe Interact. **5**, 144-153.
- FARINELLI, L. y MALNOE, P. (1993). Coat protein gene-mediated resistance to potato virus Y in tobacco - Examination of the resistance mechanisms - Is the transgenic coat protein required for protection?. Mol. Plant Microbe Interact. **6**, 284-292.
- FAUQUET, C., BOGUSZ, D., FRANCHE, C., SCHOPKE, C., CHAVAMAGA, P., CALVERT, L. y BEACHY, R.N. (1991). Evaluation of CP-mediated resistance to cassava common mosaic virus (CCMV) in *Nicotiana benthamiana*. 3rd Int. Congr. Plant Mol. Biol. Abstr. No. 1218.
- FELIX, G. y MEINS, F. (1986). Developmental and hormonal regulation of β -1,3-glucanase in tobacco. Planta **164**, 423-428.
- FISCHER, W., CHRIST, U., BAUMGARTNER, M., ERISMANN, K.H. y MÖSINGER, E. (1989). Pathogenesis related proteins of tomato: II. Biochemical and immunological characterization. Physiol. Mol. Plant Pathol. **35**, 67-83.
- FITCH, M.M., MANSCHARDT, R.M., GONSALVES, D., SLIGHTOM, J.L. y SANFORD, J.C. (1992). Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein of papaya ringspot virus. Bio/Technology **10**, 1466-1472.
- FITCHEN, J.H. y BEACHY, R.N. (1993). Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. Annu. Rev. Microbiol. **47**, 739-763.
- FRASER, R.S.S. (1981). Evidence for the occurrence of the "Pathogenesis-related" proteins in leaves of healthy tobacco plants during flowering. Physiol. Plant Pathol. **19**, 69-76.
- FRASER, R.S.S. (1982). Are "pathogenesis-related" proteins involved in acquired systemic resistance of tobacco plants to tobacco mosaic virus?. J. Gen. Virol. **58**, 305-313.
- FRASER, R.S.S. (1987). Resistance to plant viruses. Oxf. Surv. Plant. Mol. Cell Biol. **4**, 1-45.
- FRASER, R.S.S. (1989). Control of plant viruses. Plants Today **2**, 100-105.
- FRASER, R.S.S. (1990). The genetics of resistance to plant viruses. Annu. Rev. Phytopathol. **28**, 179-200.
- FRIEDRICH, L., MOYER, M., WARD, E. y RYALS, J. (1991). Pathogenesis-related protein 4 is structurally homologous to the carboxi-terminal domains of hevein, Win-1 and Win-2. Mol. Gen. Genetic **230**, 113-119.
- FRITIG, B., KAUFFMANN, S., DUMANS, B., GEOFFREY, P., KOPP, M. y LEGRAND, L. (1987). Mechanism of the hypersensitive reaction of plants. In Plant Resistance to Viruses. Evered, D y Harnett, S. (eds). Wiley, Chichester. pp 92-103.
- FULTON, R.W. (1986). Practices and precautions in the use of cross-protection for plant virus disease control. Annu. Rev. Phytopathol. **24**, 67-81.
- GADANI, F., MANSKY, L.M., MEDICI, R., MILLER, W.A. y HILL, J.H. (1990). Genetic engineering of plants for virus resistance. Arch. Virol. **115**, 1-21.
- GARCÍA ARENAL, F. (1992). La importancia de los virus en horticultura. Hortifruticultura **5**, 60-64.

- GARCÍA-LUQUE, I., SERRA, M.T., ALONSO, E., WICKE, B., FERRERO, M.L. y DÍAZ-RUIZ, J.R. (1990). Characterization of a Spanish strain of pepper mild mottle virus (PMMV-S) and its relationship to other tobamovirus. J. Phytopathol. **129**, 1-8.
- GARCÍA-LUQUE, I., FERRERO, M.L., RODRÍGUEZ, J.M., ALONSO, E., DE LA CRUZ, A., SANZ, A.I., VAQUERO, C., SERRA, M.T. y DÍAZ-RUIZ, J.R. (1993). The nucleotide sequence of the coat protein genes and 3' non-coding regions of two resistance-breaking tobamoviruses in pepper shows that they are different viruses. Arch. Virol. **131**, 75-88.
- GIANINAZZI, S. (1984). Genetic and molecular aspects of resistance induced by infections or chemicals. In Plant-Microbe Interactions: Molecular and Genetic Perspectives, vol. 1. Kosuge, T. y Nester, E. (eds). New York: Macmillan. pp 321-342.
- GIANINAZZI, S., MARTIN, C. y VALLE, J.C. (1970). Hypersensibilité aux virus, températures et protéines solubles chez le *Nicotiana Xanthi* nc. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. C.R. Acad. Sci. Paris D 270, 2383-2386.
- GIELEN, J.J.L., DE HAAN, P., KOOL, A.J., PETERS, D., VAN GRINSVEN, M. y GOLDBACH, R.W. (1991). Engineered resistance to tomato spotted wilt virus, a negative-strand RNA virus. Bio/Technology **9**, 1363-1367.
- GIL-ORTEGA, R. (1992). El pimiento y sus variedades en España. Hortifruticultura **7/8**, 16-21.
- GODIARD, L., RAGUEH, F., FROISSARD, D., LEGUAY, J.J., GROSSET, J., CHARTIER, Y., MEYER, Y. y MARCO, Y. (1990). Analysis of the synthesis of several pathogenesis-related proteins in tobacco leaves infiltrated with water and with compatible and incompatible isolates of *Pseudomonas solanacearum*. Mol. Plant Microbe Interact. **4**, 207-213.
- GONSALVES, D. y SLIGHTOM, J.L. (1993). Coat protein-mediated protection: analysis of transgenic plants for resistance in a variety of crops. Seminars in Virology **4**, 397-405.
- GRANELL, A., BELLÉS, J.M. y CONEJERO, V. (1987). Induction of pathogenesis-related proteins in tomato by citrus exocortis viroid, silver ion and ethephon. Physiol. Mol. Plant Pathol. **31**, 83-90.
- GRENIER, J. y ASSELIN, A. (1990). Some pathogenesis-related proteins are chitosanases with lytic activity against fungal spores. Mol. Plant Microbe Interact. **3**, 401-407.
- GROSSET, J., MEYER, Y., CHARTIER, Y., KAUFFMANN, S., LEGRAND, M. y FRITIG, B. (1990). Tobacco mesophyll protoplasts synthesize 1,3-β-glucanase, chitinases, and "osmotins" during *in vitro* culture. Plant Physiol. **92**, 520-527.
- HACKLAND, A.F., RYBICKI, E.P. y THOMSON, J.A. (1994). Coat protein-mediated resistance in transgenic plants. Arch. Virol. **139**, 1-22.
- HADWIGER, L.A. y CULLEY, D.E. (1993). Nonhost resistance genes and race-specific resistance. Trends Microbiol. **1**, 136-141.
- HAMILTON, R.I. (1980). Defenses triggered by previous invaders: viruses. In Plant Disease: An Advanced Treatise, 5. Horsfall JH, Cowling ED, (eds). Academic Press, New York. pp 279-303.
- HARRISON, B.D., MAYO, M.A. y BAULCOMBE, D.C. (1987). Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic virus satellite RNA. Nature **328**, 799-802.
- HASELOFF, J. y GERLACH, W.L. (1988). Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. Nature **334**, 585-591.

- HECHT, E.I. y BATEMAN, D.F. (1964). Nonspecific acquired resistance to pathogens resulting from localized infections by *Thielaviopsis basicola* or by viruses in tobacco leaves. Phytopathology 54, 523-530.
- HEITZ, T., FRITIG, B. y LEGRAND, M. (1994). Local and systemic accumulation of pathogenesis-related proteins in tobacco plants infected with tobacco mosaic virus. Mol. Plant Microbe Interact. 7, 776-779.
- HEMENWAY, C., FANG, R.X., KANIEWSKI, W.K., CHUA, N.H. y TUMER, N.E. (1988). Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. EMBO J. 7, 1273-1280.
- HIATT, A.C., CAFFERTY, R. y BOWDISH, K. (1989). Production of antibodies in transgenic plants. Nature 342, 76-78.
- HILL, K.K., JARVIS-EAGAN, N., HALK, E.L., KRAHN, K.J., LIAO, L.W., MATHEWSON, R.S., MERLO, D.J., NELSON, S.E., RASHKA, K.E. y LOESCH-FRIES, L.S. (1991). The development of virus-resistant alfalfa, *Medicago sativa* L. Bio/Technology 9, 373-377.
- HOBBS, S.L.A., WARKENTIN, T.D. y DELONG, C.M.O. (1993). Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. Plant Mol. Biol. 21, 17-26.
- HOEKEMA, A., HIRSCH, P.R., HOOYKAAS, P.J.J. y SCHILPEROORT, R.A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-regions of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. Nature 303, 179-180.
- HOEKEMA, A., HUIESMAN, M.J., MOLENDIJK, L., VAN DEN ELZEN, P.M.J. y CORNELISSEN, B.J.C. (1989). The genetic engineering of two commercial potato cultivars for resistance to potato virus X. Bio/Technology 7, 273-278.
- HOJ, P.B., HARTMAN, D., MORRICE, N.A., DOAN, D.N.P. y FINCHER, G.B. (1989). Purification of (1,3)- β -glucan endohydrolase isozyme II from germinated barley and determination of its primary structure from a cDNA clone. Plant Mol. Biol. 13, 31-42.
- HOOFT van HUISJSDUIJNEN, R.A.M., KAUFFMANN, S., BREDERODE, F.T., CORNELISSEN, B.J.C., LEGRAND, M., FRITIG, B. y BOL, J.F. (1987). Homology between chitinases that are induced by TMV infection of tobacco. Plant Mol. Biol. 9, 411-420.
- HOOYKAAS, P.J.J. y SCHILPEROORT, R.A. (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. Plant Mol. Biol. 19, 15-38.
- HORSCH, R.B., FRY, J.E., HOFFMAN, N.L. EICHHOLTZ, D., ROGERS, S.D. y FRALEY, R.T. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. Science 227, 1229-1231.
- HUGHES, R.K. y DICKERSON, A.G. (1991). Modulation of elicitor-induced chitinase and β -1,3-glucanase activity by hormones in *Phaseolus vulgaris*. Plant Cell Physiol. 32, 853-861.
- HULL, R. y DAVIES, J.W. (1992). Approaches to nonconventional control of plant virus diseases. Crit. Rev. Plant Sci. 11, 17-33.
- ICTV. (1995). Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch. Virol. 10. Murphy, F., Fauquet, C., Bishop, D., Ghabrial, S., Jarvis A., Martelli, G., Mayo, M. y Summers, M. (eds). Springer-Verlag. Wien. New York.
- JAMET, E. y FRITIG, B. (1986). Purification and characterization of 8 of the pathogenesis-related proteins in tobacco leaves reacting hypersensitively to tobacco mosaic virus. Plant Mol. Biol. 6, 69-80.

JEFFERSON, R.A., KAVANAGH, T.A. Y BEVAN, M.W. (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. **6**, 3901-3907.

JOHNSON, D.A., GAUTSCH, J.W., SPORTSMAN, J.R. y ELDER, J.H. (1984). Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. Gene. Anal. Tech. **1**, 3-8.

JONES, J.D., DUNSMUIR, P. y BEDBROOK, J. (1985). High levels expression of introduced chimaeric genes in regenerated transformed plants. EMBO J. **4**, 2411-2418.

JOOSTEN, M.H.A. y DE WIT, P.J.G.M. (1989). Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia Fulva*) as 1,3- β -glucanases and chitinases. Plant Physiol. **89**, 945-951.

JOOSTEN, M.H.A., BERGMANS, C.J.B., MEULENHOF, E.J.S., CORNELISSEN, B.J.C. y DE WIT, P.J.G.M. (1990). Purification and serological characterization of three basic 15-kilodalton pathogenesis-related (PR) proteins from tomato. Plant Physiol. **94**, 585-591.

JOSHI, R.L. y JOSHI, V. (1991). Strategies for expression of foreign genes in plants. Potential use of engineered plants. FEBS Lett. **281**, 1-8.

JUNG, J.L. y HAHNE, G. (1992). A simple method to increase resolution in whole leaf blotting. Plant Sci. **82**, 125-132.

KANIEWSKI, W., LAWSON, C., SAMMONS, B., HALEY, L., HART, J., DELANNAY, X. y TUMER, N. (1990). Field resistance of transgenic Russet Burbank potato to effects of infection by potato virus X and potato virus Y. Bio/Technology **8**, 750-754.

KANIEWSKI, W.K. y THOMAS, P.E. (1993). Field testing of virus resistant transgenic plants. Seminars in Virology **4**, 389-396.

KAUFFMANN, S., LEGRAND, M., GEOFFROY, P. y FRITIG, B. (1987). Biological function of "pathogenesis-related" proteins. Four PR-proteins of tobacco have 1,3- β -glucanase activity. EMBO J. **6**, 3209-3212.

KAUFFMANN, S., LEGRAND, M. y FRITIG, B. (1990). Isolation and characterization of six pathogenesis-related (PR) proteins of Samsun NN tobacco. Plant Mol. Biol. **14**, 381-390.

KAWCHUK, L.M., MARTIN, R.R. y McPHERSON, J. (1990). Resistance in transgenic potato expressing the potato leafroll virus coat protein gene. Mol. Plant Microbe Interact. **3**, 301-307.

KAWCHUK, L.M., MARTIN, R.R. y McPHERSON, J. (1991). Sense and antisense RNA-mediated resistance to potato leafroll virus in Russet Burbank potato plants. Mol. Plant Microbe Interact. **4**, 247-253.

KEEFE, D., HINZ, U. y MEINS, F. (1990). The effect of ethylene on the cell type-specific and intracellular localization of the β -1,3-glucanase and chitinase in tobacco leaves. Planta **182**, 43-51.

KEEN, N.T. (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. Annu. Rev. Genet. **24**, 447-463.

KEEN, N.T. (1992). The molecular biology of disease resistance. Plant Mol. Biol. **19**, 109-122.

KESSMANN, H., STAUB, T., HOFMANN, C., MAETZKE, T., HERZOG, J., WARD, E., UKNES, U. y RYALS, J. (1994). Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. Annu. Rev. Phytopathol. **32**, 439-459.

- KIM, Y.J. y HWANG, B.K.** (1994). Differential accumulation of β 1,3-glucanase and chitinase isoforms in pepper stems infected by compatible and incompatible isolates of *Phytophthora capsici*. Physiol. Mol. Plant Pathol. **45**, 195-209.
- KLEMENT, A., KYRALY, Z. y PZSAR, B.I.** (1966). Suppression of virus multiplication and local lesion production in tobacco following inoculation with a saprophytic bacteria. Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung. **1**, 11-18.
- KLESSIG, D.F. y MALAMY, J.** (1994). The salicylic acid signal in plants. Plant Mol. Biol. **26**, 1439-1458.
- KOLLÁR, A., DALMAY, T. y BURGYÁN, I.** (1993). Defective interfering RNA-mediated resistance against cymbidium ringspot tomosvirus in transgenic plants. Virology **193**, 313-318.
- KOMBRINK, E., SCHRÖDER, M. y HALBROCK, K.** (1988). Several "pathogenesis-related" proteins in potato are 1,3- β -glucanases and chitinases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 782-786.
- KOMBRINK, E., BEERHUES, L., GARCÍA-GARCÍA, F., HALBROCK, K., MÜLLER, M., SCHRÖDER, M., WITTE, B. y SCHMELZER, E.** (1993). Expression patterns of defense-related genes in infected and uninfected plants. In Mechanisms of Plant Defense Responses. B. Fritig and M. Legrand (eds). Kluwer Acad. Publishers. Dordrecht. pp 236-249.
- LAEMMLI, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**, 680-685.
- LAREBEKE, N., ENGLER, G., HOLSTERS, M. ELSACKER, S. van den ZAENEN, I., SCHILPEROORT, R.A. y SCHELL, J.** (1974). Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown-gall inducing ability. Nature **258**, 169-170.
- LAWSON, C., KANIEWSKI, W., HALEY, L., ROZMAN, R., NEWELL, C., SANDERS, P. y TUMER, N.E.** (1990). Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: Resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank. Bio/Technology **8**, 127-134.
- LAWTON, K., UKNES, S., FRIEDRICH, L., GAFFNEY, T., ALEXANDER, D., GOODMAN, R., METRAUX, J.P., KESSMANN, H., AHL GOY, P., GUT RELLA, M., WARD, E. y RYALS, J.** (1993). The molecular biology of systemic acquired resistance. In Mechanisms of defense responses in plants. Fritig, B. y Legrand, M. (eds). Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands. pp 422-432.
- LECLERC, D. y ABOUHAI DAR, M.G.** (1995). Transgenic tobacco plants expressing a truncated form of the PAMV capsid protein (CP) gene show CP-mediated resistance to potato aucuba mosaic virus. Mol. Plant Microbe Interact. **8**, 58-65
- LECOQ, H., RAVELONANDRO, M., WIPF-SCHEIBEL, C., MONSION, M., RACCAH, B. y DUNEZ, J.** (1993). Aphid transmission of a non-aphid transmissible strain of zucchini yellow mosaic potyvirus from transgenic plants expressing the capsid protein of plum pox potyvirus. Mol. Plant Microbe Interact. **6**, 403-406.
- LEGRAND, M., KAUFFMANN, S., GEOFFROY, P. y FRITIG, B.** (1987). Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 6750-6754.
- LINDBO, J.A. y DOUGHERTY, W.G.** (1992a). Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. Virology **189**, 725-733.

- LINDBO, J.A. y DOUGHERTY, W.G. (1992b). Pathogen-derived resistance to a potyvirus: immune and resistant phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. Mol. Plant Microbe Interact. **5**, 144-153.
- LINDBO, J.A., SILVA-ROSALES, L. y DOUGHERTY, W.G. (1993). Pathogen derived resistance to potyviruses: working, but why?. Seminars in Virology **4**, 369-379.
- LING, K., NAMBA, S., GONSALVES, C., SLIGHTOM, J.L. y GONSALVES, D. (1991). Protection against detrimental effects of potyvirus infection in transgenic tobacco plants expressing the papaya ringspot virus coat protein gene. Bio/Technology **9**, 752-758.
- LINTHORST, H.J.M., MEUWISSEN, R.L.J., KAUFFMANN, S. y BOL, J.F. (1989). Constitutive expression of pathogenesis-related proteins PR-1, GRP, and PR-S in tobacco has no effect on virus infection. Plant Cell **1**, 285-291.
- LINTHORST, H.J.M. (1991). Pathogenesis-related proteins of plants. Crit. Rev. Plant Sci. **10**, 123-150.
- LIU, W., PARROTT, W.A., HILDEBRAND, D.F., COLLINS, G.B. y WILLIAMS, E.G. (1990). *Agrobacterium* induced gall formation in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and formation of shoot-like structures expressing introduced genes. Plant Cell Reports **9**, 360-364.
- LOESCH-FRIES, L.S., MERLO, D., ZINNEN, T., BURHOP, L., HILL, K., KRAHN, K., JARVIS, N., NELSON, S. y HALH, E. (1987). Expression of alfalfa mosaic virus RNA 4 in transgenic plants confers virus resistance. EMBO J. **6**, 1845-1851.
- LUCAS, J., HENRIQUEZ, A.C., LOTTSPEICH, F., HENSCHEN, A. y SÄNGER, H.L. (1985). Amino acid sequence of the "pathogenesis-related" leaf protein p14 from viroid-infected tomato reveals a new type of structurally unfamiliar proteins. EMBO J. **4**, 2745-2749.
- MACKENZIE, D. y TREMAINE, J.H. (1990). Transgenic *Nicotiana debneyii* expressing viral coat protein are resistant to potato virus S infection. J. Gen. Virol. **71**, 2167-2170.
- MACKENZIE, D., TREMAINE, J.H. y MCPHERSON, J. (1991). Genetically engineered resistance to potato virus S in potato cultivar Russet Burbank. Mol. Plant Microbe Interact. **4**, 95-102.
- MALAMY, J., CARR, J.P., KLESSIG, D.F. y RASKIN, I. (1990). Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. Science **250**, 1002-1004.
- MALYSHENKO, S.I., KONDAKOVA, O.A., NAZAROVA, J.V., KAPLAN, I.B., TALIANSKY, M.E. y ATABEKOV, J.G. (1993). Reduction of tobacco mosaic virus accumulation in transgenic plants producing non-functional viral transport proteins. J. Gen. Virol. **74**, 1149-1156.
- MAXAM, A.M. y GILBERT, W. (1977). A new method for sequencing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 560.
- MANSKY, L.M. y HILL, J.H. (1993). Molecular basis for virus disease resistance in plants. Arch. Virol. **131**, 1-16.
- MARGIS-PINHEIRO, M., METZ-BOUTIGUE, M.H., AWADE, A., DE TAPIA, M., LE RET, M. y BURKARD, G. (1991). Isolation of a complementary DNA encoding the bean PR4 chitinase: an acidic enzyme with an amino-terminus cysteine-rich domain. Plant Mol. Biol. **17**, 243-253.
- MARTELLI, G.P. y QUACQUARELLI, A. (1982). The present status of tomato and pepper viruses. Acta Hort. **127**, 39-95.

- MAUCH, F., MAUCH-MANI, B. y BOLLER, T.** (1988). Antifungal hydrolases in pea tissue II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. Plant Physiol. **88**, 936-942.
- McGARVEY, P.B., KAPER, J.M., ÁVILA-RINCÓN, M.J., PEÑA, L. y DÍAZ-RUIZ, J.R.** (1990). Transformed tomato plants express a satellite RNA of cucumber mosaic virus and produced lethal necrosis upon infection with viral RNA. Biochem. Biophys. Res. Comm. **170**, 548-555.
- McKINNEY, H.H.** (1929). Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar. J. Agricult. Res. **39**, 557-578.
- MEINS, F., NEUHAUS, J.M. SPERISEN, C. y RYALS, J.** (1992). The primary structure of plant pathogenesis-related glucano-hydrolases and their genes. In Genes Involved in Plant Defense. Meins, F. y Boller, T. (eds). Springer-Verlag. Vienna/New York. pp 245-282.
- MELCHERS, L.S., SELA-BUURLAGE, M.B., VLOEMANS, S.A. y WOLOSHUK, C.P.** (1993). Extracellular targeting of the vacuolar tobacco proteins AP24, chitinase and β -1,3-glucanase in transgenic plants. Plant Mol. Biol. **21**, 583-593.
- MELCHERS, L.S., GROOT, A., VAN DER KNAAP, J.A., PONSTEIN, A.S., SELA-BUURLAGE, M.B., BOL, J.F., CORNELISSEN, B.J.C., VAN DEN ELZEN, P.J.M. y LINTHORST, H.J.M.** (1994). A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. Plant J. **5**, 469-480.
- MEMELINK, J., LINTHORST, H.J.M., SCHILPEROORT, R.A. y HOGE, J.H.C.** (1990). Tobacco genes encoding acidic and basic isoforms of pathogenesis-related proteins display different expression patterns. Plant Mol. Biol. **14**, 119-126.
- MESHI, T., WATANABE, Y., SAITO, T., SUGIMOTO, A., MAEDA, T. y OKADA, Y.** (1987). Function of the 30-kD protein of tobacco mosaic virus: involvement in cell-to-cell movement and dispensability for replication. EMBO J. **7**, 2557-2567.
- MORRISSEY, J.H.** (1981). Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. Anal. Biochem. **117**, 307-310.
- MUNDRY, K.W., WATKINS, P.A.C., ASHFIELD, T., PLASKITT, K.A., EISELE-WALTER, S. y WILSON, T.M.A.** (1991). Complete uncoating of the 5' leader sequence of tobacco mosaic virus RNA occurs rapidly and is required to initiate cotranslational virus disassembly *in vitro*. J. Gen. Virol. **72**, 769-777.
- MURASHIGE, T. y SKOOG, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with the tobacco tissue cultures. Physiol. Plant **15**, 473-497.
- MURRY, L.E., ELLIOTT, L.G., CAPITANT, S.A., WEST, J.A., HANSON, K.K., SCARAFIA, L., JOHNSTON, S., FLAHERTY, C.D., NICHOLS, S., CUNANAN, D., DIETRICH, P.S., METTLER, I.J., DEWALD, S., WARNICK, D.A., RHODES, C., SINIBALDI, R.M. y BRUNKE, K.J.** (1993). Transgenic corn plants expressing MDMV strain B coat protein of maize dwarf mosaic virus and maize chlorotic mottle virus. Bio/Technology **11**, 1559-1564.
- NAKAJIMA, M., HAYAKAMA, T., NAKAMURA, I. y SUZUKI, M.** (1993). Protection against cucumber mosaic virus (CMV) strains O and Y and chrysanthemum mild mottle virus in transgenic tobacco plants expressing CMV-O coat protein. J. Gen. Virol. **74**, 319-322.
- NAMBA, S., LING, K., GONSALVES, C., GONSALVES, D. y SLIGHTOM, J.L.** (1991). Expression of the gene encoding the coat protein of cucumber mosaic virus (CMV) strain WL appears to provide protection to tobacco plants against infection by several different CMV strains. Gene **107**, 181-188.

- NAMBA, S., LING, K., GONSALVES, C., SLIGHTOM, J.L. y GONSALVES, D.** (1992). Protection of transgenic plants expressing the coat protein gene of watermelon mosaic virus II or zucchini yellow mosaic virus against six potyviruses. Phytopathology **82**, 940-945.
- NASSER, W., TAPIA, M., KAUFFMANN, S., MONTASSER-KOUHSARI, S. y BURKARD, G.** (1988). Identification and characterization of maize pathogenesis-related proteins. Four maize PR proteins are chitinases. Plant Mol. Biol. **11**, 529-538.
- NASSUTH, A. y SÄNGER, H.L.** (1986). Immunological relationship between "pathogenesis-related" leaf proteins from tomato, tobacco and cowpea. Virus Res. **4**, 229-242.
- NEJIDAT, A. y BEACHY, R.N.** (1989). Decreased levels of TMV coat protein in transgenic tobacco plants at elevated temperatures reduces resistance to TMV infection. Virology **173**, 531-538.
- NEJIDAT, A. y BEACHY, R.N.** (1990). Transgenic tobacco plants expressing a tobacco virus coat protein gene are resistant to some other tobamoviruses. Mol. Plant Microbe Interact. **3**, 247-251.
- NELSON, R.S., POWELL-ABEL, P. y BEACHY, R.N.** (1987). Lesions and virus accumulation in inoculated transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of tobacco mosaic virus. Virology **158**, 126-132.
- NELSON, R.S., Mc CORMICK, S.M., DELANNAY, X., DUBE, P., LAYTON, J., ANDERSON, E.J., KANIEWSKA, M., PROSKCH, R.K., HORSCH, R.B., ROGERS, S.G., FRALEY, R.T. y BEACHY, R.N.** (1988). Virus tolerance, plant growth and field performance of transgenic tomato plants expressing coat protein from tobacco mosaic virus. Bio/Technology **6**, 403-409.
- NELSON, R.S., ROTH, D.A. y JOHNSON, J.D.** (1993). Infection of transgenic *Nicotiana tabacum* plants is inhibited by antisense constructs directed at the 5' region of viral-RNA. Gene **127**, 227-232.
- NICOUD, S., DUMAS, E., CORNU, A. y GIANINAZZI, S.** (1988). Hypersensitive reaction in *Petunia*: II. The induction of resistance and soluble leaf proteins in TMV infected *Petunia* cultivars. J. Phytopathol. **121**, 65-74.
- NIDA, D.L., ANJOS, J.R., LOMONOSSOFF, G.P. y GHABRIAL, S.A.** (1992). Expression of cowpea mosaic virus coat protein precursor in transgenic tobacco plants. J. Gen. Virol. **73**, 157-163.
- NIDERMAN, T., BRUYERE, T., GÜGLER, K. y MÖSINGER, E.** (1993). Antifungal activity of native and recombinant tomato P14 proteins. In Mechanisms of Plant Defense Responses. Fritig, B. y Legrand, M. (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp 450.
- NIDERMAN, T., GENETET, I., BRUYERE, T., GEES, R., STINIZI, A., LEGRAND, M., FRITIG, B. y MÖSINGER, E.** (1995). Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal: Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. Plant Physiol. **108**, 17-27.
- O'FARRELL, P.H.** (1975). High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. **250**, 4007-4021.
- OKUNO, T., NAKAYAMA, M., YOSHIDA, S., FURUSAWA, I. y KOMIYA, T.** (1993a). Comparative susceptibility of transgenic tobacco plants and protoplasts expressing the coat protein gene of cucumber mosaic virus to infection with virions and RNA. Phytopathology **83**, 542-547.
- OKUNO, T., NAKAYAMA, M. y FURUSAWA, I.** (1993b). Cucumber mosaic virus coat protein-mediated protection. Seminars in Virology **4**, 357-361.

- OSBOURN, J.K., PLASKITT, K.A., WATTS, J.W. y WILSON, T.M.A. (1989a). Tobacco mosaic virus coat protein and reporter gene transcripts containing the TMV origin-of-assembly sequence do not interact in double-transgenic tobacco plants: implications for coat protein-mediated protection. Mol. Plant Microbe Interact. 6, 340-345.
- OSBURN, J.K., WATTS, J.W., BEACHY, R.N. y WILSON, T.M.A. (1989b). Evidence that nucleocapsid disassembly and a later step in virus replication are inhibited in transgenic tobacco protoplasts expressing TMV coat protein. Virology 172, 370-373.
- OUCHTERLONY, Ö y NILSSON, L.A. (1986). Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In Handbook of Experimental Immunology. Vol. 1. Immunochemistry. Weir, D.M. (ed). Blackwell Scientific Publications. pp 32.1-32.50.
- PALUDAN, N. (1982). Virus attack in danish cultures of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) specially concerning tobacco mosaic virus. Acta Hortic. 127, 65-78.
- PALUKAITIS, P. y ZAITLIN, M. (1984). A model to explain the "cross-protection" phenomenon shown by plant viruses and viroids. In Plant Microbe Interactions: Molecular and Genetic Perspectives. Vol 1. Kosuge, T. y Nester, E.W. (eds). Macmillan, New York. pp 420-429.
- PALUKAITIS, P. y ZAITLIN, M. (1986). Tobacco mosaic virus: infectivity and replication. In The Plant Viruses. Vol. 2. van Regenmortel, M.H.V. y Fraenkel-Conrat, H. (eds). Plenum Press, New York. pp 105-131.
- PAN, S.O., YE, X.S. y KUC, J. (1989). Direct detection of β -1,3-glucanase isozymes on polyacrylamide electrophoresis and isoelectrofocusing gels. Anal. Biochem. 182, 136-140.
- PAN, S.O., YE, X.S. y KUC, J. (1991). A technique for detection of chitinase, β -1,3-glucanase, and protein patterns after a single separation using polyacrylamide gel electrophoresis or isoelectrofocusing. Phytopathology 81, 970-974.
- PARENT, J.G. y ASSELIN, A. (1987). Acidic and basic extracellular pathogenesis-related proteins from fifteen potato cultivars. Phytopathology 77, 1122-1125.
- PARENT, J.G., HOGUE, R. y ASSELIN, A. (1988). Serological relationships between pathogenesis-related proteins from four *Nicotiana* species, *Solanum tuberosum*, and *Chenopodium amaranticolor*. Can. J. Bot. 66, 199-202.
- PARES, R.D. (1985). A tobamovirus infecting *Capsicum* in Australia. Annu. Appl. Biol. 106, 469-474.
- PAYNE, G., MIDDLESTEADT, W., DESAI, N., WILLIAMS, S., DINCHER, S., CARNES, M. y RYALS, J. (1989). Isolation and sequence of a genomic clone encoding the basic form of pathogenesis-related protein 1 from *Nicotiana tabacum*. Plant Mol. Biol. 12, 595-596.
- PAYNE, G., WARD, E., GAFFNEY, T., AHL, P., MOYER, M., HARPER, A., MEINS, F. y RYALS, J. (1990). Evidence for a third structural class of β -1,3-glucanase in tobacco. Plant Mol. Biol. 15, 797-802.
- PENNAZIO, S. y ROGGERO, P. (1988). Systemic acquired resistance induced in tobacco plants by localized virus infection does not operate against challenging viruses that infect systemically. J. Phytopathol. 121, 255-266.
- PENNAZIO, S. y ROGGERO, P. (1991a). Acquired resistance in hypersensitive tobacco operates by limiting cell-to-cell spread of virus infection without affecting virus multiplication. J. Phytopathol. 132, 258-261.

- PENNAZIO, S. y ROGGERO, P. (1991b). The hypersensitive reaction of soybean to tobacco necrosis virus does not induce systemic resistance. Phytopathol. Medit. 30, 72-74.
- PEÑA, L., TRAD, J., DÍAZ-RUIZ, J.R., MCGARVEY, P.B. y KAPER, J.M. (1994). Cucumber mosaic virus protection in transgenic tobacco plants expressing monomeric, dimeric, or partial sequences of a benign satellite RNA. Plant Sci. 100, 71-81.
- PIERPOINT, W.S., TATHAM, A.S. y PAPPIN, D.J.C. (1987). Identification of the virus-induced protein of tobacco leaves that resembles the sweet-protein thaumatin. Physiol. Mol. Plant Pathol. 31, 291-298.
- PIERPOINT, W.S., JACKSON, P.J. y EVANS, R.M. (1990). The presence of a thaumatin-like protein, a chitinase and a glucanase among the pathogenesis-related proteins of potato (*Solanum tuberosum*). Physiol. Mol. Plant Pathol. 36, 325-338.
- PONZ, F. y BRUENING, G. (1986). Mechanisms of resistance to plant viruses. Annu. Rev. Phytopathol. 24, 355-381.
- POTRYKUS, I. (1991). Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. Annu. Rev. Plant Physiol. 42, 205-225.
- POWELL, P.A., NELSON, R.S., DE, B., HOFFMANN, N., ROGERS, S.G., FRALEY, R.T. y BEACHY, R.N. (1986). Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. Science 232, 738-743.
- POWELL, P.A., SANDERS, P.R., TUMER, N., FRALEY, R.T. y BEACHY, R.N. (1990). Protection against tobacco mosaic virus infection in transgenic plants requires accumulation of coat protein rather than coat protein RNA sequences. Virology 175, 124-130.
- PRINS, M., DE HAAN, P., LUYTEN, R., VAN VELLER, M., VAN GRINSVEN, M.O.J.M. y GOLBACH, R. (1995). Broad resistance to tospoviruses in transgenic tobacco plants expressing three tospoviral nucleoprotein gene sequences. Mol. Plant Microbe Interact. 8, 85-91.
- QUADT, R. y JASPARS, E.M.J. (1989). RNA polymerases of plus-strand RNA viruses of plants. Mol. Plant Microbe Interact. 2, 219-223.
- QUEMADA, H.D., GONSALVES, D. y SLIGHTOM, J.L. (1991). Expression of the coat protein gene from cucumber mosaic virus strain C in tobacco: protection against infection by CMV strains transmitted mechanically or by aphids. Phytopathology 81, 794-802.
- RASMUSSEN, J.B., HAMMERSCHMIDT, R. y ZOOK, M.N. (1991). Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. Plant Physiol. 97, 1342-1347.
- RASMUSSEN, U. GIESE, H. y MIKKELSEN, J.D. (1992a). Induction and purification of chitinase in *Brassica napus* L. ssp. *oleifera* infected with *Phoma lingam*. Planta 187, 328-334.
- RASMUSSEN, U., BOJSEN, K. y COLLINGE, D.B. (1992b). Cloning and characterization of a pathogen-induced chitinase in *Brassica napus*. Plant Mol. Biol. 20, 277-287.
- RAST, A.Th.B. (1977). Introductory remarks on strains of TMV infecting peppers in the Netherlands. In Comptes Rendues du 3me Congres Eucarpia sur la Genetique et la Selection du Piment, Eucarpia 77. Montfavet/Avignon. pp 83-84.
- RAST, A.Th.B. (1988). Pepper tobamovirus and pathotypes in resistance breeding. Capsicum Newsl. 7, 20-23.

REGISTER III, J.C. y BEACHY, R.N. (1988). Resistance to TMV in transgenic plants results from interference with an early event in infection. Virology 166, 524-532.

REGISTER III, J.C., POWELL, P.A., NELSON, R.S. y BEACHY, R.N. (1989). Genetically engineered cross protection against TMV interferes with initial infection and long distance spread of the virus. In Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions. Staskawicz, B., Ahlquist, P. y Yoder, O. (eds). Alan R. Liss, New York. pp 269-281.

REGISTER III, J.C y NELSON, R.S. (1992). Early events in plant virus infection: relationships with genetically engineered protection and host gene resistance. Seminars in Virology 3, 441-451.

REGNER, F., DA CÂMARA MACHADO, A., DA CÂMARA MACHADO, M.L., STEINKELLNER, H., MATTANOVICH, D., HANZER, V., WEISS, H. y KATINGER, H. (1992). Coat protein mediated resistance to Plum Pox Virus in *Nicotiana clevelandii* and *N. benthamiana*. Plant Cell Reports 11, 30-33.

REIMANN-PHILIPP, U. y BEACHY, R.N. (1993a). The mechanism(s) of coat protein-mediated resistance against tobacco mosaic virus. Seminars in Virology 4, 359-356.

REIMANN-PHILIPP, U. y BEACHY, R.N. (1993b). Coat protein-mediated resistance in transgenic tobacco expressing the tobacco mosaic virus coat protein from tissue-specific promoters. Mol. Plant Microbe Interact. 6, 323-330.

RESENDE, R. DE O., DE HAAN, P., VAN DE VOSSEN, E., DE AVILA, A.C., GOLDBACH, R. y PETERS, D. (1992). Defective interfering L RNA segments of tomato spotted wilt virus retain both virus genome termini and have extensive terminal deletions. J. Gen. Virol. 73, 2509-2516.

ROBERTS, W.K. y SELITRENNIKOFF, C.P. (1990). Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity.. J. Gen. Microbiol. 136, 1771-1778.

RODRIGO, I., VERA, P., FRANK, R. y CONEJERO, V. (1991). Identification of the viroid-induced tomato pathogenesis-related (PR) protein P23 as the thaumatin-like tomato protein NP24 associated with osmotic stress. Plant Mol. Biol. 16, 931-934.

RODRIGO, I., VERA, P., TORNERO, P., HERNANDEZ-YAGO, J. y CONEJERO, V. (1993). cDNA cloning of viroid-induced tomato pathogenesis-related protein P23. Plant Physiol. 102, 939-945.

ROSS, A.F. (1961a). Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive host. Virology 14, 329-339.

ROSS, A.F. (1961b). Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. Virology 14, 340-358.

ROSS, A.F. (1966). Systemic effects of local lesion formation. In Viruses of Plants. Beemster, A.R.B. y Dijkstras, J. (eds). Amsterdam, North Holland. pp 127-150.

RUBINO, L., CAPRIOTTI, G., LUPO, R. y RUSSO, M. (1993). Resistance to cymbidium ringspot tobravirus infection in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing the virus coat protein gene. Plant Mol. Biol. 21, 665-672.

RYALS, J., UKNES, S. y WARD, E. (1994). Systemic acquired resistance. Plant Physiol. 104, 1109-1112.

SAMBROOCK, J., FRITSCH, E.F. y MANIATIS, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. (2nd edn). Col Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.

- SANDERS, P.R., SAMMONS, B., KANIEWSKI, W.K., HALEY, L., LAYTON, J., LA VALLEE, B.J., DELANNAY, X. y TUMER, N.E. (1992). Field resistance of transgenic tomatoes expressing the tobacco mosaic virus or tomato mosaic virus coat protein genes. Phytopathology 82, 683-690.
- SANFORD, J.C. y JOHSTON, S.A. (1985). The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome. J. Theor. Biol. 113, 395-405.
- SELASSIE, K.G., DUMAS DE VAULX, P., MARCHOUX, G. y POCHARD, E. (1981). Le virus de la mosaïque du tabac chez le piment. I. Apparition en France du pathotype P_{1,2}. Agronomie 1, 853-858.
- SELASSIE, K.G. y MARCHOUX, G. (1991). Identification and characterization of tobamovirus strains infecting L-resistant genotypes of peppers in France. J. Phytopathol. 131, 275-289.
- SHAW, J.G., PLASKITT, K.A. y WILSON, T.M.A. (1986). Evidence that tobacco mosaic virus particles disassemble cotranslationally *in vivo*. Virology 148, 326-336.
- SHERWOOD, J.L. (1987). Mechanisms of cross-protection between plant virus strains. In Plant resistance to viruses. Evered, D. y Harnett, S. (eds). Ciba Found Symp. 133. pp 136-150.
- SHERWOOD, J.L. y FULTON, R.W. (1982). The specific involvement of coat protein in tobacco mosaic virus cross protection. Virology 119, 150-158.
- SHINSHI, H., NEUHAUS, J.M., RYALS, J. y MEINS, F. (1990). Structure of a tobacco endochitinase gene: evidence that different chitinase genes can arise by transposition of sequences encoding a cysteine-rich domain. Plant Mol. Biol. 14, 357-368.
- SILVA-ROSALES, L., LINDBO, J.A. y DOUGHERTY, W.G. (1994). Analysis of transgenic tobacco plants expressing a truncated form of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. Plant Mol. Biol. 24, 929-939.
- SOUTHERN, E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gels electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503.
- STARK, D.M. y BEACHY, R.N. (1989). Protection against potyvirus infection in transgenic plants: evidence for broad spectrum resistance. Bio/Technology 7, 1257-1262.
- STINTZI, A., HEITZ, T., KAUFFMANN, S., LEGRAND, M. y FRITIG, B. (1991). Identification of a basic pathogenesis-related, thaumatin-like protein of virus-induced tobacco as osmotin. Physiol. Mol. Plant Pathol. 38, 137-146.
- STINTZI, A., HEITZ, T., PRASAD, V., WIEDEMANN-MERDINOGLU, S., KAUFFMANN, S., GEOFFROY, P., LEGRAND, M. y FRITIG, B. (1993a). Plant "pathogenesis-related" proteins and their role in defense against pathogens. Biochimie 75, 687-706.
- STINTZI, A., GEOFFROY, P., BERSUDER, D., FRITIG, B. y LEGRAND, M. (1993b). cDNA cloning and expression studies of tobacco class III chitinase-lysozymes. In Mechanisms of Plant Defense Responses. Fritig, B. y Legrand, M. (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp 312-315.
- SULZINSKI, M.A. y ZAITLIN, M. (1982). Tobacco mosaic virus replication in resistant and susceptible plants: in some resistant species virus is confined to a small number of initially infected cells. Virology 121, 12-19.
- TAVAZZA, R., ORDAS, R.J., TAVAZZA, M., ANCORA, G. y BENVENUTO, E. (1988). Genetic transformation of *Nicotiana clevelandii* using a Ti plasmid derived vector. J. Plant Physiol. 133, 640-644.

- TAVLADORAKY, P., BENVENUTO, E., TRINCA, S., DE MARTINIS, D., CATTANEO, A. y GALEFFI, P. (1993). Transgenic plants expressing a functional single chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. Nature **366**, 469-472.
- TENLLADO, F. (1995). Análisis de la estrategia transgénica mediada por la replicasa viral frente al tobamovirus del moteado suave del pimiento. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, UAM.
- TENLLADO, F., GARCÍA-LUQUE, I., SERRA, M.T. y DÍAZ-RUIZ, J.R. (1995). *Nicotiana benthamiana* plants transformed with the 54-kDa region of the pepper mild mottle virus replicase gene exhibit two types of resistance responses against viral infection. Virology **211**, 170-183.
- TOBIAS, I., FRASER, R.S.S. y GERWITZ, A. (1989). The gene-for-gene relationship between *Capsicum annuum* L and tobacco mosaic virus: effects on virus multiplication, ethylene synthesis and accumulation of pathogenesis-related proteins. Physiol. Mol. Plant Pathol. **35**, 271-286.
- TORNERO, P., RODRIGO, I., CONEJERO, V. y VERA, P. (1993). Nucleotide sequence of a cDNA encoding a pathogenesis-related protein, P1-p14, from tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Physiol. **102**, 325.
- TORNERO, P., CONEJERO, V. y VERA, P. (1994). A gene encoding a novel isoform of the PR-1 protein family from tomato is induced upon viroid infection. Mol. Gen. Genet. **243**, 47-53.
- TOWBIN, H., STAENHELIN, T., y GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 4350-4354.
- TRUDEL, J. y ASSELIN, A. (1989). Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. **178**, 362-366.
- TRUDEL, J., AUDY, P. y ASSELIN, A. (1989). Electrophoretic forms of chitinase activity in Xanthi-nc tobacco, healthy and infected with tobacco mosaic virus. Mol. Plant Microbe Interact. **2**, 315-324.
- TUMER, N.E., OCONNELL, K.M., NELSON, R.S., SANDERS, P.R. BEACHY, R.N., FRALEY, R.T. y SHAH, D.M. (1987). Expression of alfalfa mosaic virus coat protein gene confers cross-protection in transgenic tobacco and tomato plants. EMBO J. **6**, 1181-1188.
- TUMER, N.E., KANIEWSKI, W., HALEY, L., GEHRKE, L., LODGE, J.K. y SANDERS, P. (1991). The second amino acid of alfalfa mosaic virus coat protein is critical for coat protein-mediated protection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 2331-2335.
- UCHYMIYA, H., HANDA, T. y BRAR, D.S. (1989). Transgenic plants. J. Biotechnol. **12**, 1-20.
- UKNES, S., MAUCH-MANI, B., MOYER, M., POTTER, S., WILLIAMS, S., DINCHER, S., CHANDLER, D., SLUSARENKO, A., WARD, E., y RYALS, J. (1992). Acquired resistance in Arabidopsis. Plant Cell **4**, 645-656.
- VAIRA, A.M., SEMERIA, L., CRESPI, S., LISA, V., ALLAVENA, A. y ACCOTTO, G.P. (1995). Resistance to tospoviruses in *Nicotiana benthamiana* transformed with the N gene of tomato spotted wilt virus: correlation between transgene expression and protection in primary transformants. Mol. Plant Microbe Interact. **1**, 66-73.
- VAN DE RHEE, M.D., LEMMERS, R. y BOL, F.J.F. (1993). Analysis of regulatory elements involved in stress-induced and organ-specific expression of tobacco acidic and basic β -1,3-glucanase genes. Plant Mol. Biol. **21**, 451-461.

- VAN DEN BULCKE, M., BAUW, G., CASTRESANA, C., VAN MONTAGU, M. y VANDEKERCKHOVE, J.** (1989). Characterization of vacuolar and extracellular $\beta(1,3)$ -glucanases of tobacco: evidence for a strictly compartmentalized plant defense system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 2673-2677.
- VAN DER VLUGT, R.A.A., RUITER, R.K. y GOLDBACH, R.** (1992). Evidence for sense RNA mediated protection to PVY^N in tobacco plants transformed with the viral coat protein cistron. Plant Mol. Biol. **20**, 631-639.
- VAN DER WILK, F., WILLINK, D.P.L., HUISMAN, M.J., HUTTINGA, H. y GOLDBACH, R.** (1991). Expression of the potato leafroll luteovirus coat protein gene in transgenic potato inhibits viral infection. Plant Mol. Biol. **17**, 431-439.
- VAN DUM, C.M.P. y BOL, J.F.** (1988). Transgenic tobacco plants accumulating tobacco rattle virus coat protein resist infection with tobacco rattle virus and pea early browning virus. Virology **167**, 649-652.
- VAN DUM, C.M.P., BOL, J.F. y VAN VLOTEN-DOTING, L.** (1988a). Expression of alfalfa mosaic virus and tobacco rattle virus coat protein genes in transgenic tobacco plants. Virology **159**, 299-305.
- VAN DUM, C.M.P., OVERDUING, B., BOL, J.F. y VAN VLOTEN-DOTING, L.** (1988b). Transgenic tobacco expressing tobacco streak virus or mutated alfalfa mosaic virus coat protein do not cross-protect against alfalfa mosaic virus. Virology **164**, 383-389.
- VAN HAUTE, E., JOOS, H., MAES, M., WARREN, G., VAN MONTAGU, M. y SCHELL, J.** (1983). Intergeneric transfer and exchange recombination of restriction fragments cloned in pBR 322: a novel strategy for the reverse genetics of the Ti- plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. EMBO J. **2**, 411-417.
- VAN KAN, J.A.L., JOOSTEN, M.H., WAGEMAKERS, C.A.M., VAN DEN BERG-VELTHUIS, G.C.M. y DE WIT, P.J.G.** (1992). Differential accumulation of mRNAs encoding extracellular and intracellular PR proteins in tomato induced by virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. Plant Mol. Biol. **20**, 513-527.
- VAN LOON, L.C.** (1985). Pathogenesis-related proteins. Plant Mol. Biol. **4**, 111-116.
- VAN LOON, L.C. y VAN KAMMEN, A.** (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var "Sansum" and "Sansum NN". II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. Virology **40**, 199-211.
- VAN LOON, L.C., GERRITSEN, Y.A.M., RITTER, C.E.** (1987). Identification, purification, and characterization of pathogenesis-related proteins from virus-infected Samsun NN tobacco leaves. Plant Mol. Biol. **9**, 593-609.
- VAN LOON, L.C., PIERPOINT, W.S., BOLLER, T. y CONEJERO, V.** (1994). Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. Plant Mol. Biol. Rep. **12**, 245-264.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V. y FRAENKEL-CONRAT, H.** (1986). *The road shaped plant viruses*. The Plant Viruses. Vol. 2. van Regenmortel, M.H.V. y Fraenkel-Conrat, H. (eds). Plenum Press, New York.
- VERA, P., YAGO, J.H. y CONEJERO, V.** (1988). Immunocytochemical localization of the major "pathogenesis-related" (PR) protein of tomato plants. Plant Sci. **55**, 223-230.
- VERA, P., YAGO, J.H. y CONEJERO, V.** (1989). "Pathogenesis-related" P1(p14) protein. Vacuolar and apoplastic localization in leaf tissue from tomato plants infected with citrus exocortis viroid; *in vitro* synthesis and processing. J. Gen. Virol. **70**, 1933-1942.

- VERDUIN, B.J.M. (1993). Early interaction between viruses and plants. Seminars in Virology 3, 423-431.
- VIGERS, A.J., WIEDEMANN, S., ROBERTS, W.K., LEGRAND, M., SELITRENNIKOFF, C.P. y FRITIG, B. (1992). Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal. Plant Sci. 83, 155-161.
- VÖGELI, U., MEINS, F. y BOLLER, T. (1988). Co-ordinated regulation of chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. Planta 174, 364-372.
- WARD, E.R., UKNES, S.J., WILLIAMS, S.C., DINCHER, S.S., WIEDERHOLD, D.L., ALEXANDER, A., AHL-GOY, P., METRAUX, J-P y RYALS, J.A. (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. Plant Cell 3, 1085-1094.
- WETTER, C., CONTI, M., ALTSCHUH, D., TABILLION, R. y VAN REGENMORTEL, M.H.V. (1984). Pepper mild mottle virus, a tobamovirus infecting pepper cultivars in Sicily. Phytopathology 74, 405-410.
- WHITE, R.F. (1979). Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. Virology 99, 410-412.
- WHITE, R.F., RYBICKI, E.P., VON WECHMAR, M.B., DEKKER, J.L. y ANTONIW, J.F. (1987). Detection of PR-1 type proteins in *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Gramineae* and *Solanaceae*, by immunoelectroblotting. J. Gen. Virol. 68, 2043-2048.
- WHITE, R.F. y ANTONIW, J.F. (1991). Virus-induced resistance in plants. Crit. Rev. Plant Sci. 9, 443-455.
- WICKE, B., TOSTADO, J.M., GARCÍA-LUQUE, I., SERRA, M.T. y DÍAZ-RUIZ, J.R. (1990). Synthesis of pepper mild mottle virus (PMMV-S) coat protein in plants and protoplasts of *Capsicum* spp. with different genotypes. VIIIth International Congress of Virology. Berlín, Alemania. P85-025, pp 477.
- WILSON, T.M.A., PLASKITT, K.A., WATTS, J.W., OSBOURN, J.K. y WATKINS, P.A.C. (1990). Signals and structures involved in early interactions between plants and viruses or pseudoviruses. In Recognition and Response in Plant-Virus Interactions. Fraser, R.S.S. (ed). Springer, Berlín, pp. 123-145.
- WILSON, T.M.A. (1993). Strategies to protect crop plants against viruses: Pathogen-derived resistance blossoms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 3134-3141.
- WISNIEWSKI, L.A., POWELL, P.A., NELSON, R.S. y BEACHY, R.N. (1990). Local and systemic spread of tobacco mosaic virus in transgenic tobacco. Plant Cell 2, 559-567.
- WU, X., BEACHY, R.N., WILSON, T.M.A. y SHAW, J.G. (1990). Inhibition of uncoating of tobacco mosaic virus particles in protoplasts from transgenic plants that express the viral coat protein gene. Virology 179, 893-895.
- WYATT, S.E., PAN, S.Q. y KUC, J. (1991). β -1,3-glucanase, chitinase, and peroxidase activities in tobacco tissues resistant and susceptible to blue mould as related to flowering, age and sucker development. Physiol. Mol. Plant Pathol. 39, 433-440.
- YALPANI, N., SILVERMAN, P., WILSON, T.M.A., KLEIER, D.A. y RASKIN, I. (1991). Salicylic acid is a systemic signal and inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. Plant Cell 3, 809-818.
- YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J. y MESSING, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33, 103-119.

YE, X.S., PAN, S.O. y KUC, J. (1990). Association of pathogenesis-related proteins and activities of peroxidase, β 1,3-glucanase and chitinase with systemic induced resistance to blue mould of tobacco but not to systemic tobacco mosaic virus. Physiol. Mol. Plant Pathol. **36**, 523-531.

YIE, Y., ZHAO, S.Z., LIU, Y.Z., LIU, Y.L. y TIEN, P. (1992). High-resistance to cucumber mosaic virus conferred by satellite RNA and coat protein in transgenic commercial tobacco cultivar g-140. Mol. Plant Microbe Interact. **5**, 460-465.

ZAITLIN, M. y HULL, R. (1987). Plant virus-host interactions. Annu. Rev. Plant Physiol. **38**, 291-315.

ZINNEN, T.M. y FULTON, R.W. (1986). Cross-protection between sunnhemp mosaic and tobacco mosaic viruses. J. Gen. Virol. **67**, 1679-1687.

ZUPAN, J.R. y ZAMBRYSKI, P. (1995). Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. Plant Physiol. **107**, 1041-1047.