

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



\* 5 3 0 9 5 5 0 0 3 5 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**MECANISMOS DE TRANSMISION DE VIRUS DEL GRUPO POTYVIRUS POR  
AFIDOS. ESTUDIO DEL FACTOR DE ADQUISICION "HELPER"**

Tesis doctoral presentada por Tomás Raimundo Canto Ceballos

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Tomás Raimundo Canto Ceballos'.

Director: Dr. Dionisio López-Abella

Vº Bº

Profesor de Investigación

Centro de Investigaciones Biológicas

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'D. López-Abella', with a long horizontal line underneath.

Madrid, 1994

**A mi Familia**

## INDICE

- SUMMARY	V
- RESUMEN	VIII
- ABREVIATURAS	XI
- AGRADECIMIENTOS	XIV

## I- CAPITULO PRIMERO

### Introducción general

I.1- LOS POTYVIRUS	1
I.1.1- Características de la partícula viral. Estructura del genoma, expresión y replicación	2
I.2- DISEMINACION DE LOS POTYVIRUS EN LA NATURALEZA	8
I.2.1- Tipos de transmisión por áfidos. El concepto de no persistencia	9
I.2.2- El componente ayudante o "helper" (HC-Pro) en la transmisión de los potyvirus por áfidos	10
I.2.3- La partícula viral en la transmisión de los potyvirus por áfidos	13
I.2.4- Posibles formas de actuación del componente "helper"	14
I.3- EL VIRUS Y DE LA PATATA (PVY)	15
I.4- OBJETIVOS	16
I.5- FIGURAS	

## II- CAPITULO SEGUNDO

### Transmisión por áfidos de aislados del virus Y de la patata: Caracterización de aislados no transmisibles con deficiencias en sus componentes "helper"

II.1- INTRODUCCION	18
II.2- MATERIALES Y METODOS	19
II.2.1- Aislados virales y plantas hospedantes	19
II.2.2- Microscopía electrónica	20
II.2.3- Purificación de virus y de componente "helper"	20
II.2.4- Serología	21

II.2.5- Transmisiones por áfidos:	21
II.2.5.1- Transmisiones de planta a planta	22
II.2.5.2- Transmisiones de adquisición a través de membranas	22
II.2.5.3- Transmisiones secuenciales	22
II.2.6- Análisis por inmunoelectrotransferencia del HC-Pro en preparaciones purificadas y en extractos de hoja infectada	23
II.2.7- Análisis de la acumulación de HC-Pro en hoja	23
II.3- RESULTADOS	24
II.3.1- Sintomatología y ultraestructura de células infectadas	24
II.3.2- Análisis de HC-Pro y de virus purificados	25
II.3.3- Transmisiones por áfidos	26
II.3.3.1- Transmisiones de planta a planta	26
II.3.3.2- Transmisiones de adquisición a través de membranas	27
II.3.3.3- Transmisiones secuenciales	27
II.3.4- Análisis por inmunoelectrotransferencia del HC-Pro en preparaciones purificadas	28
II.3.5- Análisis por inmunoelectrotransferencia del HC-Pro en extractos de hoja infectada	28
II.3.6- Análisis de la acumulación de HC-Pro en hoja	29
II.4- DISCUSION	30
II.5- FIGURAS	
II.6- ANEXO	

### **III- CAPITULO TERCERO**

#### **Análisis de las secuencias de los componentes "helper" de tres aislados del virus Y de la patata, dos de ellos no transmisibles por áfidos**

III.1- INTRODUCCION	34
III.2- MATERIALES Y METODOS	36
III.2.1- Aislados virales, propagación y purificación	36
III.2.2- Síntesis y clonaje de los cDNAs	36

III.2.3- Método de determinación de la secuencia nucleotídica	37
III.2.4- Análisis de secuencias	38
III.2.5- Perfiles de hidropatía	38
III.3- RESULTADOS	38
III.3.1- Secuencias nucleotídicas de los genes del HC-Pro de los aislados PVY-0, PVY-0 NAT y PVY-1	38
III.3.2- Análisis comparativo de las secuencias del HC-Pro de los aislados PVY-0, PVY-0 NAT y PVY-1	39
III.3.3- Perfiles de hidropatía	41
III.4- DISCUSION	41
III.5- FIGURAS	

#### **IV- CAPITULO CUARTO**

##### **Producción y caracterización de un anticuerpo policlonal y de anticuerpos monoclonales contra el componente "helper" del virus Y de la patata**

IV.1- INTRODUCCION	45
IV.2- MATERIALES Y METODOS	46
IV.2.1- Preparación de inmunógenos	46
IV.2.2- Producción de un anticuerpo policlonal contra el HC-Pro de PVY	46
IV.2.3- Producción de hibridomas e isotipaje	47
IV.2.4- Reactividad de los HC-Mabs y del HC-Pab con los componentes "helper" de PVY y de otros potyvirus	48
IV.2.5- Análisis por inmunoelectrotransferencia	50
IV.3- RESULTADOS	50
IV.3.1- Producción de un anticuerpo policlonal y de anticuerpos monoclonales contra el HC-Pro de PVY	50
IV.3.2- Reactividad de los HC-Mabs y del HC-Pab con los componentes "helper" de PVY y de otros potyvirus	51
IV.3.3- Análisis por inmunoelectrotransferencia	52
IV.4- DISCUSION	52
IV.5- FIGURAS	

## **V- CAPITULO QUINTO**

### **Algunas propiedades moleculares del componente "helper" del virus Y de la patata. Análisis electroforético y cromatográfico**

<b>V.1- INTRODUCCION</b>	<b>55</b>
<b>V.2- MATERIALES Y METODOS</b>	<b>55</b>
V.2.1- Aislados virales y purificación del HC-Pro	55
V.2.2- Análisis por inmunoelectrotransferencia del HC-Pro en preparaciones purificadas y en extractos de hoja infectada	56
V.2.3- Análisis por FPLC del HC-Pro en preparaciones purificadas y en extractos de hoja infectada	56
V.2.4- Transmisión por áfidos de virus con ayuda de preparaciones de HC-Pro tratadas con diferentes agentes químicos	57
<b>V.3- RESULTADOS</b>	<b>58</b>
V.3.1- Análisis por inmunoelectrotransferencia del HC-Pro en preparaciones purificadas y en extractos de hoja infectada	58
V.3.2- Análisis por FPLC del HC-Pro en preparaciones purificadas y en extractos de hoja infectada	59
V.3.3- Transmisión por áfidos de virus con ayuda de preparaciones de HC-Pro tratadas con diferentes agentes químicos	60
<b>V.4- DISCUSION</b>	<b>61</b>
<b>V.5- FIGURAS</b>	
<b>VI- CONCLUSIONES</b>	<b>65</b>
<b>VII- BIBLIOGRAFIA</b>	<b>69</b>

## SUMMARY

The transmissibility by aphids of four potato virus Y (PVY) isolates, PVY-0, PVY-0 NAT, PVY-1 and PVY-N, has been studied in plant to plant transmission assays. Isolates PVY-0 and PVY-N were aphid transmitted, whereas transmission of isolates PVY-0 NAT and PVY-1 never occurred. By membrane and sequential transmission assays, it has been determined that the lack of transmissibility of these two isolates was not due to a defect in their coat proteins (CP), but in their helper components (HC-Pro). However, while the HC-Pro of isolate PVY-0 NAT could be purified, that of isolate PVY-1 could not, under the same conditions. To determine whether this purification failure originated from the absence or from inadequate levels of HC-Pro in plant, a serological study on the HC-Pro distribution in plant and on its accumulation kinetics in the leaf was performed for both non transmissible mutants as well as for the transmissible isolate PVY-0, that demonstrated the presence of HC-Pro in PVY-1 infected plants. Moreover, the HC-Pro encoded by this isolate showed an electrophoretic behaviour different from that shown by the helper components of the other three PVY isolates analyzed.

The comparative analysis of the nucleotide sequences of the genes that code for the helper component proteins of the aphid transmissible isolate PVY-0, and of the non aphid transmissible isolates PVY-0 NAT and PVY-1 shows that a single point substitution differentiates the HC-Pro of PVY-0 NAT from that of PVY-0, suggesting that it causes the lack of viral transmissibility. This substitution is located within a highly conserved cysteine cluster in the amino region of the protein, in the same position of the substitutions that have been proposed to cause the lack of aphid transmissibility of two potyviruses: Potato virus C (PVC) and isolate E15-PAT of zucchini yellow mosaic virus, ZYMV. However, the sort of substitution is different (K→E for both PVC and ZYMV E15-PAT, K→N for PVY-0 NAT). On the other hand, PVY-1 HC-Pro differed from PVY-0 HC-Pro in two aminoacids. These substitutions are not found in any of the potyviral HC-Pro sequences compared. One of them (G→D), affects a highly conserved position, also encompassed within the above mentioned cysteine cluster. The

other one (S→G), is located in the carboxyl region of the protein, in a more variable position. These mutations could cause perturbations in the biological activities of the HC-Pro, and in its functionality in the transmission process.

Ten monoclonal antibodies (HC-Mabs) and a rabbit antiserum (HC-Pab) have been prepared against helper component (HC-Pro) purified from plants infected with PVY. Culture fluid of the Mabs reacted with PVY in two ELISA protocols and 7 out of 10 were useful for Western blot analysis, as was also the HC-Pab. Ascitic fluids from six HC-Mabs and the HC-Pab were compared in direct antigen binding ELISA with 22 isolates of PVY, potato virus A (PVA), tobacco etch virus (TEV), plum pox virus (PPV), and pepper mottle virus (PepMoV). None of the Mabs or the HC-Pab reacted with PVA, PPV or TEV. The immunoreactivity of one HC-Mab was identical with the HC-Pab, reacting with all 22 PVY isolates tested and with PepMoV but failing to react with PVA, PPV and TEV. Another HC-Mab reacted with all the common strains of PVY (PVY<sup>o</sup>) and with a stipple streak strain of PVY (PVY<sup>c</sup>) but not with any of the tobacco vein necrosis strains (PVY<sup>N</sup>). The other HC-Mabs could be used to identify a subgroup within the PVY<sup>o</sup> and PVY<sup>N</sup> strain groups. These Mabs provide another useful method for identifying strains of PVY and might be used in potyvirus taxonomy studies.

The analysis by Indirect ELISA of extracts from different leaves within a single infected tobacco plant showed that the lower leaves gave the optimal measures, in agreement with the accumulation of HC-Pro observed by Western Blot analysis. The capability of two HC-Mabs to work in DAS ELISA was also demonstrated. A contribution of insoluble HC-Pro in the form of cellular inclusions to the ELISA measures was not observed.

Purified helper component, extracts from virus infected plants and FPLC (Fast Permeation Liquid Chromatography) eluents of both kinds of samples were analyzed in SDS-PAGE plus Western blot with the aid of antibodies specific to this protein. In FPLC, the bulk of the HC-Pro eluted at times

corresponding to molecular weights of about 200 KDa, suggesting the existence of aggregates of HC-Pro monomers (about 50 KDa) in the form of tetramers, or with another factor. The stability of this aggregation seems not to be affected by the presence of a sulfhydryl reducing agent (Dithiothreitol), but by the denaturing treatment of an SDS-PAGE analysis. On the other hand, PVY HC-Pro generates two different electrophoretic banding patterns in SDS-PAGE. One of them is produced when the HC-Pro is exposed to an extract from a healthy tobacco plant, in the absence of sulfhydryl reducing agents.

Finally, the transmission by aphids of virus, in presence of purified HC-Pro treated with chemical agents has been studied in membrane and sequential assays. The presence of 2-Merchптоethanol or of some metal chelating agents did no abolish transmission. On the contrary, transmission was abolished by ionic detergents.

## RESUMEN

La transmisibilidad por áfidos de cuatro aislados del virus Y de la patata (potato virus Y, PVY), aislados PVY-0, PVY-0 NAT, PVY-1 y PVY-N, ha sido estudiada en experimentos de transmisión de planta a planta. Los aislados PVY-0 y PVY-N resultaron transmisibles, mientras que los aislados PVY-0 NAT y PVY-1 no se transmitieron. Mediante ensayos de transmisión por adquisiciones a través de membranas y secuenciales se ha comprobado que la falta de transmisibilidad viral se debe, en los dos aislados, a un defecto en el componente "helper" (HC-Pro). Sin embargo, mientras que el HC-Pro del aislado PVY-0 NAT pudo ser purificado, el del aislado PVY-1 no lo pudo ser, en las mismas condiciones, con el procedimiento empleado. Para determinar si la causa de no poder purificarlo radicaba en la ausencia o en niveles inadecuados de HC-Pro en planta, se estudió la distribución de esta proteína en planta infectada y su cinética de acumulación en hoja, para ambos mutantes no transmisibles y para el aislado transmisible PVY-0, demostrándose la presencia de HC-Pro en plantas infectadas con el aislado PVY-1. Además, el HC-Pro de este aislado mostró un comportamiento electroforético distinto al que presentaron los componentes "helper" de los otros tres aislados de PVY analizados.

El análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican el componente "helper" del aislado transmisible PVY-0, y de los aislados no transmisibles PVY-0 NAT y PVY-1 muestra que una única sustitución aminoacídica diferencia a los componentes "helper" de los aislados PVY-0 NAT y PVY-0, lo que sugiere que esta sustitución es la causa de la falta de transmisibilidad del primero. Este cambio está localizado dentro de un agrupamiento de cisteínas muy conservado de la región amino de la proteína, en la misma posición que las sustituciones que se cree causan la falta de transmisibilidad por áfidos de dos potyvirus: El virus C de la patata, PVC, y el aislado E15-PAT del virus del mosaico amarillo del calabacín, ZYMV. Sin embargo, el tipo de sustitución difiere (K→E para PVC y ZYMV E15-PAT, K→N para PVY-0 NAT). Por otro lado, el HC-Pro del aislado PVY-1

presentó dos sustituciones aminoacídicas respecto del HC-Pro del aislado PVY-0, no observadas en ninguna de las secuencias de componente "helper" de potyvirus comparadas. Una de estas sustituciones (G→D) afecta a una posición altamente conservada y también situada dentro del mencionado agrupamiento de cisteínas, mientras que la otra (S→V) lo está en la región carboxilo, en una posición más variable. Esto sugiere que dichas alteraciones podrían causar perturbaciones importantes en alguna actividad biológica de la proteína, y en su funcionalidad en el proceso de transmisión.

Se han producido diez anticuerpos monoclonales (HC-Mabs) y un suero policlonal (HC-Pab) contra componente "helper" purificado de plantas infectadas con PVY. Los sobrenadantes de los cultivos de hibridomas productores de estos Mabs reaccionaron con el HC-Pro de PVY en dos tipos diferentes de ELISA. Siete de ellos, junto con el HC-Pab, fueron aptos para análisis por western blot. Los líquidos ascíticos de seis líneas de Mabs, junto con el HC-Pab, se compararon en ELISA indirecto usando 22 aislados de PVY, el virus A de la patata (PVA), el virus del grabado del tabaco (TEV), el virus del moteado suave del pimiento (PepMoV) y el virus de la sharka (PPV). Ninguno de los Mabs ni el Pab reaccionaron con PVA, PPV o TEV. La inmunoreactividad de uno de los HC-Mabs fué similar a la del HC-Pab, reaccionando con todos los 22 aislados de PVY analizados y con PepMoV. Otro HC-Mab reaccionó con todos los aislados del grupo PVY<sup>o</sup> y con un aislado PVY<sup>c</sup>, pero no con aislados del grupo N (PVY<sup>N</sup>). Los otros HC-Mabs pudieron ser usados para identificar subgrupos dentro de los grupos PVY<sup>o</sup> y PVY<sup>N</sup>. Estos monoclonales suministran un método alternativo para la clasificación de aislados de PVY, y pueden ser útiles en estudios taxonómicos.

El análisis por ELISA Indirecto de extractos de hojas distintas dentro de una misma planta mostró que las hojas inferiores fueron las que ofrecieron lecturas óptimas, en concordancia con la acumulación de proteína HC-Pro que se aprecia en análisis por inmunoelectrotransferencia. Se comprobó asimismo la funcionalidad de dos de los HC-Mabs en ELISA DAS. No se apreció una contribución de HC-Pro insoluble en forma de inclusiones celulares a las lecturas obtenidas en ELISA, tanto Indirecto como

DAS.

Preparaciones de componente "helper" (HC-Pro) purificado de PVY, extractos de planta infectada con virus y eluidos de cromatografía por FPLC de ambos tipos de muestras se analizaron mediante inmunoelectrotransferencia ("Western blot"), con ayuda de anticuerpos específicos de esta proteína. En FPLC, la proteína HC-Pro eluyó mayoritariamente a tiempos correspondientes a un peso molecular de alrededor de 200 KDa, sugiriendo la existencia de agregados de HC-Pro de la forma monomérica (unos 50 KDa) bien formando tetrámeros, bien con otro factor. La estabilidad de esta agregación no se vería afectada por la presencia de un agente reductor de grupos sulfidrilo (ditiotreitól), pero sí por el tratamiento desnaturizante que conlleva un análisis por SDS-PAGE. Por otro lado, el HC-Pro genera dos patrones diferentes de bandas en SDS-PAGE. Uno de ellos es inducido por la exposición de la proteína a extractos de tabaco sano, en ausencia de agentes reductores de grupos sulfidrilo.

Finalmente, se ha estudiado la transmisión de virus por áfidos en adquisiciones a través de membranas o secuenciales, en presencia de componente "helper" purificado, tratado con agentes químicos. La presencia de 2-Mercaptoetanol o de algunos agentes quelantes de metales no anuló la transmisión viral, en las condiciones experimentales. Por el contrario, la transmisión se anuló en presencia de detergentes iónicos.

## ABREVIATURAS

AT: Transmisible por áfidos

bp: Pares de bases

BSA: Albúmina de suero bovino

CI: Inclusiones cilíndricas

CP: Proteína de la cápsida viral

CP Mab: Anticuerpo monoclonal contra la proteína de la cápsida viral

CTAB: Bromuro de cetiltrimetilamonio

DEAE: Dietilaminoetil

DIECA: Dietilditiocarbamato

DNA: Acido desoxirribonucleico

cDNA: DNA complementario

dNTP: 5' Trifosfato de desoxinucleósido

DTT: Ditioneitol

EDTA: Acido etilendiaminotetracético

EGTA: Etilenglicol-bis(B-aminoetileter) N,N,N',N'-tetracético

ELISA: Ensayo inmunoenzimático (Enzyme linked immunosorbent assay)

ELISA DAS: ELISA doble sandwich de anticuerpos

ELISA DASI: ELISA doble sandwich de anticuerpos indirecto

ELISA Indirecto: ELISA con tapizado de placa por el antígeno

GUS:  $\beta$ -Glucuronidasa

HC-Pro: Componente ayudante o "helper"

HC Mab: Anticuerpo monoclonal contra el componente "helper"

HC Pab: Anticuerpo policlonal contra el componente "helper"

IP: Intraperitoneal

kDa: kilodalton

Mab: Anticuerpo monoclonal

ME (2-ME): 2(β)-Mercaptoetanol

min: Minuto

ml: Mililitro

MW: Peso molecular

NAT: No transmisible por áfidos

NI: Inclusión nuclear, formada por dos proteínas virales: NIa y NIb

nt: Nucleótido

OD: Densidad óptica

oligo-dT: Acido oligodesoxitimídico

ON: A lo largo de la noche

OPD: O-fenilen-diamino

P1, P3: Proteínas potyvirales 1 y 3 respectivamente

Pab: Anticuerpo policlonal

PAT: Pobremente transmisible por áfidos

PBS: 0.15M NaCl, 0.015M fosfato sódico (pH 7.4)

PBST: PBS con Tween 20 al 0.05% (v/v)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PEG: Polietilenglicol

PMSF: Fenilmetilsulfonilo fluoruro

poliA: Acido poliadenílico

p/v: Peso/volumen

PVP: Polivinilpirrolidona

RNA: Acido ribonucleico

rpm: Revoluciones por minuto

RT: Transcripción reversa

Rubisco: Carboxilasa del difosfato de ribulosa

SDS: Dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de acrilamida en presencia de SDS

sgs: Segundos

SN: Sobrenadante

Tris: Trihidroximetilaminoetano

TSM: Tampón 0.1M Tris-sulfúrico, 0.02M sulfato magnésico

U: Unidad

Vpg: Proteína covalentemente unida al genoma viral

v/v: Volumen/volumen

#### **Abreviaturas de virus:**

PepMoV: Virus del moteado del pimiento (pepper mottle virus)

PPV: Virus de la sharka (plum pox virus)

PVA: Virus A de la patata (potato virus A)

PVC: Virus C de la patata (potato virus C)

PVY: Virus Y de la patata (potato virus Y)

Cepas: PVY<sup>o</sup>, cepa común. PVY<sup>N</sup>, Cepa necrótica de venas. PVY<sup>c</sup>, cepa de las estrías punteadas.

Clasificación de patotipos de Gebre-Selassie et al., (1985): PVY-0, PVY-1, PVY-1,2.

SMV: Virus del mosaico de la soja

TEV: Virus del grabado del tabaco (tobacco etch virus)

TVMV: Virus del moteado de las venas del tabaco (tobacco vein mottling virus)

TuMV: Virus del mosaico del nabo (turnip mosaic virus)

ZYMV: Virus del mosaico amarillo del calabacín (zucchini yellow mosaic virus)

## **AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis no habría sido posible sin la ayuda de muchas personas, a las que quisiera dar las gracias públicamente. Algunas de estas personas son:

El Dr. Dionisio López Abella, director de esta tesis, al que le agradezco su constante dedicación a lo largo de estos años.

La Dra. M<sup>ª</sup> Teresa Serra Yoldi, a la que agradezco su ayuda práctica en casi todos los aspectos de este trabajo y su apoyo para que la tesis llegara a buen fin.

La Dra. Blanca Cifuentes Cuencas, tutora de esta tesis, a la que agradezco su apoyo e interés.

Mi compañero el Dr. Juan José López Moya, que me inició en los métodos de la investigación, y al que debo muchos de mis conocimientos actuales. También quiero agradecer su ayuda a mi otro compañero de laboratorio, Jaime Cubero.

El Dr. Peter John Ellis y a su ayudante Gerda Bowler, de la Estación Agrícola de Investigación de Vancouver, que pusieron a mi disposición su laboratorio, conocimientos y trabajo para la fabricación de anticuerpos monoclonales contra la proteína "helper" de PVY.

El Dr. Jose Ramón Díaz Ruíz, que me ha ayudado a interpretar y discutir los resultados, y las Doctoras Isabel García Luque y Carmen Castresana, que me han ayudado en los aspectos moleculares de esta tesis.

Mis compañeros de becas y contratos, por orden de pasillo: Dra. Carmen Ferreiro, Patricia Obregón,

Juan Ignacio Moreno, Dra. Elena Alonso, Francisco Tenllado, Dr. Leandro Peña, Yumana Trad, Jose María Tostado, Mari Angeles Cerezuela, Carmen Vaquero, Ana Isabel Sanz, Dr. Alfredo Berzal y Dr. Guy Vancanneyt. Todos ellos han puesto a mi disposición sus conocimientos.

El personal de la Unidad de Biología de Plantas. Sin orden alguno, Sacramento Peñalver, Adela Martín de Saavedra, Maria Teresa Lafita, Montserrat Llorente, Emilia Liébana y Ascensión González.

A mi amigo el fotógrafo Pedro Martínez Mahamud, gracias por sus reproducciones.

El Dr. Jose Luís García y M<sup>a</sup> Auxiliadora Prieto, que me ayudaron en la puesta a punto de la FPLC, y el Dr. Luís Rivas.

Finalmente agradecer el apoyo estructural del Centro de Investigaciones Biológicas, particularmente el del Departamento de Biología de Plantas, y la financiación que me ha proporcionado el Ministerio de Educación y Ciencia durante los años de realización de esta tesis.

## **I- CAPITULO PRIMERO**

### **Introducción general**

## I.1- LOS POTYVIRUS

Desde un punto de vista histórico, los potyvirus fueron uno de los seis grupos de virus de plantas inicialmente reconocidos por Brandes y Wetter, en 1959, basándose en propiedades morfológicas de las partículas virales. Desde entonces, el número de sus miembros, así como el conocimiento de sus propiedades características, no ha cesado de aumentar (Brunt, 1992). Actualmente, tras la aceptación por el ICTV (Comité Internacional de Taxonomía de Virus) de un nuevo criterio taxonómico de clasificación, los potyvirus típicos se han constituido en el género *Potyvirus*, agrupado dentro de la familia *Potyviridae* (IX Congreso Internacional de Virología, Glasgow, 1993; Ward, 1993). Hoy en día, los potyvirus son el grupo de virus de plantas más numeroso, un 30% del total, con unos 180 miembros descritos y en continuo incremento. Asimismo son un género responsable de graves pérdidas económicas en cultivos de interés agrícola (Ward y Shukla, 1991).

Durante estos últimos años, el conocimiento que se ha adquirido sobre la organización y expresión genética de estos virus (Riechmann et al., 1992) ha complementado los datos previos sobre las propiedades físico-químicas de la partícula viral y sobre sintomatología inducida a nivel celular y de planta (Matthews REF, 1982). Esto ha permitido relacionar a virus que compartían algunas de estas características, pero no todas, con los potyvirus típicos, agrupándolos en cuatro géneros dentro de la familia *Potyviridae*: *Potyvirus*, *Rymovirus*, *Bymovirus* e *Ipomovirus*, este último aún no definitivo (Ward, 1993).

Una característica citopatológica común a todos los miembros de la familia es la formación de inclusiones cilíndricas "pinwheels" en el citoplasma de las células de la planta infectada. Estas inclusiones, de naturaleza proteica, presentan una estructura tridimensional que recuerda el aspecto de un molinillo con aspas (Rubio-Huertos y López-Abella, 1966; Edwarson, 1966). La diferente morfología de estas inclusiones, que varía según los virus, ha constituido un criterio taxonómico

importante para su clasificación y agrupamiento (Edwarson, 1974a; Fenner, 1976; Edwarson, 1992). Por otro lado, en algunos de estos virus se ha descrito la inducción de cuerpos de inclusión de tipo amorfo en el citoplasma celular (Edwarson, 1974a; De Mejía et al., 1985a; Baunoch et al., 1990) o de tipo cristalino en el núcleo (Christie y Edwarson, 1978; Rubio-Huertos, 1978).

### **I.1.1- Características de la partícula viral. Estructura del genoma, expresión y replicación.**

Los potyvirus tienen partículas de aspecto filamentoso y flexuoso, de unos 700-900 nm de largo por 11-15 nm de ancho. En algunos de sus miembros, la longitud y flexuosidad de la partícula viral se ve afectada por la presencia de metales divalentes, particularmente magnesio (Govier y Woods, 1971). El virus está constituido por un RNA de sentido positivo de unos 9.000 nucleótidos, rodeado helicoidalmente por unas 2.000 copias de la proteína de la cápsida viral (CP), y con una proteína VPg unida covalentemente a su extremo 5' y una cola poli A en el extremo 3' (Hari, 1981; Riechmann et al., 1989). Este RNA codifica una única poliproteína viral de más de 330 kDa, en una única fase de lectura abierta, flanqueada por regiones no codificantes en los extremos 5' y 3', de unos 200 nts cada una. La poliproteína se procesa proteolíticamente para generar los productos proteicos finales. Al menos tres proteínas virales con actividad proteasa están involucradas en este procesamiento: Proteínas P1, HC-Pro y NIa (Verchot et al., 1992; Carrington et al., 1989a; Carrington y Dougherty, 1987, respectivamente), que se realiza co y postraduccionalmente. La **Fig. 1** muestra esquemáticamente los puntos de procesamiento, la actividad proteasa responsable, y los productos teóricos obtenidos.

Con respecto a su organización genética, el análisis de la región no codificante del extremo 5' del RNA viral muestra la presencia de un motivo conservado de 12 nucleótidos (TCAACACAACAT), presente en todos los miembros de la familia secuenciados hasta la fecha, que podría jugar un papel en la encapsidación o en la traducción del RNA viral (Lafn, 1989a; Atreya, 1992).

La región no codificante del extremo 3' es, toda ella, muy variable entre los distintos potyvirus, tanto en secuencia como en longitud. La homología es elevada solamente entre aislados de un mismo virus (Atreya, 1992b).

Los productos proteicos que se obtienen del procesamiento de la poliproteína viral son los siguientes, comenzando por su extremo amino:

La proteína P1 potyviral, de 28-34 kDa. En base a una cierta homología de secuencia entre la proteína de movimiento del virus del mosaico del tabaco (tobacco mosaic virus, TMV), un tobamovirus, y la región carboxilo de la P1 del virus del moteado de las venas del tabaco (Tobacco vein mottling virus, TVMV), un potyvirus, se propuso para esta proteína una función en la difusión célula a célula del material genético viral (Domier et al., 1987). Sin embargo, esta homología no es extensiva a otros potyvirus. Además, se ha demostrado que dicha región carboxilo presenta una actividad serín proteasa que separa autocatalíticamente a la proteína P1 del extremo amino de la proteína siguiente, por lo que su intervención en la difusión célula a célula de la infección está cuestionada (Verchot et al., 1991). Esta actividad proteolítica se observa en la síntesis de poliproteína viral en planta transgénica y en extractos de germen de trigo, pero no en lisados de reticulocito de conejo. Esto sugiere que, para su actividad, tal vez sea necesaria la presencia de un cofactor de planta, inactivable por calor (Verchot et al., 1992; Mavankal y Rhoads, 1992). No es capaz de actuar en trans, al menos *in vitro* (Verchot et al., 1992). Su presencia en planta infectada ha sido confirmada serológicamente, asociada a fracciones ricas en membranas celulares (Rodríguez-Cerezo y Shaw, 1991).

La proteína factor de transmisión, de adquisición o componente "helper" (HC-Pro), de 48-58 kDa de peso aparente. Esta proteína está involucrada en el proceso de transmisión de potyvirus por áfidos. La proteína presenta un dominio con actividad tiol proteasa en la región carboxilo, que procesa dicho extremo con gran eficiencia, aparentemente de forma cotraduccional. Al igual que la P1, parece

funcionar de forma exclusivamente autocatalítica, sin actividad en trans (Carrington et al., 1989a,b; Oh y Carrington, 1989).

Se han apreciado homologías de secuencia entre la proteína HC-Pro y la proteína P18 de los Caulimovirus, que interviene en la transmisión por áfidos de este virus (Domier et al., 1987). Se ha relacionado a la proteína HC-Pro con las inclusiones amorfas inducidas en el citoplasma celular por algunos potyvirus (De Mejía et al., 1985b; Baunoch et al., 1990)

Proteína P3, de 38-42 kDa, y péptido 6K<sub>1</sub>, de 6 kDa. Su presencia ha sido detectada en planta (Rodríguez-Cerezo y Shaw, 1991), como lo ha sido la de la proteína resultante del no procesamiento del punto de unión P3-Péptido 6K<sub>1</sub>. Mediante inmunomarcado con oro en cortes ultrafinos, se ha observado que la P3 se localiza mayoritariamente asociada a las inclusiones cilíndricas producidas por la proteína de este nombre (CI), a la que se ha relacionado con la replicación viral. En base a esto se ha sugerido que la P3 juega un papel en la replicación (Rodríguez-Cerezo et al., 1993). El péptido 6K<sub>1</sub> no se ha detectado aún en planta, aunque podría asimismo estar relacionado con la replicación viral (Riechmann et al., 1992).

Proteína de las inclusiones cilíndricas (CI), de 70 kDa. Esta proteína forma las inclusiones citoplasmáticas características de todos los miembros de la Familia *Potyviridae*. En estados tempranos de infección, se han localizado estas inclusiones asociadas a membrana plasmática, concretamente a plasmodesmos, lo que llevó en su momento a sugerir su intervención en la propagación de la infección célula a célula (Lawson y Hearon, 1971). Se ha observado una similitud de secuencias con proteínas helicasas (Gorbalenya et al., 1989). "In vitro" presenta actividad ATPasa y helicasa, por lo que se le ha implicado en la replicación viral (Lafn et al., 1989b,c y 1991).

Péptido 6K<sub>2</sub>, de 6 kDa, que junto con otras tres poliproteínas que lo contienen ha sido detectado en

planta infectada. Mediante técnicas de inmunomarcado y de fraccionamiento celular, se le ha encontrado asociada a fracciones membranosas, especialmente nucleares. Se ha sugerido que podría jugar un papel de anclaje del complejo replicativo viral a la membrana, como ocurre en los picomavirus (Restrepo et al., 1994).

Proteína "a" de las inclusiones nucleares (NIa), de 49-52 kDa. Presenta una actividad proteasa de tipo serina en su región carboxilo, aunque con un residuo cisteína en lugar de serina en su centro activo (o una actividad tiol proteasa con estructura serín proteasa). Esta actividad procesa todos los puntos de corte de la poliproteína con excepción de los dos procesados por las proteínas P1 y HC-Pro. El punto de corte es un heptapéptido de secuencia específica para cada potyvirus. Actúa tanto en cis como en trans (Carrington y Dougherty, 1987), con una gran eficiencia (García et al., 1989). Mediante métodos de fusión con el gen GUS, la proteína NIa ha sido localizada mayoritariamente en el núcleo celular, ya desde los primeros estadios de infección. Se supone que esta proteína posee en su extremo amino un péptido señal que permite su exportación al núcleo desde el citoplasma. De hecho, presenta en dicha región un agrupamiento de aminoácidos básicos que podría desempeñar esa función (Restrepo et al., 1990, 1992). En algunos potyvirus puede formar, junto con la proteína NIb (ver más adelante), inclusiones nucleares de tipo paracrystalino.

La región amino de la proteína NIa es la proteína VPg que se une por una tirosina al extremo 5' del ARN viral, a través de un enlace fosfodiéster, y que forma parte de la partícula viral (Shahabuddin et al., 1988; Murphy et al., 1990b). Se localiza en el citoplasma de la célula vegetal. El corte que separa la VPg de la región carboxilo de la proteína NIa es realizado en trans por la actividad serín proteasa de dicha NIa, aunque con baja eficiencia (Dougherty y Parks, 1991; Carrington et al., 1993). Se ha sugerido que esta proteína VPg podría estar relacionada con el inicio de la replicación viral, pudiendo además desempeñar una función de protección y estabilización del RNA frente a nucleasas de la planta (Riechmann et al., 1992). Por otro lado, se ha detectado proteína NIa citoplasmática covalentemente

unida al RNA viral, en lugar de la VPg (Murphy et al., 1990a). Esto indicaría que la proteína NIa es capaz de realizar la función de la VPg en la replicación. El hecho de que tanto la VPg como la NIa completa no sean transportadas al núcleo cuando están covalentemente unidas al RNA viral indicaría que esta interacción bloquea dicho transporte (Carrington et al., 1993).

Proteína "b" de las inclusiones nucleares (NIb), de 56-58 kDa. En base a homologías de secuencia con otras polimerasas de virus de RNA positivo, se ha propuesto para esta proteína la función de polimerasa viral (Kamer y Argos, 1984; Allison et al., 1986; Domier et al., 1987). Al igual que la NIa, se localiza principalmente en el núcleo celular, al que es transportada desde el citoplasma. En algunos potyvirus forma con la NIa inclusiones nucleares paracristalinas.

Proteína de la cápsida (CP), de 30-37 kDa. Su función principal es la de encapsidar el RNA viral. También se conoce su intervención en el proceso de transmisión de virus por áfidos.

El procesamiento teórico de la poliproteína viral daría lugar a cantidades equimoleculares de cada una de las proteínas potyvirales, con excepción de aquellas que son resultado de un procesamiento parcial de las principales (péptidos 6K<sub>1</sub> y VPg). Dado que un virus necesita unas 2000 copias de la CP, pero posiblemente no la misma cantidad de proteína de movimiento o de replicasa, una falta de regulación diferencial de la síntesis de cada producto proteico llevaría a una acumulación de algunos de ellos muy por encima de su necesidad funcional en el ciclo viral. De hecho, los Potyvirus inducen la formación en la célula de varios tipos de cuerpos de inclusión. Estas inclusiones están compartimentalizadas: Algunas son específicamente citoplasmáticas, otras nucleares (Lesemann, 1988), y podrían representar agregados no funcionales de proteína sobrante.

Hasta la fecha no se conoce la existencia de mecanismos reguladores que *in vivo* induzcan una producción diferencial de cada proteína viral. Algunos estudios que analizan la distribución en planta

infectada de distintas proteínas virales (CP, CI y HC-Pro), aprecian variaciones importantes en sus proporciones relativas, en función de la edad de la hoja y de su estado de infección (Suzuki et al., 1989). Otros experimentos de acumulación *in vivo* de proteínas no estructurales y de la cápsida apoyan más bien una producción equimolecular de las proteínas virales (Restrepo et al., 1990; Baunoch et al., 1991).

Por otro lado, los resultados sugieren que durante la replicación del virus se sintetizan cadenas de RNA complementario al viral que actuarían de molde en la síntesis de RNA positivo (Riechmann et al., 1992; Aramburu et al., 1992).

Desde un punto filogenético, los potyvirus presentan similitudes en su organización y expresión genética con otros virus de plantas, como son los como- y nepovirus, y con los picornavirus animales: Un RNA positivo con una proteína VPg en el extremo 5' y una cola poli A en el 3', que codifica una proteína que se procesa proteolíticamente para generar los productos finales. El orden de los productos génicos relacionados con la replicación del RNA viral (CI, NIa y NIb) está bastante conservado, llevando a Goldbach en 1986 a agrupar a los virus mencionados en el supergrupo de virus tipo picorna. Sin embargo, esta similitud es parcial (Goldbach, 1987). Así, la morfología de la partícula viral, flexuosa y cilíndrica, es similar a la de los potex-, carla- y closterovirus, mostrando la CP potyviral cierta homología de secuencia con las CPs de potex- y carlavirus (Lafn, 1990). Tampoco la posición de la CP potyviral en el extremo carboxilo de la poliproteína se corresponde con lo que se observa en los picornavirus. Por otro lado, de las tres proteínas no estructurales correspondientes al extremo 5' del RNA potyviral, la primera podría estar relacionada con la proteína de movimiento de tobamovirus, como ya se ha comentado anteriormente.

Estos datos han apoyado la idea de que los potyvirus son producto de una evolución modular, resultado de una combinación exitosa de regiones genéticas que codifican para funcionalidades

determinadas (por ejemplo movimiento-transmisión-replicación-encapsidación) con distinto origen evolutivo (Zimmern, 1987; Goldbach, 1987; Lafn, 1990; Riechmann, 1992; Ward, 1993). Este fenómeno se podría producir mediante recombinación no homóloga, originada por un cambio de molde de lectura durante la replicación. Fenómeno que se ha propuesto como explicación a la observación de que un gen previamente insertado en el genoma de un potyvirus se delecciona espontáneamente (Dolja et al., 1993).

## **1.2- DISEMINACION DE LOS POTYVIRUS EN LA NATURALEZA**

Los virus del género Potyvirus se transmiten por áfidos, aunque la transmisibilidad de algunos miembros del género no ha sido estudiada. En general, cada virus puede ser transmitido por numerosas especies de áfidos, aunque hay excepciones (Karl et al., 1992). Sus parientes los Rymo, Bymo, e Ipomovirus son transmitidos por ácaros, hongos y aleuródidos (mosca blanca) respectivamente.

Los áfidos son el grupo más importante de insectos vectores de virus de plantas (Harris, 1991). De los varios miles de especies conocidas, algunas de los géneros Aphis, Myzus y Macrosiphum son responsables de la difusión de la mayor parte de los potyvirus que causan daños en cultivos (Eastop, 1977). Estas especies son gregarias y forman colonias en las plantas infectadas. Su ciclo de vida anual comienza en la primavera. De huevos depositados antes del invierno nace una hembra fundatrix, de la que van a originarse sucesivas generaciones de hembras por partenogénesis, que van a pasar a lo largo de su vida por varios estadios de desarrollo. También aparecen hembras aladas capaces de volar, especialmente si las condiciones de supervivencia se deterioran. Al final del ciclo anual se desarrollan individuos aptos para la reproducción sexual, que producirán huevos a partir de los cuales se iniciará el siguiente ciclo (Dixon, 1985). Si las condiciones ambientales lo permiten, el ciclo partenogenético no se interrumpe en invierno, lo que es el caso en la mayor parte de nuestro país, teniendo esto implicaciones importantes en la dinámica de las epidemias virales.

Los áfidos se alimentan de la savia de las plantas sobre las que viven. Para ello están dotados de un aparato chupador muy especializado compuesto de labro, labium y estilete. El estilete, formado por dos mandíbulas y dos maxilas, es muy flexible y presenta un canal salivar y otro alimenticio (Forbes, 1977). En las inserciones del estilete en la planta, el áfido secreta continuamente saliva de modo que el estilete avanza envuelto en una vaina gelosa de saliva. Los áfidos realizan dos tipos de inserciones en la planta: Unas inserciones breves intracelulares llamadas de prueba, que afectan a las células epidérmicas, y unas inserciones largas, en las que el estilete busca el floema. Una vez alcanzado, el áfido permanece alimentándose en el mismo punto durante largo tiempo (López-Abella et al., 1988).

### **I.2.1- Tipos de transmisión por áfidos. El concepto de no persistencia**

Los potyvirus son transmitidos por áfidos de modo no persistente. Esto significa que el áfido es capaz de adquirir el virus en una inserción breve de segundos a minutos de duración, manteniendo la capacidad de transmitirlo por un tiempo también breve, de minutos a pocas horas, y pudiendo inocularlo inmediatamente tras la adquisición.

El concepto de no persistencia se ha ido elaborando históricamente en un intento de clasificar los distintos tipos de transmisión de virus vegetales por sus vectores. Watson y Roberts en 1939, clasificaron a los virus como no persistentes (el vector mantiene la capacidad de transmitir el virus unas horas tras la adquisición de éste) y persistentes (el vector mantiene la capacidad de transmisión largo tiempo, de semanas a de por vida). En 1956, Sylvester introdujo el concepto de semipersistencia para denominar aquellos casos en los que la capacidad del vector de transmitir el virus se mantiene un tiempo intermedio de días.

La clasificación propuesta por Harris en 1991, distingue entre virus *circulativos*, que atraviesan las barreras del canal digestivo del vector, encontrándose en la hemolinfa y en glándulas del mismo, y

virus *no circulativos*, que no salen del canal alimenticio del vector. Si el virus circulativo es capaz de multiplicarse en el vector es, además, propagativo.

Los virus *circulativos* se transmiten de modo *persistente*. Los virus *no circulativos* pueden transmitirse de manera *no persistente* o *semipersistente*. En esta última, el vector puede mantener la capacidad de transmitir el virus de horas a varios días, y la eficiencia de la transmisión se incrementa con el tiempo de alimentación del vector en la planta infectada y con el tiempo de inoculación en la planta receptora, lo que indica que el floema, más que las células epidérmicas, está relacionado con la infección viral. Algunos virus presentan dos máximos de transmisión a lo largo del tiempo en que el vector permanece virulífero. Se ha denominado a este fenómeno transmisión *bimodal*.

La transmisión no persistente por áfidos representa un desafío a las estrategias de prevención y control de enfermedades virales en cultivos de importancia económica. Su modo de alimentación con inserciones cortas, de pocos segundos, y su capacidad de inocular el virus a plantas sanas también mediante inserciones cortas, hace que el uso de insecticidas, de repelentes y de otros controles químicos pueda, no sólo no evitar la difusión de la infección, sino aumentarla, al favorecer un mayor desplazamiento planta a planta de los áfidos (Webbs y Linda, 1993; Marco, 1993). Por otro lado, a pesar del concepto de no persistencia, se conocen casos de áfidos que mantienen la capacidad de transmitir un potyvirus varios días, lo que aumenta las posibilidades de difusión de un virus a larga distancia mediante estos vectores (Zeyen y Berger, 1990).

### **1.2.2- El componente ayudante o "helper" (HC-Pro) en la transmisión de los potyvirus por áfidos**

El concepto de factor de transmisión, componente ayudante o "helper" se remonta a los estudios con aislados del virus del mosaico aucuba de la patata (PAMV), un potexvirus. Este virus era transmitido por áfidos sólo a partir de plantas infectadas simultáneamente con el virus A de la patata (PVA),

o con el virus Y de la patata (PVY), ambos potyvirus. La infección con el segundo virus era el factor ayudante necesario en la transmisión del PAMV (Kassanis, 1961). En 1971, Kassanis y Govier establecieron el concepto de componente "helper" al demostrar que el virus C de la patata (PVC, un aislado no transmisible de PVY), podía ser transmitido por áfidos si éstos se alimentaban secuencialmente, primero en una planta infectada con PVY y después en una planta infectada con PVC.

En 1964, Pirone desarrolló una técnica en la que los áfidos se alimentaban de soluciones azucaradas mediante inserciones a través de membranas artificiales de parafilm tensadas (Fig. 2). Con este sistema, áfidos alimentados con PVY purificado no eran capaces de transmitir el virus, aunque sí lo eran cuando se alimentaban de plantas infectadas con PVY (Pirone y Megahed, 1966). Posteriormente se observó que si se suplementaba PVY purificado con extracto de planta infectada, libre de virus, entonces los áfidos sí eran capaces de transmitirlo (Govier y Kassanis, 1974a; Govier et al., 1974b). De este modo se determinó que, para su transmisión, los potyvirus necesitan de un componente "helper" distinto de la propia partícula viral, que aparece en la planta como consecuencia de la infección viral.

La purificación parcial de componente "helper" de PVY a partir de extractos de planta permitió determinar su naturaleza proteica, ya que la actividad "helper" de estas preparaciones desaparecía tras su incubación con proteasas, pero no con ribonucleasas (Govier et al., 1977). Posteriormente Thornbury y Pirone (1983), determinaron que los componentes "helper" (HC-Pro) inducidos en planta por la infección de dos Potyvirus (PVY y TVMV) eran serológicamente distintos. Esto sugería que se trataba de una proteína viral, y no de una proteína de planta inducida por la infección. Este origen viral fué confirmado por la identificación serológica de un producto de la traducción "in vitro" de RNA potyviral (Hellmann et al., 1983). La proteína HC-Pro ha sido purificada hasta la homogeneidad mediante cromatografía de afinidad por Thornbury et al.,(1985).

Recientemente, el HC-Pro ha sido expresado en bacteria y en baculovirus, pero no ha resultado funcional (Pirone, comunicación personal; Thornbury et al., 1993). En cambio, plantas transgénicas expresando las tres primeras proteínas del genoma potyviral sí han sido capaces de producir HC-Pro activo (Berger et al., 1989). Esto ha llevado a pensar en la posible implicación de factores de la planta en el correcto procesamiento y maduración de la forma biológicamente activa del HC-Pro o incluso en el propio proceso de transmisión (Thornbury et al., 1993).

Respecto de la estructura de la molécula biológicamente activa, se ha propuesto que se trata de un dímero de la proteína monomérica en base a los resultados obtenidos en el fraccionamiento de la actividad "helper" mediante HPLC de muestras purificadas (Thornbury et al., 1985). Se ha sugerido además que el componente "helper" activo podría estar glicosilado, y que a través de estos azúcares interaccionaría con receptores del áfido (Berger y Pirone, 1986). Se ha propuesto incluso un sitio putativo de glicosilación (Lafn, 1990). La glicosilación del HC-Pro requeriría un procesamiento postraduccional con transporte al lumen del retículo mediante una señal de transporte.

En realidad, no se conocen con certeza los extremos amino y carboxilo reales de la proteína HC-Pro activa, puesto que ésta ha sido refractaria a varios intentos de analizarla por degradación de EDMAN (Mavankal y Rhoads, 1991; T. Canto, observación personal). Sí puede ser analizado por degradación de EDMAN, en cambio, el producto que se obtiene traduciendo RNA potyviral en extractos de germen de trigo, como consecuencia de la actividad proteasa de la P1 (Mavankal y Rhoads, 1991). Producto que presenta un tamaño similar al del HC-Pro, que reacciona serológicamente con anticuerpos contra dicho HC-Pro, pero que no es funcional en la transmisión por áfidos de partículas virales. Esto sugiere que el HC-Pro sufre *in vivo* una maduración que no se produce *in vitro*.

La proteína HC-Pro presenta un dominio con actividad tiol proteasa en su extremo carboxilo. Esta actividad, además de intervenir en el procesamiento de la poliproteína viral podría estar implicada en

el mecanismo de transmisión (Shaw et al., 1990).

Por otro lado, los trabajos de análisis comparativo de la secuencia aminoacídica del HC-Pro de PVC (Thornbury et al., 1990), que no es funcional, junto con los resultados obtenidos mediante mutagénesis dirigida sobre los genes de los componentes "helper" de TVMV y del virus del grabado del tabaco (tobacco etch virus, TEV) indican que en la región amino de la proteína se encuentran aminoácidos esenciales para la transmisión, y sugieren que esa región, que contiene un agrupamiento de cisteínas muy conservado, podría representar un dominio funcional relacionado con la misma (Atreya et al., 1992a; Dolja et al., 1993; Atreya y Pirone, 1993).

Como apuntan Robaglia et al., (1989), este agrupamiento de cisteínas presenta una cierta similitud con los motivos de dedos de zinc ("Zinc finger") de factores que regulan la expresión de genes, y que también pueden intervenir en la dimerización de proteínas como formas biológicamente activas. De hecho, el HC-Pro podría ser capaz de unirse a ácidos nucleicos, pues ha sido purificado por adsorción a oligo-dT (Thornbury et al., 1985).

### **1.2.3- La partícula viral en la transmisión de los potyvirus por áfidos**

Se conoce desde hace tiempo la existencia de aislados de potyvirus que no son transmisibles por áfidos, aunque sean suplementados con HC-Pro funcionalmente activo, lo que llevó a sugerir que la proteína de la cápsida viral influye en la transmisibilidad del virus (Sako, 1980; Pirone y Thornbury, 1983). Los extremos amino y carboxilo de la CP se exponen en la superficie de la partícula viral (Dougherty et al., 1985; Shukla et al., 1988a). Estos extremos amino y carboxilo constituyen las regiones de secuencia más variable de la CP, frente a la zona central que está más conservada entre distintos potyvirus (Shukla et al., 1989). Así, en la CP se define un dominio central implicado en la interacción con el RNA viral y la encapsidación del mismo, y unos dominios variables que se

proyectan en el exterior de la partícula, característicos de cada virus. La eliminación por medios proteolíticos de estos extremos protuberantes altera la transmisibilidad e infectividad del virus (Salomon y Raccah, 1990; López-Moya, 1993).

Los trabajos de Atreya et al., (1990) y Atreya et al., (1991), han demostrado que una corta secuencia de tres aminoácidos (DAG) situada en el extremo amino de la CP es esencial para la transmisión, especialmente la glicina. El motivo se conserva en todos los potyvirus transmisibles por áfidos conocidos hasta la fecha (Harrison y Robinson, 1988).

La importancia del triplete DAG en la transmisión mediada por HC-Pro potyviral se pone de manifiesto en el hecho de que la presencia de este triplete en el extremo amino de la CP del PAMV sea la causa de su transmisibilidad por áfidos, pese a ser un potexvirus, grupo de virus que no son transmitidos naturalmente por estos insectos (Baulcombe et al., 1993).

Por otro lado, se ha observado que un potyvirus no transmisible a causa de una alteración en el triplete DAG, puede ser transmitido por áfidos cuando éstos se alimentan de plantas doblemente infectadas con este virus y con un potyvirus transmisible, o cuando el virus infecta plantas transgénicas que expresan la CP de un potyvirus transmisible. Esto es posiblemente debido, en ambos casos, a fenómenos de heteroencapsidación (Bourdín y Lecoq, 1991; Lecoq et al., 1993).

#### **I.2.4- Posibles formas de actuación del componente "helper"**

Se han propuesto varias hipótesis sobre la forma de actuación del componente "helper" en la transmisión de virus por áfidos: El HC-Pro interaccionaría a modo de puente, por un lado con la partícula viral, y por otro con receptores del tracto digestivo anterior del áfido, reteniendo al virus en esa zona (Govier y Kassanis, 1974b). El HC-Pro protegería al virus de la inactivación por factores

presentes en el tracto digestivo del áfido mientras permaneciera en el mismo (López-Abella et al., 1981). Finalmente, el HC-Pro permitiría la infección de la planta receptora, una vez el virus es liberado por el áfido en la misma (Pirone y Kassanis, 1975). Las tres hipótesis podrían a un tiempo ser correctas. A favor de las dos primeras está el hecho de que para que ocurra la transmisión, los áfidos deben tomar el HC-Pro previamente o en combinación con la partícula viral, nunca después (Govier y Kassanis, 1974a).

### **I.3- EL VIRUS Y DE LA PATATA (PVY)**

El virus Y de la patata (potato virus Y, PVY), es la especie tipo del género Potyvirus. Infecta a gran número de especies vegetales (más de 115 según Edwarson et al., 1974b), principalmente de la familia *Solanaceae*, afectando a cultivos de tanta importancia económica como la patata, el tomate, el tabaco o el pimiento. El virus tiene una distribución mundial y causa graves daños a estos cultivos, que afectan al rendimiento y calidad de las cosechas.

La sintomatología inducida por PVY en planta infectada es muy variable dependiendo del aislado viral y de la especie vegetal: mosaico, aclaramiento de venas, enanismo, manchas necróticas, marchitamiento y necrosis. A nivel citopatológico, además de las inclusiones cilíndricas típicas de todos los potyvirus, PVY parece inducir inclusiones amorfas citoplasmáticas que han sido serológicamente relacionadas con el componente "helper" (Baunoch et al., 1990).

Se han realizado dos intentos importantes de agrupamiento de aislados de PVY: Uno basado en síntomas inducidos en *N. tabacum* cvs. White Burley y Samsun NN, en *S. tuberosum* cv. Duke of York y en *Physalis floridana*, que distingue tres grupos principales: PVY<sup>o</sup>, cepa común; PVY<sup>N</sup>, cepa necrótica de venas en tabaco; y PVY<sup>c</sup>, cepa de las estrías punteadas (De Bokx y Huttinga, 1981). Otro agrupamiento, en patotipos, fué desarrollado por Gebre Selassie et al., en 1985, utilizando aislados de

PVY franceses de pimiento y patata. Distingue tres patotipos de virus en base a la resistencia de variedades indicadoras de pimiento (*C. annuum*) a ser infectados por los mismos. Así, el patotipo PVY-0 es capaz de infectar la variedad "Yolo Wonder", pero no las variedades "Yolo Y" ni "Florida VR-2". El patotipo PVY-1 infecta las variedades "Yolo Wonder" y "Yolo Y" pero no la variedad "Florida VR-2". Finalmente el patotipo PVY-1-2 infecta a las tres variedades de pimiento.

Desde un punto de vista serológico, se han elaborado anticuerpos monoclonales contra la CP viral que se han mostrado capaces de distinguir entre aislados de PVY (Gugerli y Frés, 1983; Rose y Hubbard, 1986; Sanz et al., 1990).

En 1989, Luis Arteaga, en un estudio sobre las virosis que afectan a cultivos de pimiento al aire libre en nuestro país, caracterizó varios aislados de PVY de acuerdo a la clasificación en patotipos de Gebre Selassie et al., (1985). La mayoría de los aislados se englobaron en el patotipo PVY-0, con la excepción de uno, que lo fué en el patotipo PVY-1. Tres de los aislados de PVY utilizados en la presente tesis doctoral tienen su origen en estas muestras de campo.

#### **I.4- OBJETIVOS**

La incidencia económica que tienen las infecciones por potyvirus en numerosos cultivos de interés agrícola, tanto protegidos como en campo abierto, justifica el estudio de la transmisión de forma no persistente de estos virus por áfidos. El objetivo último sería el desarrollo futuro de nuevos métodos de control basados en la interferencia con su modo de propagación en la naturaleza.

Para ello resulta fundamental avanzar en el conocimiento de la compleja interacción virus-vector-planta que conlleva la transmisión no persistente. El estudio de uno de los factores virales requeridos, el componente "helper", y el desciframiento de su papel en la transmisión contribuirá a alcanzar este

objetivo.

PVY es un virus que infecta solanáceas de fácil mantenimiento en el invernadero, como el tabaco, el tomate, el pimiento o la patata. Virus y componente "helper" pueden ser purificados (Moghal y Francki, 1976; Thornbury et al., 1985), a diferencia de lo que ocurre con otros potyvirus en los que la purificación de HC-Pro no ha sido lograda (Pirone y Thornbury, 1983; Ravelonandro et al., 1992). Finalmente, este virus ha sido utilizado en muchos estudios previos sobre la transmisión de los potyvirus. Todo esto, unido a la importancia económica del virus, hace de PVY un modelo idóneo para el estudio del mecanismo de transmisión de los potyvirus por áfidos, y es el motivo de su elección para el presente estudio.

## **I.5- FIGURAS**

**Fig. 1** Representación esquemática del RNA viral de los potyvirus y de los productos proteicos generados en el procesamiento de la poliproteína que codifica.

**Fig. 2** Técnica de alimentación de pulgones a través de membranas de parafilm.

Fig. 1

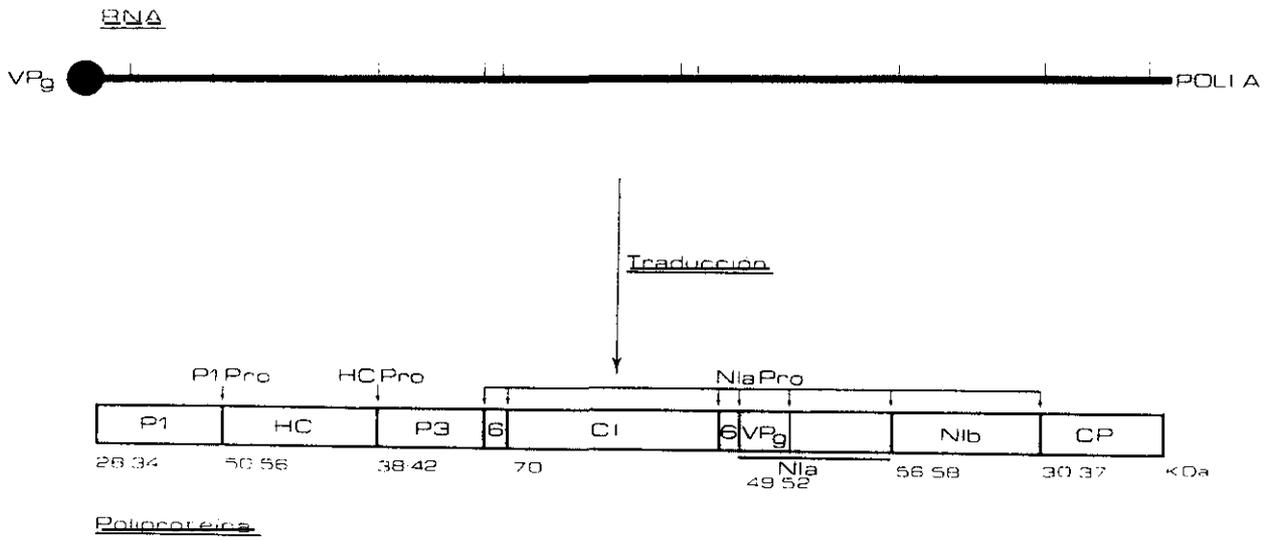
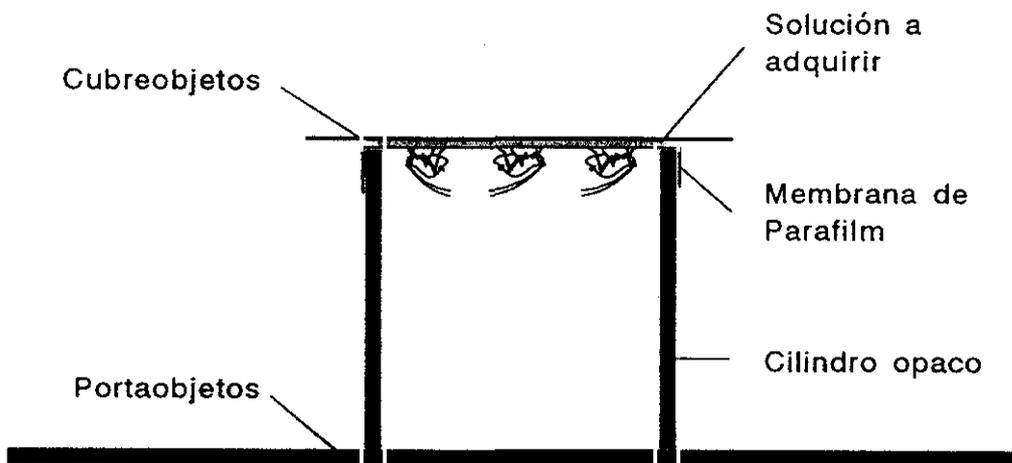


Fig. 2



## **II- CAPITULO SEGUNDO**

**Transmisión por áfidos de aislados del virus Y de la patata: Caracterización de dos aislados no transmisibles con deficiencias en sus componentes "helper"**

## II.1- INTRODUCCION

Los potyvirus son transmitidos en la naturaleza de modo no persistente por áfidos (Harris, 1991). Hasta la fecha se conocen dos proteínas virales implicadas en el proceso de transmisión: la proteína de la cápsida viral (CP), y una proteína no estructural, el componente "helper" (HC-Pro) (Pirone y Thornbury, 1983). Sin embargo, el papel que desempeña cada una de estas proteínas en el proceso de transmisión no ha sido todavía aclarado.

Actualmente se conocen tres potyvirus no transmisibles a causa de deficiencias en sus componentes "helper"; un aislado de PVY, el virus C de la patata (potato virus C, PVC) (Thornbury et al., 1990) y dos aislados del virus del mosaico amarillo del calabacín (Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV), aislados E15-PAT y R5A-PAT (Lecoq et al., 1991; Granier et al., 1993).

Por otro lado, alteraciones puntuales en un triplete de aminoácidos (DAG) de la región amino variable de la proteína de la cápsida, afectan a la transmisibilidad viral (Atreya et al., 1990). Se conocen varios potyvirus no transmisibles que presentan sustituciones aminoacídicas en este triplete: Entre otros, un aislado del virus del moteado de las venas del tabaco (tobacco vein mottling virus, TVMV-NAT), del virus del grabado del tabaco (tobacco etch virus, TEV-NAT), del virus del mosaico del nabo (turnip mosaic virus, TuMV 31), del virus de la sharka (plum pox virus, PPV-NAT), del virus del mosaico de la soja (soybean mosaic virus, SMV-N), y el aislado ZYMV-NAT, con secuencias DAE, DAS, DAN, DAL, DAD y DTG en lugar de DAG, respectivamente (Atreya et al., 1991).

Así, un potyvirus transmisible por áfidos puede dejar de serlo a causa de alteraciones en su CP, en su HC-Pro o en ambos a la vez, como podría ser el caso del aislado TuMoV 31 (Nakashima et al., 1993)

En este trabajo se caracteriza la transmisibilidad por áfidos de cuatro aislados de PVY. Se estudia la

falta de transmisibilidad de dos de estos aislados y si ésta es causada por alteraciones funcionales en sus proteínas de la cápsida o en sus componentes "helper".

## **II.2- MATERIALES Y METODOS**

### **II.2.1- Aislados virales y plantas hospedantes**

Los aislados PVY-0, PVY-0 NAT, PVY-1 y PVY-N fueron suministrados por el Dr. F. Ponz (CIT-INIA, Madrid). Estos aislados proceden de muestras de virus recogidas en cultivos españoles de pimiento por la Dra. Lúfs Arteaga, y clasificadas de acuerdo a Gebre Selassie et al., (1985), que han sufrido sucesivos pases en tabaco y pimiento (Soto et al., 1994). El aislado PVY-0 fué suministrado infectando tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi nc), mientras que el aislado PVY-0 NAT lo fué infectando pimiento (*Capsicum annuum* L. var. Yolo Wonder), con la consideración de que en ambos casos se trataba del mismo aislado viral. PVY-1, suministrado infectando tabaco (*N. tabacum* L. cv. Xanthi nc), fué filtrado por pimiento var. Yolo Y para obtener el aislado con el que se ha trabajado.

PVY-N es un aislado francés de secuencia conocida (Robaglia et al., 1989).

El aislado PVY-C31 fué suministrado por el Dr. G. Adams, del Biologische Bundesanstalt, Braunschweig, Alemania.

Para la propagación de los virus, se utilizaron plantas de tabaco (*N. tabacum* L. cv. Xanthi nc) que fueron inoculadas mecánicamente o por áfidos.

Inoculación mecánica: Frotando sobre una hoja espolvoreada con celita un extracto de planta infectada o virus purificado diluidos en tampón fosfato sódico 0.02M pH 7.

Inoculación por áfidos: Se empleó un clon de la especie *Myzus persicae* Sulz, mantenido sobre plantas no infectadas de pimiento var. Yolo Wonder en una cámara a 20-22 °C, con una humedad relativa del 70% y un fotoperiodo de 16 horas.

### **II.2.2- Microscopía electrónica**

Muestras de virus purificado y extractos de planta infectada se observaron en el microscopio electrónico (Philips EM-300) mediante tinciones negativas, obtenidas diluyendo en proporción 1:1 la muestra a analizar con una solución acuosa de acetato de uranilo o de ácido fosfotúngstico, ambos al 2%.

Alteraciones celulares inducidas por los virus se observaron en cortes ultrafinos de pequeños trozos de hojas en los que los síntomas eran más patentes. Las muestras de hojas fueron sometidas a un proceso de fijación con glutaraldehído al 5% seguido de tetróxido de osmio al 2% en tampón fosfato sódico 0.1M pH 7, de deshidratación en concentraciones crecientes de acetona y de infiltración con resina epoxi (Durcupan ACM, Fluka). Una vez polimerizada la resina, se hicieron los cortes ultrafinos con un ultramicrotomo LKB III 8.800, y se tiñeron con citrato de plomo y acetato de uranilo (Hayat, 1986). Para su observación, los cortes se colocaron sobre rejillas de cobre de 200 mesh recubiertas de una película de formvar reforzada con carbón vaporizado.

### **II.2.3- Purificación de virus y de componente "helper"**

Los virus se purificaron de acuerdo a los métodos descritos por Moghal y Francki, (1976) y Murphy (comunicación personal), y el HC-Pro como describen Thornbury et al., (1985). En los tres casos a partir de hojas de tabaco (*N. tabacum* L. cv. Xanthi nc) sistémicamente infectado, 14-30 días después de la inoculación. Los tres protocolos de purificación se describen en el anexo de este Capítulo.

#### **II.2.4- Serología**

En las plantas utilizadas en ensayos de transmisión se comprobó la infección viral mediante la técnica ELISA DAS (Clark y Adams, 1977). Las plantas de ensayo se analizaron transcurridos 14-20 días del experimento de transmisión. Se utilizó un "kit" de anticuerpos monoclonales (Mabs) contra la CP de PVY elaborado por INGENASA S.A. (Mabs 10E3, 12C4 y 10E3 conjugado con biotina) (Sanz et al., 1990), que reconocían a todos los aislados de PVY utilizados en los experimentos de transmisión, y un Mab que reconocía específicamente al aislado PVY-N (Mab. C9), (Gugerli y Fries, 1983). La reacción se desarrolló usando estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (Sigma). La solución sustrato contenía O-fenilen-diamino (OPD) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y se midió la absorbancia a 492 nm (OD<sub>492</sub>) (Kendall et al., 1983).

Se elaboró un suero policlonal de conejo contra el HC-Pro del aislado PVY-0 (HC-Pab) con el fin de poder detectarlo serológicamente, a partir de proteína eluída de geles de acrilamida. El procedimiento se detalla en el Capítulo III.

#### **II.2.5- Transmisiones por áfidos**

Los experimentos de transmisión se hicieron con plantas de tabaco bajo luz fluorescente blanca, a temperatura ambiente. Grupos de 40 áfidos (*Myzus persicae* Sulz), mantenidos en viales de vidrio las 2-3 horas previas al experimento, eran situados con ayuda de un pincel sobre una hoja de la planta infectada o sobre la membrana de parafilm, donde se les permitía hacer pruebas de adquisición durante un período de 10 minutos. Posteriormente, diez áfidos eran transferidos a cada planta de ensayo donde, como período de inoculación, permanecían hasta el día siguiente, en el que eran eliminados pulverizando las plantas con insecticida (Pirimicarb, ICI-Zeltia)

Se realizaron tres tipos de transmisiones:

**II.2.5.1- Transmisiones de planta a planta.** Los áfidos se alimentaban en una hoja joven de una planta de tabaco infectado, inoculada 10-20 días antes del experimento, colocada sobre papel de filtro humedecido en una placa Petri. Después se les transfería a las plantas de ensayo.

**II.2.5.2- Transmisiones de adquisición a través de membranas.** Los áfidos se alimentaban a través de membranas tensadas de parafilm en una mezcla de purificados de virus (200 µg/ml) y de HC-Pro (sin diluir o a dilución 1/2), en tampón 0.2M tris-sulfúrico pH 7.2, 0.02M MgSO<sub>4</sub> (TSM) con un 20% (p/v) de sacarosa. Se analizaron combinaciones de virus/HC-Pro homólogas y heterólogas.

Antes de su uso en los ensayos de transmisión de PVY, se analizaron las muestras de virus y de HC-Pro purificadas en geles SDS-PAGE del 12.5% (Laemmli et al., 1974). Asimismo, la actividad biológica de las preparaciones de HC-Pro fué previamente testada en transmisiones por membranas utilizando virus del grabado del tabaco purificado (tobacco etch virus, TEV) altamente transmisible, suministrado por el Dr. T.P. Pirone.

**II.2.5.3- Transmisiones secuenciales.** Los áfidos se alimentaban a través de membranas de parafilm tensadas en una solución conteniendo HC-Pro purificado (sin diluir o a dilución 1/2) en TSM-sacarosa, antes de colocarlos sobre una hoja de tabaco infectado con un aislado no transmisible. Sobre la hoja se les permitía un tiempo de alimentación adicional de 10 minutos, antes de ser transferidos a las plantas de ensayo. Esta misma hoja de tabaco infectado se usaba también en un experimento convencional de transmisión planta a planta que servía de control negativo.

## **II.2.6- Análisis por inmunoelectrotransferencia del HC-Pro en preparaciones purificadas y en extractos de hoja infectada.**

Preparaciones de HC-Pro purificado y extractos de hojas de tabaco Xanthi no infectado con PVY, se analizaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida desnaturalizantes por SDS (SDS-PAGE) de gradiente (4,5%-gel concentrador, gradiente del 5 al 15%-gel separador) seguido de inmunoelectrotransferencia ("Western blot") a membranas de nitrocelulosa (Towbin et al., 1979). Tras la transferencia de las proteínas, las membranas se bloquearon con leche desnatada al 5% en 0.15M cloruro sódico, 0.015M fosfato sódico, pH 7.4 (PBS) durante 2 horas y se incubaron con el anticuerpo HC-Pab en la misma solución (1 µg/ml). Como segundo anticuerpo se utilizó uno de cabra anticonejo conjugado con peroxidasa (Nordic Immunology).

Los extractos de hoja se obtuvieron macerando tejido de hoja fresca (1/10 p/v) bien en PBS o bien en PBS conteniendo un 1% de 2-mercaptoetanol (2-ME). A continuación se clarificaron a 6000 rpm 15 sgs en una microfuga Eppendorf. Las muestras se adicionaron con 2-ME hasta el 1% (v/v) cuando este agente no estaba presente en el tampón de extracción. Finalmente, se añadió SDS hasta el 2% y glicerol hasta el 10% (v/v) y las muestras se calentaron 5 min a 100°C.

## **II.2.7- Análisis de la acumulación de HC-Pro en hoja infectada**

Se utilizó el sistema ELISA Indirecto (tapizado de placa con el antígeno) (Converse y Martin, 1991) utilizando el anticuerpo HC-Pab, para comparar las cinéticas de acumulación de los componentes "helper" codificados por los aislados PVY-0, PVY-0 NAT y PVY-1, en una hoja de tabaco durante una infección sistémica.

Para cada aislado viral, quince plantas fueron inoculadas mecánicamente en dos hojas consecutivas con

alícuotas iguales (20 µl/hoja) de extracto de planta infectada. A los 2,4,6,10 o 14 días postinoculación, la hoja inmediatamente superior a las dos inoculadas se cortó, pesó y congeló a -80°C. Tres hojas de tres plantas diferentes se recogieron en cada tiempo.

La hoja congelada entera se maceró en PBS (1/5 p/v) con 0.05M PMSF. Cada extracto se centrifugó a 6000 rpm 15 sgs en una microfuga Eppendorf, se diluyó 1:1 en tampón Na-carbonato pH 9.6 y se analizó en ELISA Indirecto utilizando el anticuerpo HC-Pab.

Los extractos fueron también analizados por "Western blot" y por ELISA Indirecto utilizando un Mab contra la CP viral de PVY (Mab 10E3 de INGENASA, S.A.). Para ello, alícuotas de los tres extractos correspondientes a un mismo tiempo se combinaron en cantidades equivalentes (100 µl).

Las placas de ELISA se tapizaron con el extracto (100 ul/pocillo) durante toda la noche a 4°C, después se incubaron dos horas a 30 °C con el anticuerpo HC-Pab (1 µg/ml) o con el Mab 10E3 en PBS con Tween-20 al 0.2% (PBS-T) y 0.3% de leche desnatada, y finalmente se incubaron otras dos horas a 30°C con un anticuerpo de cabra anticonejo ó antirrátón conjugado con peroxidasa respectivamente. La solución sustrato contenía O-fenilen-diamino (OPD) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y se midió la absorvancia a 492 nm (OD<sub>492</sub>) (Kendall et al., 1983).

## **II.3- RESULTADOS**

### **II.3.1- Sintomatología y ultraestructura de células infectadas**

Los cuatro aislados (PVY-0, PVY-0 NAT, PVY-1 y PVY-N) provocaron unos síntomas similares en tabaco (*N. tabacum* cvs. Xanthi nc, White Burley y Samsun), un mosaico leve sistémico. PVY-N no provocó la necrosis de venas característica del grupo N (Fig. 1A).

En pimiento (*Capsicum annuum*), los cuatro aislados, incluido PVY-N, infectaron sistémicamente a la variedad Yolo Wonder, provocando mosaico y defoliación parcial. Los aislados PVY-0 y PVY-0 NAT no infectaron sistémicamente a la variedad Yolo Y, mientras que PVY-1 sí lo hizo, como era de esperar por su caracterización, provocando unos síntomas similares a los observados en la var. Yolo Wonder (Fig. 1B).

En *Physalis floridana*, los cuatro aislados produjeron mosaico sistémico, seguido de marchitamiento, necrosis apical y muerte de la planta (Fig. 1C).

En *N. benthamiana*, los cuatro aislados indujeron infección sistémica con mosaico de manchas cloróticas, retorcimiento de hojas, multiplicación de tallos laterales y de inflorescencias. En la mayor parte de los casos se observó necrosis apical y muerte de la planta (Fig. 1D).

En observaciones al microscopio electrónico de la ultraestructura de células infectadas, la infección por los diferentes aislados de PVY indujo la acumulación de inclusiones citoplasmáticas cilíndricas características "pinwheels" con forma de roseta de radios curvos, en sección transversal, o de haces, en secciones longitudinales (Figs. 2A y 2B)

### **II.3.2- Análisis de HC-Pro y de virus purificados**

En el análisis electroforético de preparaciones de HC-Pro purificado se observa, en tinción con Coomassie R-250, la presencia de una banda con un peso molecular (MW) de alrededor de 50 kDa correspondiente a la proteína HC-Pro, no presente en preparaciones equivalentes obtenidas a partir de tejido de planta sana. Aparecen además, bandas contaminantes correspondientes a proteínas de la planta que copurifican con el HC-Pro (Fig. 3). La banda HC-Pro se observó en preparaciones obtenidas de plantas infectadas con PVY-0, PVY-0 NAT y PVY-N, no consiguiéndose detectarla en preparaciones

de HC-Pro del aislado PVY-1, a pesar de los repetidos intentos de purificación (Fig. 4A).

Los rendimientos de purificación de virus, medidos espectrofotométricamente, dieron valores entre 0.9 y 2 mg/100 g de tejido vegetal fresco, para los diferentes aislados de PVY, siguiendo cualquiera de los dos métodos de purificación utilizados. En observaciones al microscopio electrónico de muestras de virus purificado las partículas virales aparecían con la forma alargada y flexuosa característica de los potyvirus (Fig. 2C).

En el análisis electroforético de muestras de virus purificado, obtenidos siguiendo el método de Murphy se observa la CP viral como una banda de alrededor de 35 kDa en todos los aislados, excepto en el aislado PVY-N en la que es ligeramente menor (33 kDa) (Fig. 4B). En cambio, cuando se analizaron purificados virales obtenidos siguiendo el método de Moghal y Francki, la CP aparece como una doble banda (Fig. 5), hecho que ya había sido previamente observado (Soto, M.J., comunicación personal), y con la banda de menor MW comigrando con la única obtenida al analizar virus purificado según Murphy. Se detectaron también algunas bandas minoritarias de MW elevado que posiblemente representan agregaciones de la CP, puesto que reaccionan serológicamente con Mabs contra la proteína de cubierta (no se muestra).

Ambos tipos de purificados virales se utilizaron indistintamente en los ensayos de transmisión.

### **II.3.3- Transmisiones por áfidos**

#### **II.3.3.1- Transmisiones de planta a planta.**

Las transmisiones por áfidos de planta infectada a planta sana resultaron altamente positivas en el caso de los aislados PVY-0 y PVY-N: 34/40 y 30/38 respectivamente (nº de plantas que resultaron

infectadas sobre el total). Por el contrario, la transmisión de los aislados PVY-0 NAT y PVY-1 fué negativa en todos los experimentos (0/45 y 0/40 respectivamente) (**Tabla 1**).

Para dilucidar si la CP o bien el HC-Pro estaban involucrados en esta falta de transmisibilidad, se realizaron a continuación una serie de experimentos de transmisión mediante adquisiciones a través de membranas y secuenciales.

#### **II.3.3.2- Transmisiones de adquisición a través de membranas.**

Se obtuvieron elevados niveles de transmisión cuando cualquiera de los cuatro aislados virales purificados se mezcló con HC-Pro purificado de PVY-0 o de PVY-N. Sin embargo, el HC purificado de PVY-0 NAT no pudo promover la transmisión por áfidos de su virus homólogo, ni la de cualquiera de los otros virus heterólogos (**Tabla 2**). Asimismo, no promovió la transmisión de TEV (resultado no mostrado).

Estos datos indican que un defecto en el HC-Pro que afecta a su funcionalidad en transmisión es la causa de la falta de transmisibilidad viral del aislado PVY-0 NAT.

Por otro lado, con ayuda de las fracciones obtenidas en el proceso de purificación de HC-Pro de PVY-1, en las que no se consiguió detectar esta proteína, no se transmitió ningún aislado viral.

#### **II.3.3.3- Transmisiones secuenciales**

En transmisiones secuenciales, cuando a los áfidos se les dió acceso a través de membranas a una solución conteniendo HC-Pro purificado activo en transmisión, antes de permitirlos alimentarse de nuevo sobre una hoja de planta infectada con un aislado no transmisible (PVY-0 NAT o PVY-1

indistintamente), ambos virus se transmitieron a un elevado nivel. En los experimentos control de transmisión planta a planta los resultados fueron siempre negativos (Tabla 3).

Por otro lado, se estudió la transmisibilidad por áfidos del aislado PVC 31 en una serie de experimentos combinados de transmisión de tipo secuencial y de adquisición a través de membranas artificiales. Los resultados sugieren que dicho aislado no es transmisible debido a la falta de funcionalidad de su componente "helper" (Tabla 4).

#### **II.3.4- Análisis por inmunoelectrotransferencia del HC-Pro en preparaciones purificadas**

Una banda mayoritaria de unos 50 kDa fué detectada por el anticuerpo HC-Pab en análisis por inmunoelectrotransferencia, "Western blot", de preparaciones de HC-Pro purificadas de los aislados PVY-0, PVY-0 NAT y PVY-N. Por el contrario, en el caso de PVY-1, su proteína HC-Pro, indetectable en tinción de coomasie, no lo pudo ser tampoco serológicamente (Fig. 6).

Para estudiar la posible presencia y las cantidades relativas de HC-Pro de PVY-1 en planta infectada se utilizaron dos aproximaciones: A, la detección del HC-Pro en extractos de hoja de tabaco infectada y su distribución en las diferentes hojas de una misma planta (punto II.3.5) y B, un estudio comparativo de la cinética de acumulación de HC-Pro en una hoja de tabaco durante una infección sistémica (punto II.3.6).

#### **II.3.5- Análisis por inmunoelectrotransferencia del HC-Pro en extractos de hoja infectada.**

La presencia de HC-Pro en extractos de hojas de plantas infectadas con los cuatro aislados se confirmó mediante análisis por Western blot de los mismos, incluyendo al aislado PVY-1, cuyo HC-Pro no pudo ser purificado. Al analizar electroforéticamente estos extractos, la proteína HC-Pro generó

sorprendentemente dos patrones diferentes de bandas, dependiendo del modo de preparación del extracto de una misma hoja de planta infectada (Fig. 7). Si un agente reductor de grupos sulfidrilo (2-ME, DTT) estaba incluido en el tampón de extracción (PBS), sólo se detectaba la banda HC-Pro de alrededor de 50 kDa (Fig. 7A). Sin embargo, cuando el extracto se preparaba en PBS y el 2-ME se añadía posteriormente, varias bandas con pesos moleculares aparentes desde 100 kDa hasta por encima de 200 kDa eran reconocidas por el anticuerpo HC-Pab, junto con la banda descrita para el HC-Pro de 50 kDa. Este comportamiento se analiza con detalle en el Capítulo V. A la vez, en ambos extractos se detectaron varias bandas de MWs menores de 50 kDa, que posiblemente corresponden a HC-Pro degradado (Fig. 7).

Se analizaron extractos de hojas infectadas con los aislados PVY-0, PVY-0 NAT y PVY-1 respectivamente, preparados mediante ambos procedimientos de extracción (Fig. 7). Cuando se añadía el 1% de 2-ME con posterioridad a la elaboración del extracto, los aislados PVY-0 y PVY-0 NAT daban un patrón de bandas de HC-Pro idéntico (similar al generado por el HC-Pro de PVY-N, que no se muestra), mientras que el patrón de bandas inducido por el HC-Pro de PVY-1 mostraba algunas diferencias; la banda de 50 kDa era apenas visible (a veces no visible en absoluto) y una banda de unos 150 kDa no aparecía, acumulándose el HC-Pro aparentemente en las bandas superiores de mayor MW (Fig. 7B).

El patrón permanece inalterable independientemente de la planta infectada analizada, y de la hoja seleccionada dentro de una misma planta. Para una misma planta, la cantidad de HC-Pro por unidad de peso fresco se incrementa desde las hojas superiores a las inferiores (Fig. 8).

### **II.3.6- Análisis de acumulación de HC-Pro en hoja**

Las cinéticas relativas de acumulación del HC-Pro en una hoja de planta de tabaco durante una

infección sistémica fueron obtenidas, para los aislados PVY-0, PVY-0 NAT y PVY-1, mediante ELISA indirecto utilizando el anticuerpo HC-Pab. Los resultados mostraron un incremento en los niveles de HC-Pro con el tiempo. Los valores de absorvancia fueron muy similares para hojas infectadas con los aislados PVY-0 o PVY-0 NAT. Sin embargo, las lecturas obtenidas en la infección con PVY-1 fueron la mitad de las de los otros dos aislados para los días 10 y 14 postinoculación (Fig. 9A).

Con respecto a la acumulación de la CP viral, las cinéticas relativas, medidas por ELISA Indirecto y por "Western blot", no mostraron grandes diferencias entre los tres virus analizados (Figs. 9B y 9C).

#### **II.4- DISCUSION**

En el presente trabajo se ha estudiado la transmisibilidad por áfidos de cuatro aislados de PVY. Dos aislados, PVY-0 NAT y PVY-1, han resultado no transmisibles en ensayos de transmisión de planta infectada a planta sana. En transmisiones de adquisición a través de membranas y secuenciales, ambos aislados se transmitieron en una proporción similar a la observada en los aislados naturalmente transmisibles, cuando fueron suplementados con un HC-Pro heterólogo y biológicamente activo. Así se ha demostrado que sus CPs mantienen la funcionalidad para el proceso de transmisión viral por áfidos.

Ambos aislados provienen de muestras de virus mantenidas largo tiempo en plantas de tabaco y pimiento, mediante pases sucesivos de inoculación mecánica, y las deficiencias en su transmisión podrían haberse originado en el invernadero.

En nuestros experimentos utilizando HC-Pro purificado de PVY-0 NAT en transmisiones de adquisiciones a través de membranas, no se pudo promover la transmisión de ninguno de los aislados de PVY estudiados, lo que demuestra que un defecto en esta proteína causaría la falta de

transmisibilidad viral. En general, la cantidad de proteína HC-Pro que contenían preparaciones purificadas de componente "helper" de los aislados PVY-0 y PVY-0 NAT fue similar, por lo que la alteración del HC-Pro de PVY-0 NAT no afectaría a la purificación del mismo.

En contraste, el HC-Pro codificado por PVY-1 no parece ser purificable con los mismos procedimientos, pese a que la presencia de HC-Pro de PVY-1 en planta infectada ha sido confirmada mediante ELISA indirecto y por Western blot. En el análisis electroforético de preparaciones obtenidas tras el proceso de purificación, la banda de HC-Pro no pudo ser detectada por tinción de coomasie ni serológicamente. Este comportamiento del HC-Pro de PVY-1 ha impedido el establecimiento de una relación directa entre su falta de transmisibilidad por áfidos y un defecto en el HC-Pro, mediante transmisiones de adquisición a través de membranas. Sin embargo, los resultados de los experimentos secuenciales son bastante concluyentes y parecen indicar la presencia de un defecto en la proteína HC-Pro.

Es interesante resaltar que, frente a lo que sucede con PVY-1, no se conoce si los componentes "helper" de tres potyvirus no transmisibles por áfidos y que se han caracterizado como defectuosos en sus HC-Pros, los aislados ZYMV E15-PAT y RSA-PAT (Lecoq et al., 1991; Granier et al., 1993) y el aislado TuMV 31 (Nakashima et al., 1993), pueden ser realmente purificados.

Por otro lado, las preparaciones de HC-Pro purificado de PVY-N presentaron una menor cantidad relativa de proteína HC-Pro. Sin embargo, fueron bastante activas en la promoción de la transmisión viral en adquisiciones a través de membranas a las diluciones empleadas, que están muy por encima de los niveles mínimos requeridos, tanto de virus como de HC-Pro purificado, para una transmisión efectiva por áfidos del 100% (Pirone, 1981).

Para los tres aislados analizados, la acumulación de HC-Pro en hoja durante una infección sistémica,

medida por ELISA Indirecto, parece alcanzar un máximo antes que la de CP viral, lo que no difiere de resultados publicados (Baunoch et al., 1991). No obstante, en el caso de PVY-1, las lecturas de absorvancia para los días 10 y 14 postinoculación son comparativamente menores que las obtenidas para los otros dos aislados analizados PVY-0 y PVY-0 NAT. Estos bajos valores no parecen estar causadas por bajos niveles de virus en planta, puesto que las cinéticas de acumulación de la CP son bastante similares para los tres aislados.

Estos resultados contrastan con los bajos niveles de acumulación de HC-Pro en planta observados con mutantes de HC-Pro de TVMV y de TEV, obtenidos por mutagénesis dirigida, que se correspondieron con bajos niveles de virus en planta (Atreya et al., 1992; Dolja et al., 1993; Atreya y Pirone, 1993). Así, las alteraciones de HC-Pro aquí descritas no parecen afectar a la expresión de síntomas ni a la cantidad de virus en planta infectada. De hecho, el aislado PVY-0 NAT tiene propiedades similares a PVC, que también induce síntomas típicos y cuyo HC-Pro puede ser fácilmente purificado (Atreya et al., 1990).

El hecho de que el HC-Pro del aislado PVY-1 presente un comportamiento electroforético diferente del que muestran los componentes "helper" de los otros aislados de PVY analizados, podría estar relacionado con las propiedades de la proteína causantes de su falta de funcionalidad en la transmisión y/o con las dificultades observadas en su purificación.

Nuestros resultados podrían indicar que el HC-Pro de PVY-1 presenta una mayor inestabilidad que los componentes "helper" de los otros dos aislados analizados, que podría llevar a su menor acumulación en hoja debido a procesos degradativos. Este efecto podría ser similar al propuesto para explicar los bajos niveles de proteína P18 (factor de transmisión) detectados en plantas infectadas con un aislado no transmisible por áfidos del virus del mosaico de la coliflor (CM1841) (Hakayashiki et al., 1993). Alternativamente, podría también ocurrir que, por sus propiedades moleculares, esta

inestabilidad se tradujera en que la cantidad de proteína HC-Pro de PVY-1 obtenida en el proceso de extracción y clarificación necesario para el análisis por ELISA indirecto fuese menor que la obtenida para los otros dos aislados virales analizados, pudiendo esto tener relación además con las dificultades encontradas en su purificación por el método convencional, de modo que para conseguirla podrían ser necesarios otros procedimientos.

En cualquier caso, ni la falta de transmisibilidad de PVY-1 ni la no purificación de su HC-Pro pueden ser atribuidos a una falta de esta proteína en planta. Una situación similar ha sido observada con otros potyvirus, como TEV (Pirone and Thornbury, 1983) o PPV (Ravelonandro et al., 1993), cuyos componentes "helper" han sido detectados en fracciones de proteínas totales de planta, extraídas con SDS, pero no han podido ser purificados, aunque esta característica es independiente de la transmisibilidad del virus. Estos fallos en la purificación de HC-Pro podrían también tener su causa en una inestabilidad de la proteína como forma soluble durante los distintos pasos del proceso de purificación.

Los experimentos de transmisión secuenciales utilizando sucesivamente dos plantas o dos membranas eran ya conocidos (Govier y Kassanis, 1974; Kassanis y Govier, 1971; Pirone, 1977), y su utilidad para la detección de virus defectivos en HC-Pro ha sido comentada (Bourdin y Lecoq, 1991). Sin embargo, los experimentos de transmisión secuenciales de membrana y planta sucesivamente han revelado su utilidad en la diferenciación preliminar de posibles alteraciones en las funcionalidades del HC-Pro o de la CP en aislados no transmisibles, evitándose la necesidad de purificar el virus. El uso en estos ensayos de HC-Pro purificado heterólogo, evita también la necesidad de purificar el HC-Pro de cada aislado analizado. Así, del mismo modo que se han caracterizado los aislados PVY-0 NAT y PVY-1 como defectivos en HC-Pro, se ha caracterizado preliminarmente al aislado PVYC 31 como defectuoso en su HC-Pro, y este tipo de experimentos ha sido útil en la caracterización preliminar de un aislado de PPV como defectivo en HC-Pro (PPV-3.3) (López-Moya, 1993).

## **II.5- FIGURAS**

**Fig. 1** A: Síntomas provocados en tabaco Xanthi nc por el aislado PVY-0 B: Síntomas provocados en pimiento var. Yolo Wonder por el aislado PVY-N. C: Síntomas provocados en *P. floridana* por el aislado PVY-0 NAT. D: Síntomas provocados en *N. benthamiana* por el aislado PVY-N.

**Fig. 2** A: Ultraestructura de células de tejido de hoja de *N. benthamiana* infectada con el aislado PVY-N. Se observan inclusiones cilíndricas citoplasmáticas en sección transversal y longitudinal. B: Tinción negativa de un extracto de planta de pimiento var. Yolo Wonder infectado con el aislado PVY-N. Detalle de una inclusión cilíndrica. C: Tinción negativa de una muestra de virus purificado (aislado PVY-1). La barra representa 200 nm.

**Fig. 3** SDS-PAGE (gel del 12.5% teñido con Coomassie Blue R-250) de preparaciones de HC-Pro purificado obtenidas a partir de planta sana (línea 1) o infectada con el aislado PVY-0 (línea 2). Línea 3, marcadores de peso molecular (Bio-Rad)

**Fig. 4** SDS-PAGE (gel del 12,5% teñido con Coomassie Blue R-250) de preparaciones de HC-Pro y de virus purificados. A (líneas 1 a 4): Preparaciones de HC-Pro purificado obtenidas a partir de plantas infectadas con los aislados PVY-0, PVY-0 NAT, PVY-1 y PVY-N respectivamente. B (líneas 6 a 9): Muestras de virus purificado (método Murphy) PVY-0, PVY-0 (NAT), PVY-1 y PVY-N respectivamente. Línea 5, marcadores de peso molecular (Bio-Rad).

**Fig. 5** SDS-PAGE (gel del 12,5% teñido con Coomassie Blue R-250) de virus purificado (método de Moghal y Francki). Líneas 2 a 4, PVY-N, PVY-1 y PVY-0 NAT purificados respectivamente. Línea 1, marcadores de peso molecular (Bio-Rad).

**Fig. 6** Inmunoelctrotransferencia ("Western blot") de preparaciones de HC-Pro purificadas analizadas en gels de gradiente del 5 al 15%, utilizando el anticuerpo HC-Pab. Líneas 2, 3 y 5, HC-Pro purificado de los aislados PVY-0, PVY-0 NAT y PVY-N respectivamente. Línea 4, preparación

obtenida a partir de tabaco infectado con el aislado PVY-1. Línea 1, marcadores de peso molecular preteñidos (Bio-Rad).

**Fig. 7** Inmunoelectrotransferencia ("Western blot") de extractos de una misma hoja de tabaco analizados en geles de gradiente del 5 al 15%, utilizando el anticuerpo HC-Pab. **A:** Media hoja extraída en PBS con un 2% de 2-ME (líneas 1 a 3), **B:** La otra media hoja extraída en PBS (líneas 4 a 7). Se analizaron extractos de plantas infectadas con los aislados PVY-0 (líneas 1 y 4), PVY-0 NAT (líneas 2 y 5) y PVY-1 (líneas 3 y 6). Línea 7, extracto de planta sana. Las flechas indican las principales bandas reconocidas por el anticuerpo HC-Pab.

**Fig. 8** Inmunoelectrotransferencia ("Western blot") de extractos de cinco hojas consecutivas de una misma planta analizadas en geles de gradiente del 5 al 15%, de inferiores (izquierda) a superiores (derecha), usando el anticuerpo HC-Pab. Se compararon extractos en PBS de planta infectada con el aislado PVY-1 (líneas 1 a 5); PVY-0 NAT (líneas 6 a 10) y PVY-0 (líneas 11 a 15). Las flechas indican las principales bandas reconocidas por el anticuerpo HC-Pab.

**Fig. 9 A:** Análisis de la acumulación de HC-Pro en hoja de tabaco a 2, 4, 6, 10 y 14 días postinoculación durante una infección sistémica con los aislados PVY-0, PVY-0 NAT y PVY-1, estimadas por ELISA indirecto usando el anticuerpo HC-Pab. Cada punto representa el valor medio de la lectura por ELISA de tres hojas. Los segmentos verticales indican el límite de confianza al 95%. **B, C:** Los tres extractos correspondientes a un mismo tiempo postinoculación se combinaron en cantidades equivalentes y se analizaron por ELISA indirecto y por Western blot respectivamente, usando el Mab 10E3 contra la CP de PVY.

**Fig. 1**



Fig. 2

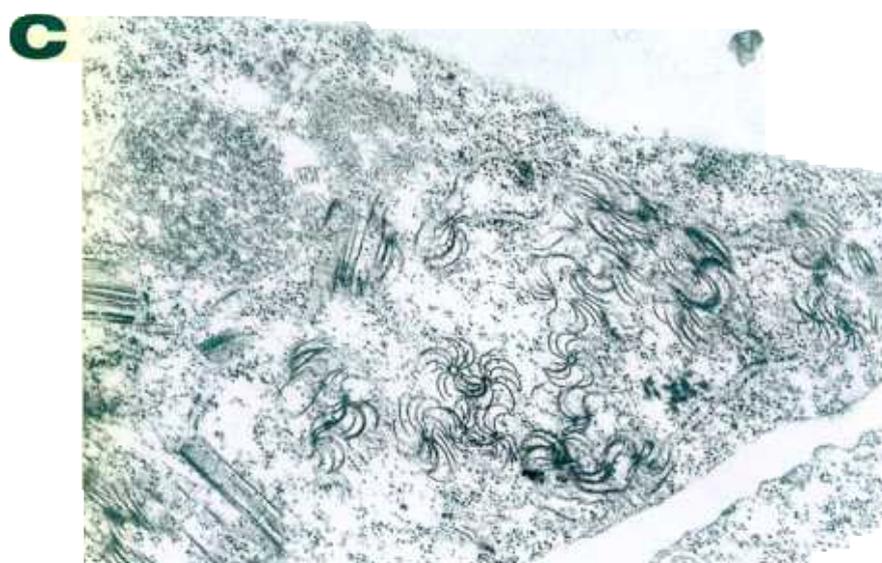
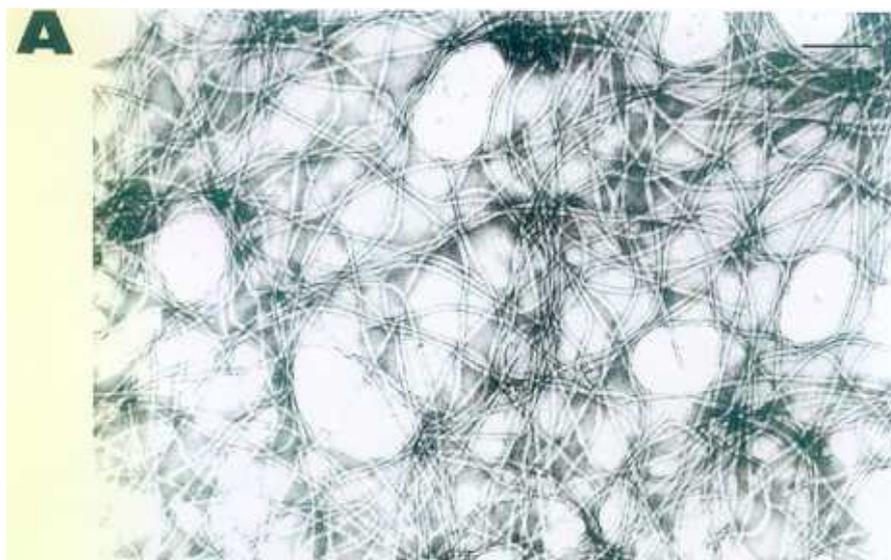


Fig. 3

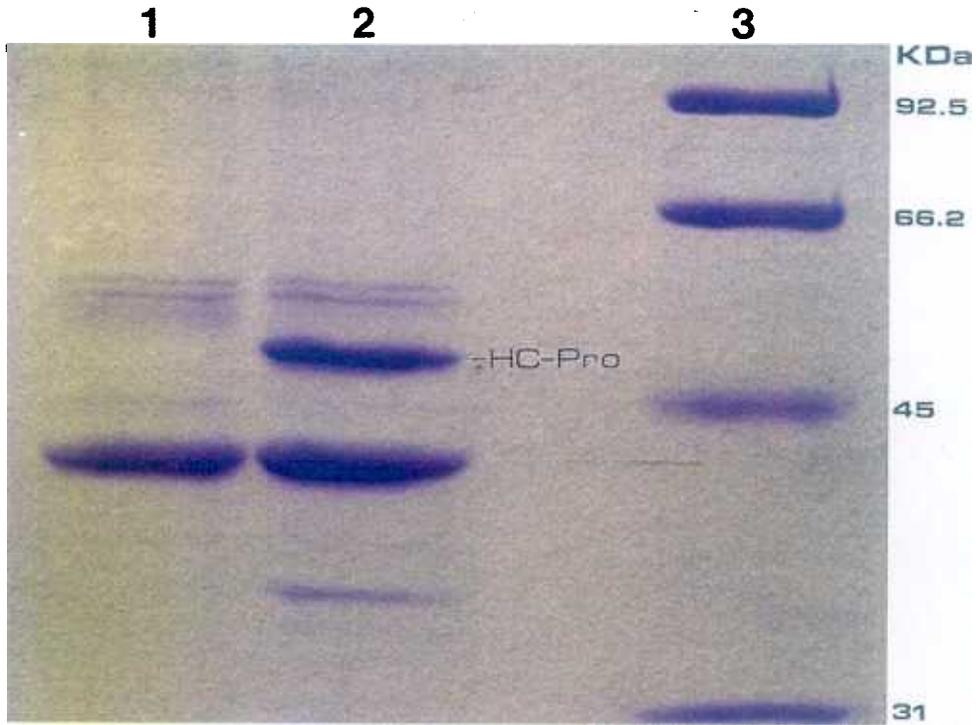


Fig. 4

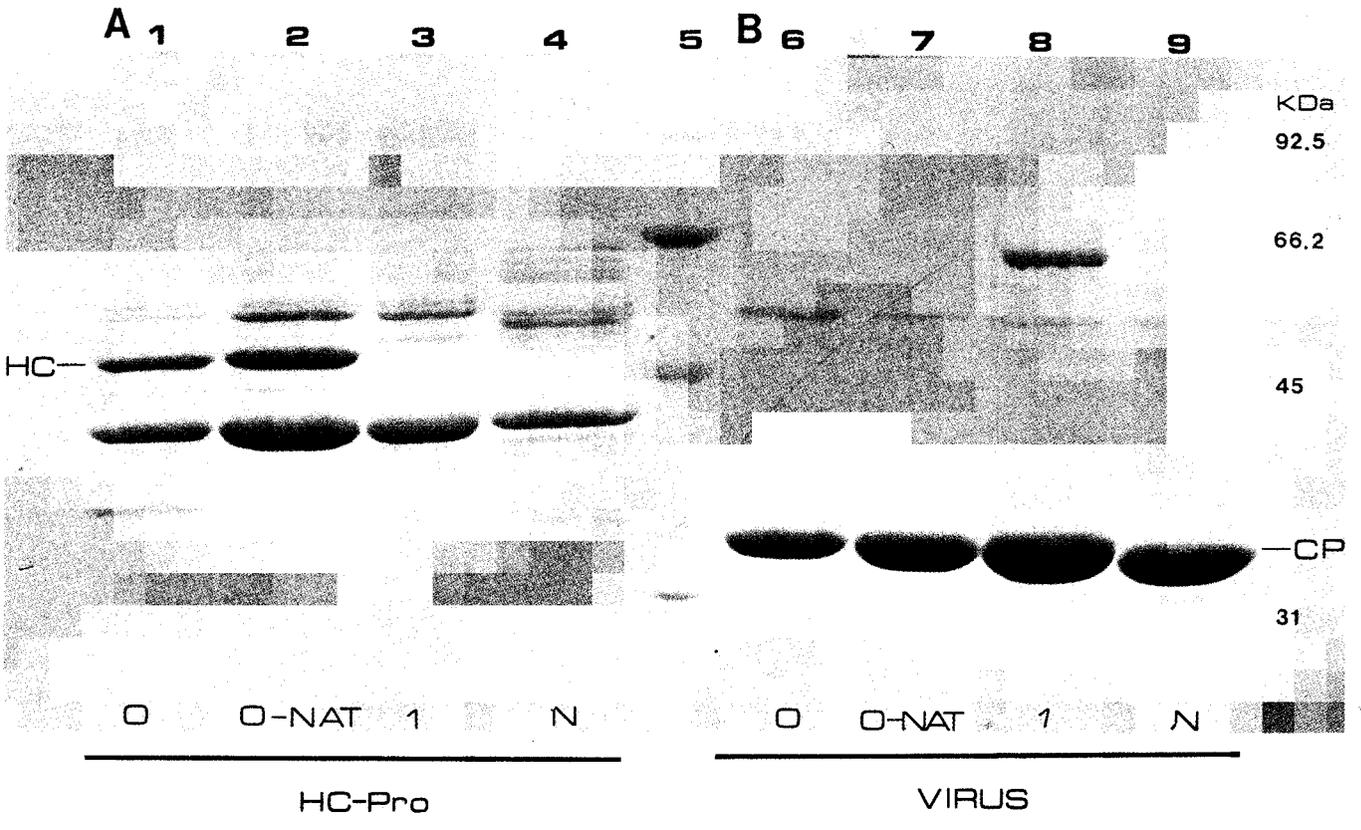


Fig. 5

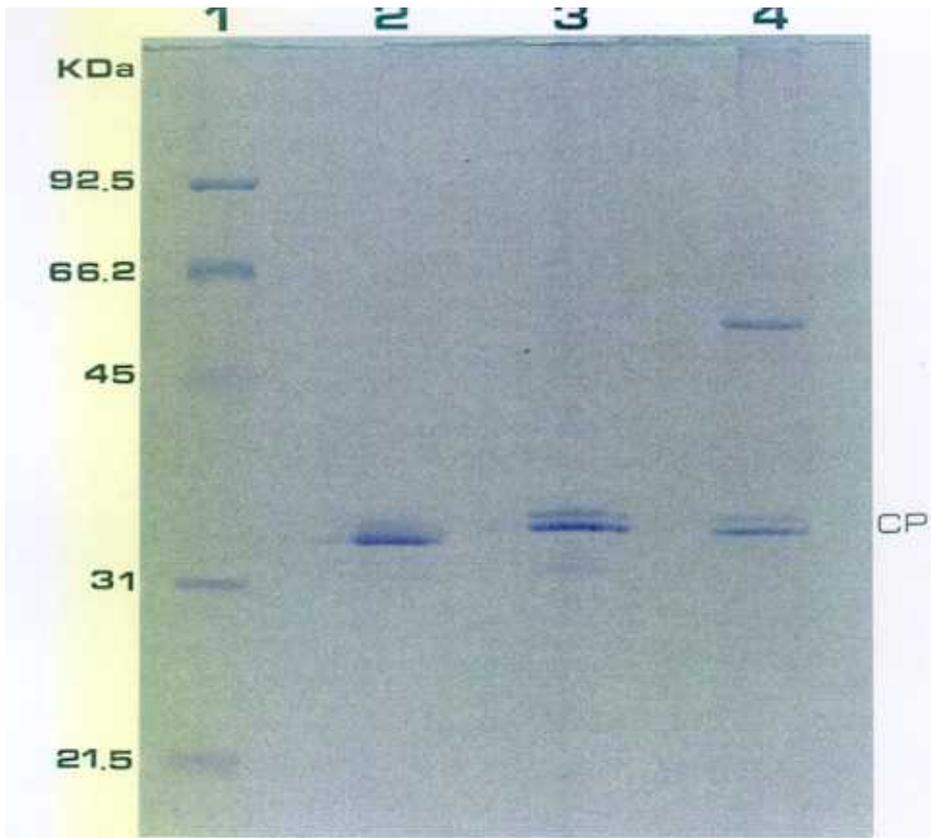


Fig. 6

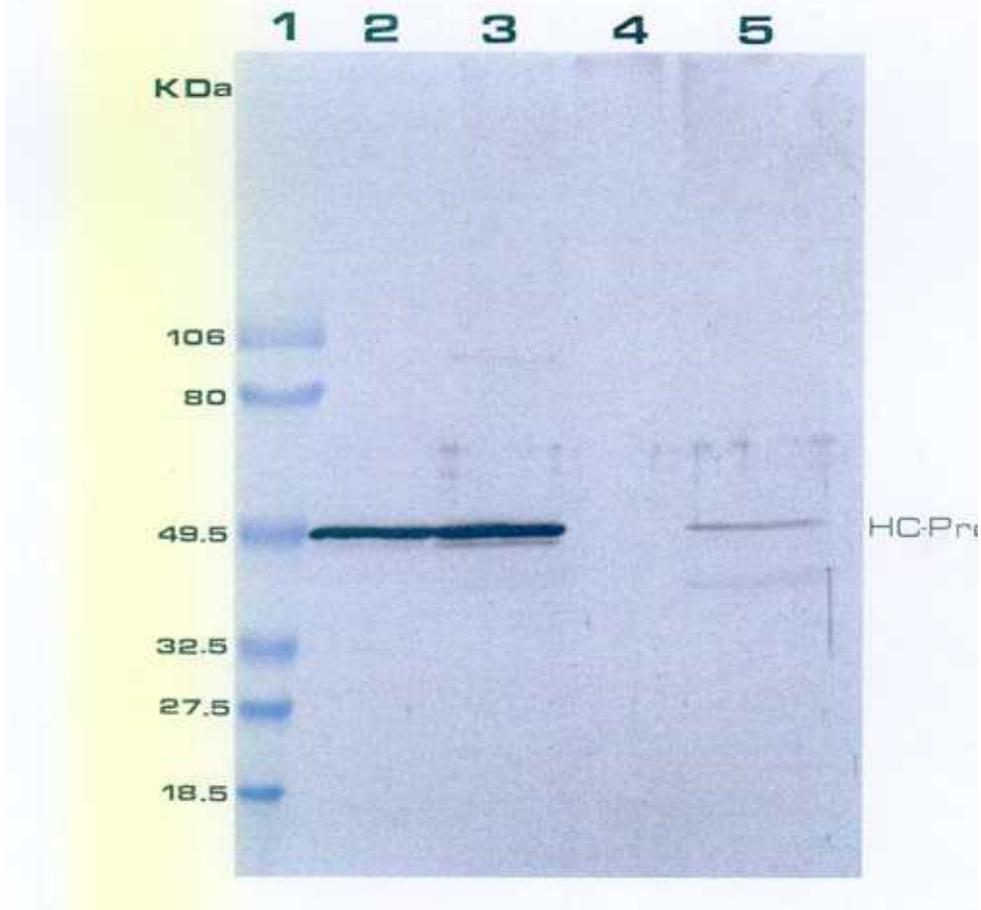


Fig. 7

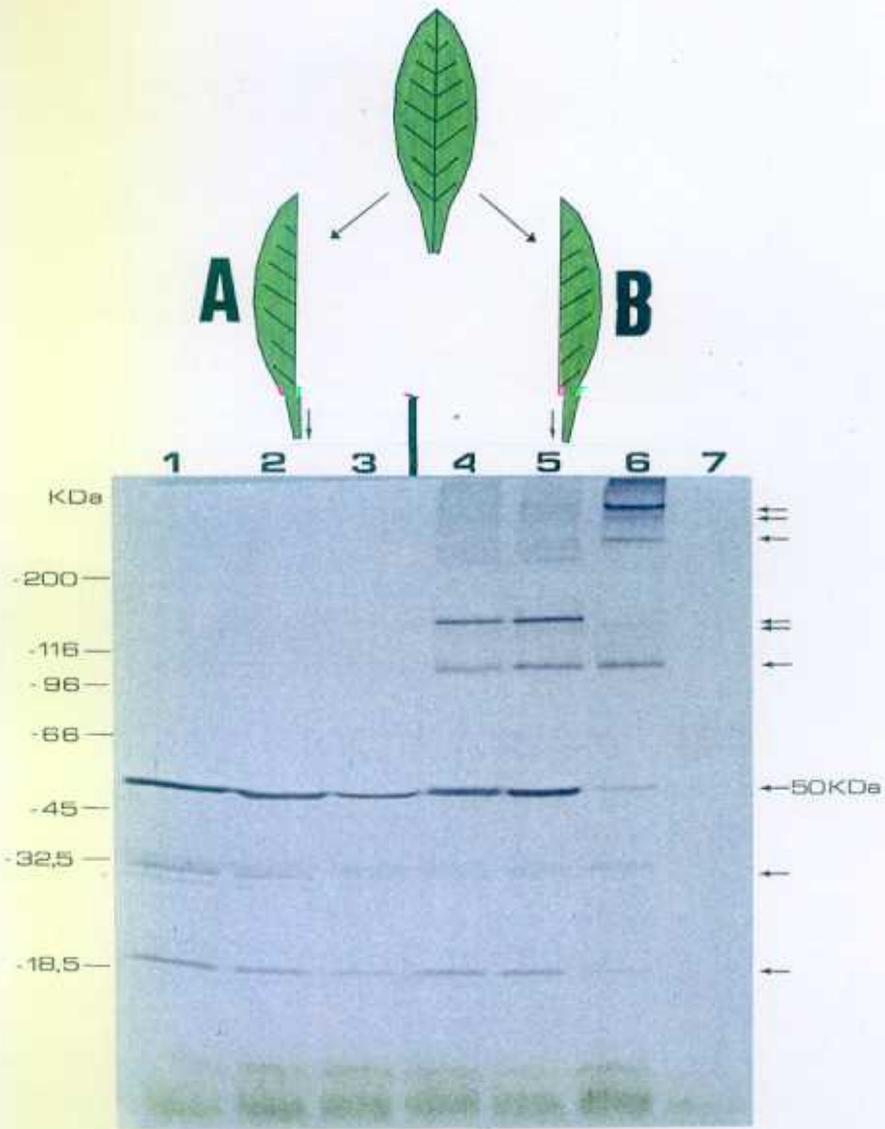


Fig. 8

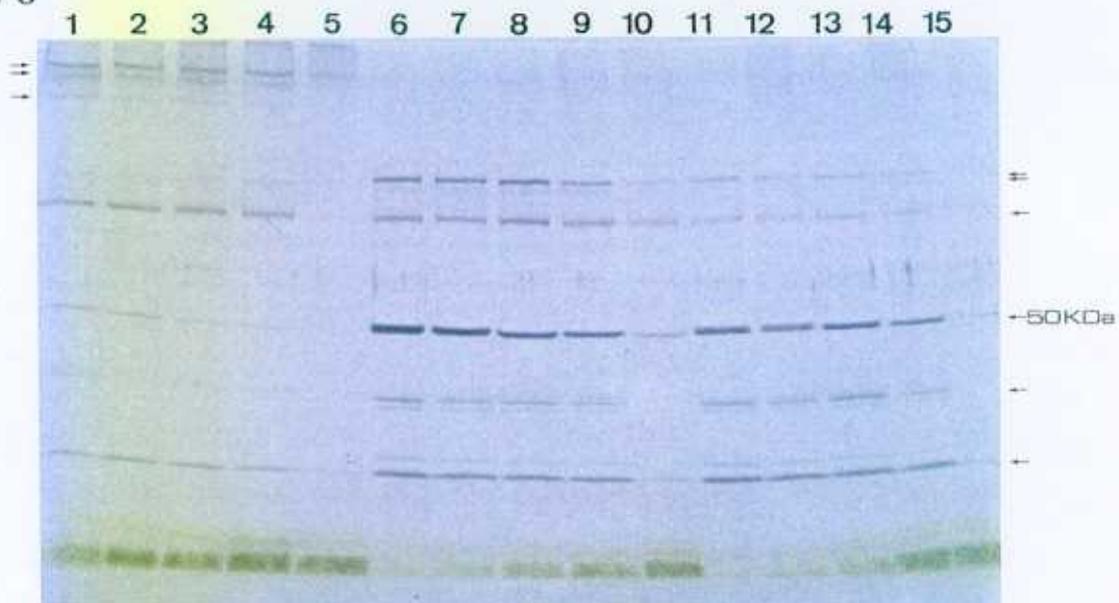
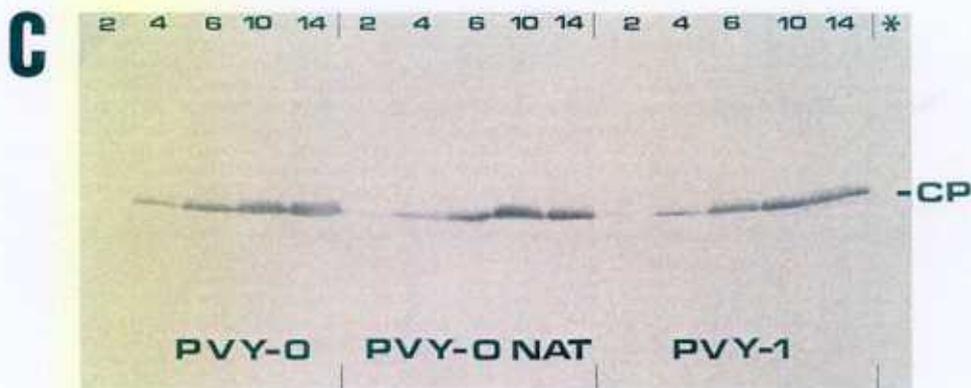
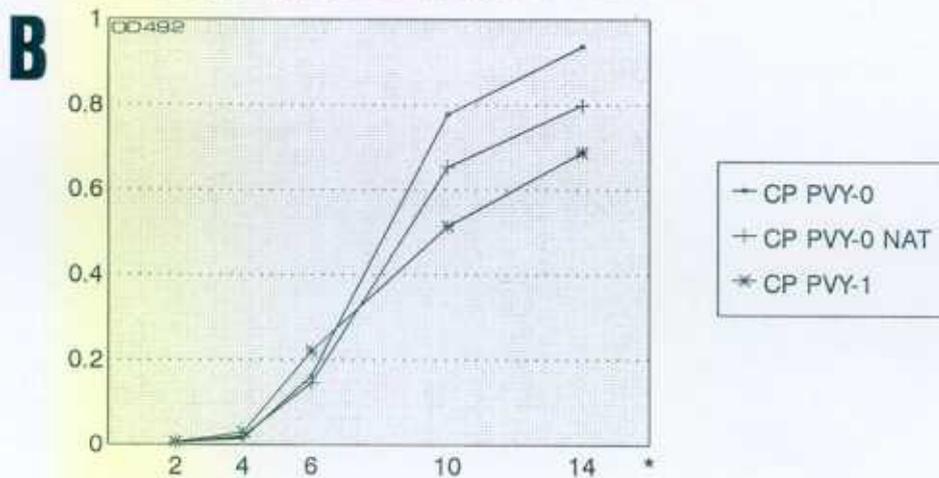
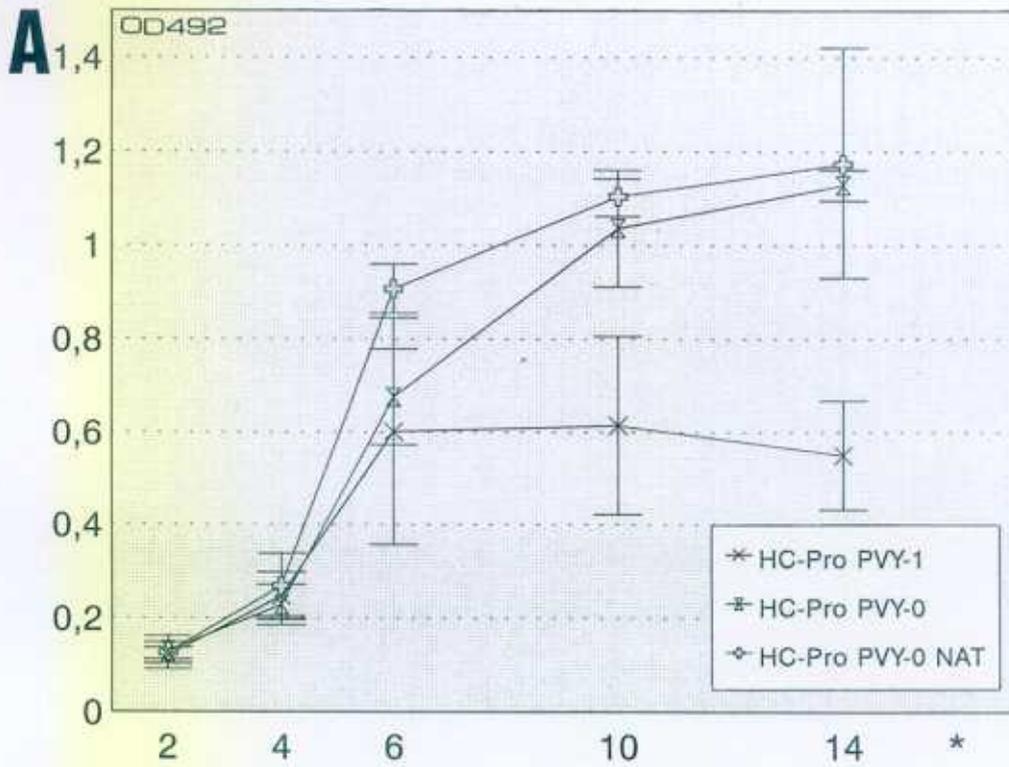


Fig. 9.



**Tabla 1. Transmisiones por áfidos de planta a planta**

VIRUS	PVY-0	PVY-0 (NAT)	PVY-1	PVY-N
Expt <sup>a</sup>	8/8 (*)	0/9	0/18	4/6
	6/6	0/18	0/9	9/9
	9/9	0/9	0/9	8/9
	5/9	0/9	0/8	3/8
	6/8			6/6
	34/40	0/45	0/40	30/38 (a)

\*: Los resultados se expresan como el número de plantas que resultaron infectadas y el total de plantas utilizadas en cada experimento. Se utilizaron diez áfidos por planta.

a: Sumatorio de los experimentos de transmisión.

**Tabla 2. Transmisiones por áfidos mediante adquisiciones a través de membranas**

HC-Pro PURIFICADO	VIRUS PURIFICADO			
	PVY-0	PVY-0 NAT	PVY-N	PVY-1
	9/9 (*)	9/9	9/9	8/8
<u>PVY-0 HC-Pro</u>	9/9	8/8	9/9	7/8
	3/3	8/8	9/9	8/8
	6/6		8/8	
	<b>27/27 (a)</b>	<b>25/25</b>	<b>35/35</b>	<b>23/24</b>
	0/9	0/9	0/9	0/8
<u>PVY-0 NAT HC-Pro</u>	0/9	0/8	0/18	0/8
	0/9	0/8		0/8
	<b>0/27</b>	<b>0/25</b>	<b>0/25</b>	<b>0/25</b>
	8/8	8/8	12/15	7/8
<u>PVY-N HC-Pro</u>	12/18	16/16	8/9	8/8
			5/9	7/8
	<b>20/26</b>	<b>25/25</b>	<b>25/33</b>	<b>22/24</b>

\*: Los resultados se expresan como el número de plantas que resultaron infectadas sobre el total de plantas utilizadas en cada experimento. Se utilizaron diez áfidos por planta.

a: Sumatorio de los experimentos de transmisión.

**Tabla 3. Transmisiones por áfidos secuenciales**

Plantas infectadas con PVY-0 (NAT)			Plantas infectadas con PVY-1		
Transmisión control de Planta a Planta	Los áfidos tienen acceso previo a soluciones con:		Transmisión control de Planta a Planta	Los áfidos tienen acceso previo a soluciones con:	
	PVY-0 HC	PVY-N HC		PVY-0 HC	PVY-N HC
0/9 (*)	7/9		0/6	4/6	
0/4	8/8		0/4	3/4	
0/4	2/4		0/4	4/4	
0/9		5/9	0/9		8/9
0/9		6/9	0/9		7/9
0/4		4/4	0/6		6/6
			0/6		3/6
			0/4		3/4
<u>0/39</u>	<u>17/21</u>	<u>15/22 (a)</u>	<u>0/48</u>	<u>11/14</u>	<u>27/34</u>

\*: Los resultados se expresan como el número de plantas que resultaron infectadas sobre el total de plantas utilizadas en cada experimento. Se utilizaron diez áfidos por planta.

a: Sumatorio de los experimentos de transmisión.

**Tabla 4. Experimentos de transmisión que caracterizan preliminarmente al aislado PVY-C31 como un posible deficiente en HC.**

Transmisiones		Exptº. 1	Exptº. 2	Exptº. 3
<u>Planta a planta</u>	Planta donante infectada con:			
	PVY-C31	0/5 (*)	0/5	0/10
	PVY-0	5/5	5/5	
	PVY-0 (NAT)	0/5	0/5	
<u>Secuenciales</u>				
Los áfidos tienen acceso previo a soluciones con:	Planta donante infectada con:			
PVY-0 HC-Pro	PVY-0 (NAT)	5/5		
PVY-0 HC-Pro	PVY-C31	4/10		
PVY-C31 HC-Pro	PVY-0 (NAT)			0/10

\*: Los resultados se expresan como el número de plantas infectadas sobre el total de plantas utilizadas. Se utilizaron diez áfidos por planta de ensayo.

## **II.6- ANEXO**

## **Método de purificación de potyvirus de Murphy**

1. Homogenizar a 4°C triturando en una batidora el tejido vegetal en tampón 0.5M KPO<sub>4</sub>, pH 7.5 (relación 1.5 ml de tampón/g de tejido), con 0.01M NaDIECA y 0.5% de ácido tioglicólico, añadidos en el momento de uso.

2. Añadir cloroformo a 4°C (1 volumen/g de tejido) y homogenizar 1 minuto adicional.

3. Centrifugar 15 min a 7000 rpm en rotor GSA (Sorvall).

4. Recoger la fase acuosa sin cloroformo. Añadir NaCl hasta 0.25M y PEG 8000 hasta el 4%. Agitar 1 hora a 4°C.

5. Centrifugar 15 min a 7000 rpm en rotor GSA.

6. El sedimento se resuspende en 0.1M KPO<sub>4</sub>, pH7, 1M urea. (1ml/1-2 g de tejido inicial). Añadir Tritón X-100 hasta el 1% y agitar 1 hora.

7. Centrifugar 15 min a 7000 rpm en rotor GSA.

8. El sobrenadante se coloca sobre un colchón de sacarosa del 30% en tampón Tris-ClH 0.02M, pH 7.5, 1mM EDTA (Tampón C).

9. Centrifugar 1 hora a 45.000 rpm en rotor 60Ti (Beckman).

10. El sedimento se resuspende en 8 ml de tampón C. Asegurarse de que la resuspensión es completa. Si no, centrifugar para clarificar. Añadir 0.23 g de CsSO<sub>4</sub>/ml de resuspendido. Colocar la fracción sobrenadante sobre un colchón de 0.8 ml de 53% CsSO<sub>4</sub> (5.3 g CsSO<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>O hasta 4.7 ml) en tubos de rotor SW 50.1.

11. Centrifugar 16 horas a 32.000 rpm en rotor SW50.1 (Beckman).

12. Recoger con una jeringa la banda de virus. Diluir en 8 ml de tampón C.

13. Centrifugar 1 hora a 45.000 rpm en rotor 50-65Ti (Beckman).

14. Resuspender el sedimento en tampón C (0.5 ó 1 ml).

## **Método de purificación de virus de Moghal y Francki**

1. Se homogenizan a 4°C las hojas triturando en una batidora con 2 volúmenes de tampón borato 0.05M, pH 8, conteniendo un 0.15% de ácido tioglicólico, medio volumen de cloroformo, y otro medio de tetracloruro de carbono. Todo enfriado a 4°C.
2. Se centrifuga 10 min a 8000 g en rotor GSA.
3. La fase acuosa se filtra por papel Whatman N°4. Se añaden PEG 6000 y NaCl hasta el 4 y el 1.75% (p/v) respectivamente. Se agita la muestra 15 min y se deja reposar una hora a 4°C.
4. Se centrifuga 10 min a 8000 g en rotor GSA.
5. Se resuspende el sedimento en tampón borato 0.5M, pH 8 (1/5 del volumen original), mediante agitación suave unas dos horas.
6. Se centrifuga 10 min a 8000g para clarificar.
7. Se centrifuga el sobrenadante 75 min a 78.000 g en rotor S-30 (Beckman).
8. El sedimento se resuspende suavemente en tampón borato 0.05M, pH 8 con 0.005M EDTA. Se repite el paso 7 de nuevo y se resuspende el virus en tampón borato 0.05M, pH 8 (1ml/ 50 g de tejido inicial). Se coloca la muestra sobre un gradiente 10-40% de sacarosa en tampón borato 0.05M pH 8.
9. Se centrifuga 3 horas a 24.000 rpm en rotor SW-27 (Beckman).
10. Se recoge la banda de virus con un fraccionador ISCO. La muestra se dializa toda la noche (ON) contra tampón borato 0.05M, pH 8 y se concentra por centrifugación 90 min. a 78.000 g en rotor S-30. Se resuspende el virus en tampón borato 0.05M.

## **Método de purificación de la proteína HC-Pro de Thornbury et al., (1985).**

**Tampones y soluciones.** Todos los tampones deben estar a 4°C antes de su uso, y se debe trabajar a 4°C ó en hielo durante todo el proceso de purificación.

**A.** Tampón de extracción: 0.1M acetato amónico, pH 8.8, 0.02M Na<sub>2</sub>EDTA, 0.02M NaDIECA, este último añadido en el momento a la solución.

**B.** Tampón de resuspensión (TSM): 0.1M Tris, 0.02M MgSO<sub>4</sub> pH 7.2, ajustado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

1. Se toman 100-150 g de hojas de tabaco que no muestren síntomas de senescencia. Retirar las nervaduras centrales y trocearlas (trozos de aprox. 4 cm<sup>2</sup>).

2. Infiltrar totalmente el tejido vegetal troceado con abundante tampón A en un Kitasato. Drenar el líquido y guardar un poco del mismo (100 ml para aprox. 100 g. de tejido fresco inicial) para el siguiente paso.

3. Homogenizar el tejido infiltrado triturándolo en una batidora a máxima velocidad un minuto, con los 100 ml de tampón A.

4. Filtrar por 4 capas de gasa

5. Centrifugar 15 min a 8000 g en rotor GSA.

6. Filtrar el sobrenadante por "Miracloth" ó similar

7. Centrifugar 1 hora a 40.000 rpm en rotor 45 Ti.

8. Filtrar sobrenadante por "Miracloth" y añadir PEG 6000 hasta una concentración final del 8%. Agitar en hielo 1 hora.

9. Centrifugar 15 min a 8000 g en rotor GSA.

10. Resuspender totalmente el sedimento en tampón TSM (1/10 del volumen obtenido en la centrifugación a alta velocidad).

11. Centrifugar 15 min a 8000 g en rotor SS-34.

12. El sobrenadante se pasa por una columna de DEAE celulosa de unos 20 cc, equilibrada en TSM. Recoger la fracción eluída.

13. Añadir PEG 6000 hasta el 8%, y agitar sobre hielo 1 hora.

14. Centrifugar 10 min a 10.000 rpm en rotor SS-34.

15. Colocar el sobrenadante sobre un gradiente lineal de sacarosa del 5 al 15% en TSM, en tubos de rotor SW 27, 2-2.5 ml por tubo.

16. Centrifugar 16-18 horas a 26000 rpm en rotor SW-27.

17. Recoger los picos previos al de la rubisco con un fraccionador de gradiente ISCO.

18. Añadir PEG 6000 hasta el 8%, y agitar 1 hora sobre hielo

**19. Centrifugar a 10.000 rpm en rotor SS-34.**

**20. Resuspender el sedimento en 0.5-1 ml de TSM.**

**Fig. 10 A:** Gradiente de densidad de sacarosa del 10 al 40% obtenido en la purificación de las partículas virales de PVY siguiendo a **Moghal y Francki**. **B:** Gradiente de sulfato de cesio obtenido en la purificación de las partículas virales de PVY siguiendo a **Murphy**. **BV**, banda de virus.

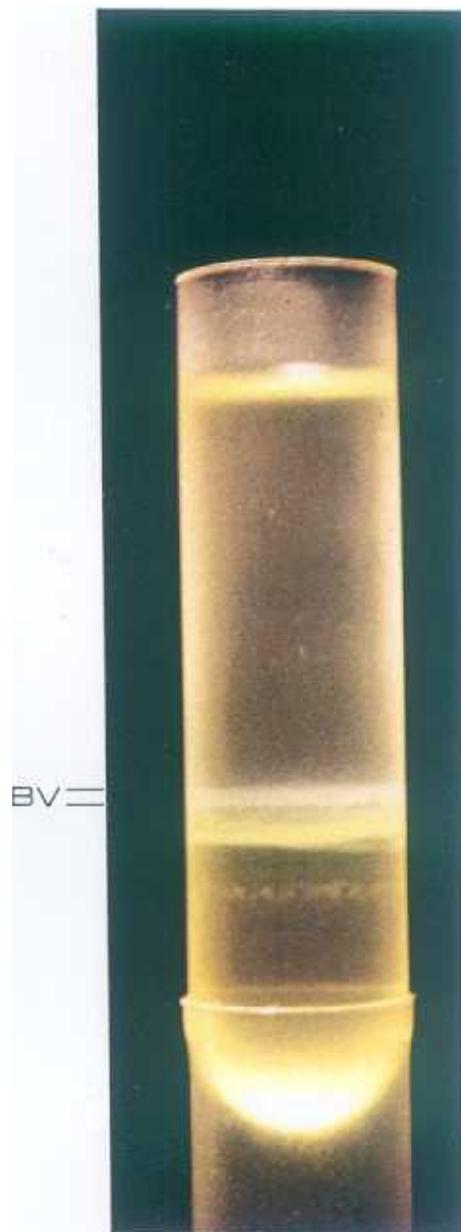
**Fig. 11 A:** Gradiente de densidad de sacarosa del 5 al 15% correspondiente a una purificación de HC-Pro de PVY. **B:** En un fraccionador ISCO se recogen los picos de OD<sub>280</sub> (F1) previos al de la rubisco (F2). **C:** Análisis en SDS-PAGE de alícuotas obtenidas durante la purificación de HC-Pro a partir de: A, planta sana. B, planta infectada con PVY-0. C, planta infectada con PVY-1. **A1, B1, C1:** Fracciones previas al gradiente de sacarosa. **A2, B2, C2:** Fracciones correspondientes a los picos del gradiente previos al de la rubisco. **A3, B3, C3:** Fracciones correspondientes al pico de la rubisco.

Fig. 10

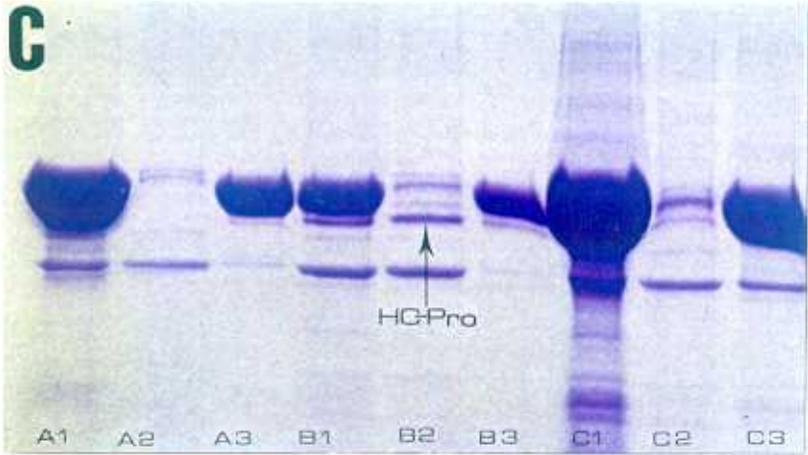
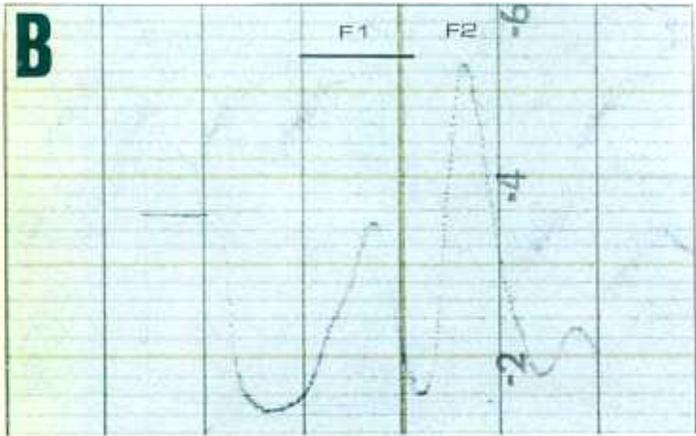
**A**



**B**



**Fig.11**



### **III- CAPITULO TERCERO**

**Análisis de las secuencias de los componentes "helper" de tres aislados del virus Y de la patata,  
dos de ellos no transmisibles por áfidos**

### III.1- INTRODUCCION

Se conocen hasta la fecha más de catorce secuencias nucleotídicas de genes de la proteína componente "helper" de potyvirus, y las de aminoácidos que de ellas se derivan. Algunas de estas secuencias corresponden a aislados virales transmisibles por áfidos, y cuatro, a aislados que han sido caracterizados como no transmisibles cuyos componentes "helper" no son funcionalmente activos: El virus C de la patata, PVC (Govier y Kassanis, 1974), un aislado del virus del mosaico del nabo (TuMoV 31), que presenta además una CP no funcional en transmisión (Sako, 1980), y dos aislados del virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV, aislados E15-PAT y R5A-PAT) (Granier et al., 1993).

Un análisis comparativo de la secuencia aminoacídica del HC-Pro de PVC con las de otros potyvirus transmisibles por áfidos permitió determinar la presencia de dos posiciones con residuos exclusivos de este aislado, sugiriéndose que alguno de ellos sería la causa de la falta de actividad biológica de su HC-Pro en transmisión (Thornbury et al., 1990). Mediante mutagénesis dirigida, se analizó el efecto de cada una de estas sustituciones sobre un clon completo de un aislado transmisible por áfidos del virus del moteado de las venas del tabaco TVMV, capaz de producir transcritos infectivos. Se encontró que sólo una de dichas sustituciones (K→E), situada dentro de un agrupamiento de cisteínas del extremo amino del HC-Pro que está estrictamente conservado en todos los potyvirus, anulaba su funcionalidad para la transmisión. Sin embargo, a diferencia de lo observado en PVC, también se afectaba la acumulación de virus y la expresión de síntomas en planta. Además, mutantes con deleciones en el extremo amino del HC-Pro no eran viables en planta (Atreya et al., 1992a).

En base a estos resultados se discutió la posibilidad de que el agrupamiento de cisteínas, que presenta ciertas similitudes con motivos de dedos de zinc ("zinc finger"), estuviera implicado en la transmisión viral y en el mantenimiento del fenotipo infectivo del virus (Atreya et al., 1992; Atreya y Pirone,

1993). Curiosamente, en un estudio similar con el virus del grabado del tabaco TEV, mutantes con deleciones en el extremo amino del HC-Pro, obtenidos por mutagénesis dirigida, sí que fueron viables y pudieron infectar sistémicamente tabaco, aunque presentaron bajos niveles de acumulación de virus en planta, y sus componentes "helper" no parecieron ser funcionales en la transmisión por áfidos (Dolja et al., 1993).

Por otro lado, la comparación de las secuencias de aminoácidos del HC-Pro de los dos aislados de ZYMV no transmisibles R5A-PAT y E15-PAT con la correspondiente a un aislado transmisible del mismo virus, mostró que el aislado R5A-PAT presenta una única sustitución aminoacídica respecto del aislado transmisible, situada dentro del agrupamiento de cisteínas del extremo amino del HC-Pro, e idéntica a la que presenta PVC en la misma posición (K→E). El aislado E15-PAT presentó dos sustituciones, situadas en las regiones central y carboxilo del HC-Pro (Granier et al., 1993).

En relación al HC-Pro del aislado no transmisible TuMoV 31, se observaron seis diferencias aminoacídicas con respecto a la secuencia HC-Pro de un aislado transmisible del mismo virus, sugiriéndose que en alguna de estas diferencias radica la causa de la falta de actividad biológica de las preparaciones de HC-Pro purificado de este virus (Nakashima et al., 1993).

A medida que se conozcan y se comparen las secuencias de los componentes "helper" de más potyvirus en los que se haya estudiado su transmisión por áfidos se podrá avanzar en el conocimiento de las regiones de esta proteína que influyen específicamente en el proceso de transmisión, y en cómo afectan a las hipótesis actuales sobre la actuación del HC-Pro. En este capítulo se presentan y comparan las secuencias nucleotídicas de los genes codificantes del HC-Pro de tres aislados de PVY, dos de ellos caracterizados previamente como no transmisibles, y con defectos diferentes en dicha proteína.

## **III.2- MATERIALES Y METODOS**

### **III.2.1- Aislados virales, propagación y purificación**

Los aislados virales utilizados, su propagación y su purificación se han descrito en los puntos II.2.1 y II.2.2 del Capítulo II.

### **III.2.2- Síntesis y clonaje de los cDNAs**

Se preparó DNA complementario (cDNA) a partir de virus purificado mediante transcripción reversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR):

**Desnaturalización de la muestra.** 1 µg de virus purificado se trató con Tritón X-100 al 1% durante 10 min a 70°C, añadiéndose posteriormente 10U de RNAsín y 2-ME hasta 0.02N.

**Transcripción reversa.** La muestra desnaturalizada se adicionó con el cebador específico correspondiente C1 o C6, (Fig. 1) hasta 7,5 mM, 25 µM de cada dNTP y 1U de transcriptasa reversa de AMV, en un volumen final de 20 µl y en tampón Tris-ClH 50mM pH 8,9, 50mM KCl, 7,5 mM Mg Cl<sub>2</sub>. La reacción se desarrolló incubando la muestra durante 45 min a 42°C.

**Amplificación de secuencias.** Para la amplificación por PCR, la muestra procedente de la transcripción reversa se adicionó con los cebadores correspondientes a 0.5 µM, con los cuatro dNTPs a 0.25 mM y con 2 unidades de AmpliTaq DNA polimerasa (Perkin Elmer Cetus), llevándose a un volumen final de 100 µl ajustados a 100 mM Tris-ClH pH 8.3, 0.5M KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, y BSA a 2mg/ml.

La PCR se realizó sometiendo la muestra a un programa de ciclos en un termociclador Perkin-Elmer

cetus, Gene Amp PCR System 9600, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron los cebadores C1 y C2 para amplificar la secuencia del RNA viral que codifica la región amino del HC-Pro, y los cebadores C5 y C6 para amplificar la secuencia que codifica la región carboxilo (Fig. 1). En ambos casos el protocolo de amplificación fué el siguiente: 5 min a 95°C, seguidos de 10 ciclos de 1 min a 92°C, 1 min a 45°C, 1 min a 72°C y 30 ciclos de 1 min a 92°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72°C.

El DNA amplificado se digirió con las enzimas de restricción Eco RI y Hind III y el fragmento resultante se separó por tamaños en un gel de agarosa al 0,8%, eluyéndose e insertándose en plásmidos pUC18 o pT3T7 digeridos con enzimas de restricción Eco RI y Hind III (Sambrook et al., 1989), con los que se transformaron bacterias *E. coli* variedad Sure (Stratagene).

### **III.2.3- Método de determinación de la secuencia nucleotídica**

La secuenciación del DNA clonado se hizo siguiendo el método de terminación de cadena (Sanger et al., 1977), con deazanucleótidos ("DEAZA G/A T7 Sequencing mixes") de Pharmacia, y utilizando entre dos y cuatro clones que contenían los plásmidos recombinantes por región analizada. Se utilizaron cebadores específicos del plásmido además de los cebadores C3, C4 y C7 (Fig. 1).

Secuencias de especial interés fueron determinadas adicionalmente, mediante secuenciación directa de DNA amplificado. En este caso se utilizó DNA amplificado obtenido en eventos de PCR distintos a los utilizados para el clonaje. 0,5 ng de DNA amplificado y purificado con una columna "Magic prep" de Promega, se secuenciaron con el "fmol TM DNA sequencing system" de Promega utilizando los cebadores C1, C3 o C7 (Fig. 1). Al método se le añadió un paso adicional consistente en incubar cada producto de la reacción de secuenciación con 3,6U de terminal transferasa (Boehringer-Mannheim) durante 30 min a 37°C (J.A. García, comunicación personal).

### **III.2.4- Análisis de secuencias**

Las secuencias se analizaron con el programa DNASTAR (DNASTAR Inc., U.K.). Las secuencias aminoacídicas deducidas se alinearon con las de otros potyvirus mediante el programa PILE UP CGC (Package Genetic Computer Group, Winsconsin University), una modificación del de Feng y Doolittle, (1987).

### **III.2.5- Perfiles de hidropatía**

Los perfiles de hidropatía del HC-Pro de los tres aislados de PVY se generaron con ayuda de un programa que determina la hidrofobicidad media de un segmento móvil de 8 aminoácidos para asignar un valor a cada residuo (Kyte y Doolittle, 1982).

## **III.3- RESULTADOS**

### **III.3.1- Secuencias nucleotídicas de los genes del HC-Pro de los aislados PVY-0, PVY-0 NAT y PVY-1**

El cDNA correspondiente a la región amino del HC-Pro se clonó para los tres aislados de PVY insertándolo en el plásmido pT3T7. El clonaje de la región carboxilo se hizo para los tres virus en dos eventos de transformación, en los que se utilizó cDNA procedente de PCRs distintas. En un caso se insertó en el plásmido pT3T7, y en el otro el plásmido pUC18. Muestras de cDNAs amplificados por PCR y utilizados en clonaje aparecen en la Fig. 2. Un esquema de la estrategia seguida en el proceso de secuenciación se muestra en la Fig. 3.

La secuencia completa (DNA) correspondiente a la región del RNA viral codificante del HC-Pro de

los tres aislados de PVY, que consta de 1368 nucleótidos, se muestra en la **Fig. 4**. Se detectaron tres variaciones puntuales de secuencia entre clones correspondientes a un mismo aislado, dos localizadas en la región amino (posiciones 1104 A,C para PVY-0, 1014 T,C para PVY-1) y una localizada en la región carboxilo (posición 2245 C,T para PVY-1). Estas variaciones podrían deberse a sustituciones y transversiones causadas por errores de copia durante la RT-PCR debidas, tanto a la baja temperatura de anillamiento de los 10 primeros ciclos de amplificación, como al elevado número de ciclos (40) (Gelfand y Sninsky, 1993). El nucleótido considerado correcto se obtuvo en los tres casos por secuenciación directa. Se confirmó también con la secuenciación de dos clones adicionales para las dos variaciones de la región amino, considerándose correcta la lectura mayoritaria, que coincidió con la obtenida en secuenciación directa. Para la variación de la región carboxilo no se dispuso de ningún clon adicional.

En las secuencias nucleotídicas así como en las aminoacídicas (**Figs. 4 y 5**), se ha seguido la numeración utilizada por Robaglia et al., (1989) para la secuencia del aislado PVY-N. El nivel de homología de secuencia en la región codificante del componente "helper" es muy elevado para los tres aislados, pero se han encontrado algunas sustituciones: La secuencia correspondiente al HC-Pro de PVY-0 NAT se diferencia de la del HC-Pro de PVY-0 en dos nucleótidos (1186, 1543) que se traducen en un único cambio aminoacídico (aminoácido 334, K→N). La secuencia correspondiente al HC-Pro de PVY-1 se diferencia de la del HC-Pro de PVY-0 en dos nucleótidos (1140, 2099), que se traducen en dos sustituciones aminoacídicas (aminoácido 319, G→D; aminoácido 639, S→G ).

### **III.3.2- Análisis comparativo de las secuencias del HC-Pro de los aislados PVY-0, PVY-0 NAT y PVY-1**

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos correspondientes a los componentes "helper" de los tres aislados secuenciados (PVY-0, PVY-0 NAT y PVY-1) con las de otros potyvirus: PVY-N

(Robaglia et al., 1989), PVY y PVC (Thornbury et al., 1990), PVY-H (Thole et al., 1993), PepMoV (Vance et al., 1992), TVMV (Domier et al., 1986), TEV (Allison et al., 1986) TuMoV 31 (Nakashima et al., 1993) y PPV (Maiss et al., 1989), se muestra en la Fig. 5. Las regiones de interés de los aislados de ZYMV E15-PAT, R5A-PAT y R5A-AT se alinearon manualmente según Granier et al., (1993).

Ocho aminoácidos estuvieron conservados y fueron exclusivos de los tres aislados ibéricos cuando se compararon con los demás aislados de PVY alineados (aminoácidos en posiciones 296, 335, 378 382, 383, 436, 440 y 512, señaladas con un asterisco) (Fig. 5).

Por otro lado, las sustituciones diferenciales de los componentes "helper" de PVY-0 NAT y de PVY-1 respecto del componente "helper" de PVY-0 fueron exclusivas de estos tres aislados, y no se observaron en ningún otro virus. En el caso de PVY-0 NAT, la sustitución K→N se localiza en una posición conservada en todas las secuencias de potyvirus comparadas, excepto en los virus con componentes "helper" no funcionales PVC y ZYMV R5A-PAT. Igualmente, la sustitución G→D observada en PVY-1 está situada en una posición conservada. En cambio, la sustitución S→G se encuentra en una posición de mayor variabilidad, aunque se conserva en todos los aislados de PVY comparados (Fig. 5).

De manera general, la similitud de secuencia entre los virus analizados es más elevada en el tercio de proteína HC-Pro situado en la región carboxilo terminal. El tercio amino presenta la mayor variabilidad, con la excepción del agrupamiento de cisteínas, que está estrictamente conservado. El porcentaje de homología de las secuencias de diferentes potyvirus alineadas en la Fig. 5 con la secuencia del HC-Pro de PVY-0 se muestra en la Fig. 6. El porcentaje de aminoácidos idénticos es igual o superior al 90% entre los aislados de PVY, aunque los aislados españoles están más próximos a PVC que a PVY-N, PVY o PVY-H. Con respecto a otros potyvirus, el grado de homología es muy

inferior (alrededor del 50%), siendo la más elevada la que hay con PepMoV (64%). A destacar que porcentajes de homología muy similares, promedios del 50% entre distintos potyvirus y del 90% entre aislados de un mismo virus, se han obtenido analizando secuencias de CP potyviraes (Shukla et al., 1988a).

### III.3.3- Perfiles de hidropatía

Los perfiles de hidrofobicidad de los componentes "helper" de los aislados PVY-0, PVY-0 NAT y PVY-1 muestran una proteína globalmente hidrofílica, con un mayor predominio hidrofílico en su región central. En la región amino, el agrupamiento de cisteínas se encuentra en un dominio hidrofóbico. El extremo final amino de la proteína presenta un marcado carácter hidrofílico. De las tres diferencias de secuencia observadas entre PVY-0 NAT y PVY-1 con PVY-0, sólo la situada en la posición 319 de PVY-1 altera significativamente el perfil de hidropatía generado por el programa (Fig. 7).

### III.4- DISCUSION

En la transmisión de potyvirus por áfidos están implicadas dos proteínas codificadas por el virus; la proteína de la cápsida viral y el componente "helper". La comparación de las secuencias de los componentes "helper" de los tres aislados españoles de PVY ha permitido determinar la existencia de tres sustituciones aminoacídicas puntuales en dos aislados caracterizados como no transmisibles por áfidos y con componentes "helper" defectuosos, respecto del aislado transmisible.

El HC-Pro del aislado PVY-0 NAT, que no es capaz de mediar la transmisión de su virus homólogo ni la de otros aislados de PVY, presenta una única diferencia aminoacídica respecto del HC-Pro del aislado PVY-0 (N en lugar de K). Esto sugiere que dicha sustitución es la causa de la deficiencia. Los

datos están en concordancia con los obtenidos en el análisis de las secuencias de los componentes "helper" de los aislados no transmisibles PVC y ZYMV R5A-PAT, y apoyan la sugerencia de que su falta de actividad biológica está causada por una sustitución en la misma posición que la observada en PVY-0 NAT (Thornbury et al., 1990; Atreya et al., 1992a; Granier et al., 1993).

La mutación en los componentes "helper" de PVC y del ZYMV R5A (K→E), implica un cambio de carga de positiva a negativa. Sin embargo, la sustitución K→N del HC-Pro de PVY-0 NAT implica el cambio de un aminoácido básico por uno sin carga y es bastante menos radical. Pero la presencia de un aminoácido fuertemente básico en esta posición es esencial para preservar la funcionalidad del HC-Pro de TVMV en la transmisión, y sustituciones de la lisina por aminoácidos neutros (Q) o incluso ligeramente básicos (H) anulan dicha funcionalidad (Atreya y Pirone, 1993).

Por otro lado, se desecha definitivamente la posibilidad de que la sustitución I→V de la posición 509 de PVC esté relacionada con la falta de transmisibilidad del virus (Thornbury et al., 1990), ya que los componentes "helper" de los tres aislados españoles secuenciados presentan dicha sustitución, con independencia de que sean o no transmisibles por áfidos.

El componente "helper" del aislado PVY-1 presenta dos sustituciones aminoacídicas con respecto al del aislado PVY-0. Una de ellas (G→D), se encuentra en una posición (aminoácido 319) cercana a la de las sustituciones de PVY-0 NAT, PVC y ZYMV R5A-PAT, también en el agrupamiento de cisteínas de la región amino, e implica un cambio de aminoácido no polar a otro cargado negativamente. Se trata de una posición absolutamente conservada en todas las secuencias de potyvirus conocidas, incluso en aquellos filogenéticamente más alejados, lo que sugiere que esta sustitución podría causar perturbaciones importantes en alguna actividad biológica de la proteína, y posiblemente en su funcionalidad en el proceso de transmisión por áfidos. La otra sustitución (S→G), está en la región carboxilo, en una posición menos conservada, y en este caso se sustituye un aminoácido

cargado negativamente por uno sin carga.

El HC-Pro del aislado PVY-1 no ha podido ser hasta el momento purificado y presenta un comportamiento electroforético característico. Se podría considerar si ambas propiedades están causadas por una única mutación puntual o si son el efecto de dos mutaciones. Los aislados del patotipo PVY-1 se diferencian de los aislados del patotipo PVY-0 en que los primeros son capaces de infectar sistémicamente pimiento var. Yolo Y (Gebre Selassie et al., 1985; Luis Arteaga, 1987). La secuenciación de otros aislados del patotipo PVY-1 transmisibles por áfidos para determinar si presentan alguna de las dos sustituciones observadas en el aislado PVY-1 no transmisible, especialmente la segunda (S→G), sería de interés. Caso de no presentarla, las secuencias aminoacídicas de los componentes "helper" de aislados caracterizados como PVY-1 o PVY-0 serían idénticas, y la proteína HC-Pro no jugaría ningún papel en esta especificidad de huésped.

La proteína HC-Pro, además de ser necesaria para la transmisión por áfidos del virus, es una tiol proteasa responsable del procesamiento proteolítico de su propio extremo carboxilo. El tercio carboxilo final de la proteína se ha relacionado con dicha actividad proteásica (Carrington et al., 1989). Esta región carboxilo de la proteína está altamente conservada.

En la región amino, más variable, destaca la conservación del agrupamiento de cisteínas (His-X-Cys-X<sub>8</sub>-Cys-X<sub>13</sub>-Cys-X<sub>4</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys). Según Robaglia et al., (1989), se trata de un motivo similar a los "zinc finger" de algunas proteínas que se unen a ácidos nucleicos y es un lugar potencial de unión a metales divalentes. Tanto PVC y ZYMV R5A-PAT como PVY-0 NAT y PVY-1, presentan mutaciones puntuales que afectan a este motivo. Es plausible que este agrupamiento de cisteínas tenga una relación directa con la funcionalidad del componente "helper" en la transmisión viral (Atreya et al., 1992). Sin embargo, existen dos aislados del ZYMV no transmisibles a causa de defectos en sus componentes "helper" que no presentan alteraciones en el agrupamiento de cisteínas de la región amino, sino en

otras regiones de la proteína: El aislado E15-PAT y un aislado de ZYMV con una alteración puntual en un triplete de aminoácidos de la región carboxilo del HC-Pro (PTK→PAK) (B. Raccach, comunicación personal). En este sentido, la funcionalidad de una proteína puede ser destruída por alteraciones conformacionales causadas por mutaciones en posiciones alejadas del dominio directamente implicado en dicha funcionalidad.

La mayoría de las mutaciones generadas *in vitro* en la región amino del HC-Pro de TVMV y de TEV afectan también a los niveles de acumulación del virus en la planta, y a los síntomas de infección (Dolja et al., 1993; Atreya y Pirone, 1993). Sin embargo, en los mutantes naturales conocidos de esta misma región (PVC, ZYMV E15-PAT y R5A-PAT, PVY-0 NAT y PVY-1), considerando también como tales a aquellos que pudieran haberse generado en el invernadero, la acumulación de virus en planta no parece verse afectada (Thornbury et al., 1990; Granier et al., 1993). Posiblemente es difícil que mutantes de transmisión en los que se afecte gravemente la acumulación viral en planta sean detectados como tales.

Finalmente, estos análisis comparativos resultan particularmente interesantes para el estudio del papel del HC-Pro en la transmisión de potyvirus por áfidos, especialmente aquellos en los que se detectan diferencias en las secuencias de aminoácidos de componentes "helper" de aislados de un mismo virus y que alteran la funcionalidad de la proteína en la transmisión.

### **III.5- FIGURAS**

**Fig. 1** Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados en el proceso de amplificación por RT-PCR, clonaje y secuenciación del HC-Pro. Las dianas de las enzimas de restricción aparecen en cursiva.

**Fig. 2 A:** Amplificación por RT-PCR de la secuencia que codifica la región amino del HC-Pro utilizando los cebadores C1 y C2. **B:** Amplificación por RT-PCR de la secuencia que codifica la región carboxilo del HC-Pro utilizando los cebadores C5 y C6. Amplificaciones a partir de virus purificado: PVY-0 (líneas 1, 6 y 9), PVY-0 NAT (líneas 2 y 10), PVY-1 (líneas 3 y 11), PVY-N (línea 4) y PPV 5.15 (línea 5). Línea 7, amplificación a partir de agua. Líneas 8 y 12, marcadores de tamaño.

**Fig. 3** Estrategia seguida en la secuenciación de los genes de los componentes "helper" de los aislados PVY-0, PVY-0 NAT y PVY-1.

**Fig. 4** Secuencias nucleotídicas (DNA) y aminoacídicas correspondientes a las regiones del RNA viral que codifican los componentes "helper" de PVY-0, PVY-0 NAT y PVY-1. Se muestra la secuencia para PVY-0. Las diferencias de secuencia observadas en los aislados PVY-0 NAT y PVY-1 se representan encima (aminoácidos) y debajo (nucleótidos).

**Fig. 5** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos correspondientes a componentes "helper" de los aislados PVY-0, PVY-0 NAT, PVY-1 y de otros potyvirus. Los aminoácidos conservados en todos los virus están indicados en cursiva en la parte inferior. Los aminoácidos en negrita han sido relacionadas con deficiencias en componentes "helper" de aislados no transmisibles. La posición de aminoácidos comunes a los tres aislados españoles, no presentes en otros aislados de PVY, está señalada con un asterisco (\*).

**Fig. 6** Porcentajes de homología de aminoácidos entre el HC-Pro de PVY-0 y los de otros virus alineados en la Fig. 4.

**Fig. 7** Perfiles de hidropatía de la proteína HC-Pro de los aislados PVY-0, PVY-0 NAT y PVY-1. Los valores negativos indican carácter hidrofílico. Valores positivos, carácter hidrofóbico. La flecha indica la única diferencia observada entre los tres perfiles.



**Fig. 3**

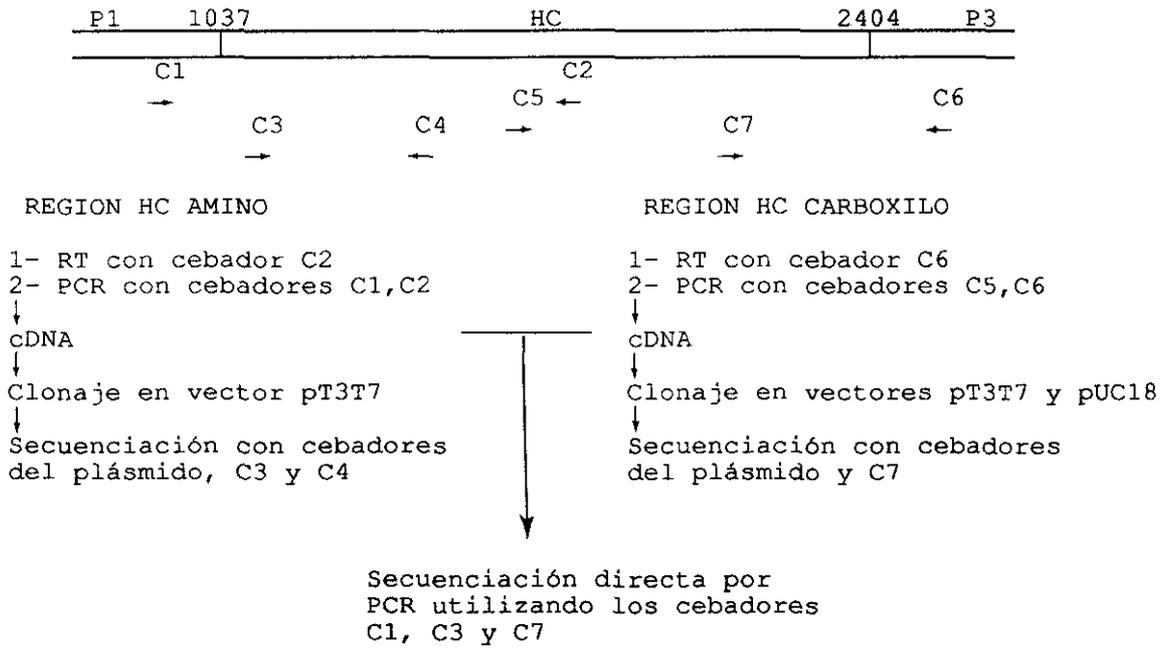






Fig. 5

283 \* \*  
**PVY-0** ..SNAENFWKGLDNNWARMRYPS.DHTCIAGL.PVEDCGRVAALMTHSILPCYKMTTCPTC  
**PVY-ONAT** ..SNAENFWKGLDNNWARMRYPS.DHTCIAGL.PVEDCGRVAALMTHSILPCYNMTCPTC  
**PVY-1** ..SNAENFWKGLDNNWARMRYPS.DHTCIAGL.PVEDCDRVAALMTHSILPCYKMTTCPTC  
**PVY-N** ..SNADNFWKGLDGNWARMRYPS.DHTCVAGL.PVEDCGRVAALMAHSILPCYKITCPTC  
 PVY ..SNADNFWKGLDGNWARMRYPS.DHTCVAGL.PVADCGRVAALTRHSILPCYKITCPTC  
 PVC ..SNAENFWKGLDNNWARMRYPS.DHTCIDGL.PVEDCGRVAALMTHSILPCYEITCPTC  
 PVYH ..SSAESFWEGLDGNWQMRYPT.DHTCVAGI.PVEDCGRVAAIMTHSILPCYKITCPTC  
 PepMoV ..STPEAFWSGLEKKWSVVRKPT.AHTCKPTY.SVSNCGEVAIIAQALFPCHKLTCGEC  
 TVMV ..STGDFWKGFNASFQEQAIGLDHTCTSD.L.PVEACGHVAALMCQSLFPCGKITCKRC  
 TEV ..SISEAFFIPYSKFFLELRPDGISHECTRGV.SVERCGEVAAILTQALSPCGKITCKRC  
 TuMV 31 ..SAAGANFWKGFDRCFLAYRSDNREHTCYSGLDVTECGEVAALMCLAMFPC~~E~~KITCPDC  
 PPV ..SDPGKQFSDGFTNSFMQCKLRETDHQCTSDLD.VKECGYVAALVCQAIIPCGKITCLOC  
 ZYMV E15-PAT DHVCKVD.HNNEECGELAAIFCQALFPVVKLSCQTC  
 ZYMV R5A-PAT DHVCKVD.HGNEECGELAAIFCQALFPVVELSCQTC  
 ZYMV R5A-AT DHVCKVD.HGNEECGELAAIFSQALFPVVKLSCQTC  
 F H C CG VAA PC K C C

343 \* \*\*  
**PVY-0** AQQYANLPTSDLFKLLHKHARDGLSRLGSDKDRFVHVSKFLETLEHLTEPVDLNLELFNE  
**PVY-ONAT** AQQYANLPTSDLFKLLHKHARDGLSRLGSDKDRFVHVSKFLETLEHLTEPVDLNLELFNE  
**PVY-1** AQQYANLPTSDLFKLLHKHARDGLSRLGSDKDRFVHVSKFLETLEHLTEPVDLNLELFNE  
**PVY-N** AQQYASLPVSDLFKLLHKHARDGLNRLGADKDRFIHVNKFLIALEHLTEPVDLNLELFNE  
 PVY AQQYASLPVSDLFKLLHKHARDGLNRLGADKDRFIHVNKFLNALEHLTEPVDLNLELFNE  
 PVC AQQYANLPASDLFKLLHKHARDGLSRLGSDKDRFVHVNKFLVALEHLTEPVDLNLELFNE  
 PVYH AQQYANLPASDLLKILHKHASDGLNRLGADKDRFVHVKKFLTILEHLTEPVDLSLEIFNE  
 PepMoV SKEICDLTNSNECVQELYKNTSLALERMNNLHPEFQHVIVKVLVSVRQLTEASNHGTTETFE  
 TVMV IANLSNLDFTFSELQDRAMRILDMRARFPSTHTIRFLHDLFTQRRVTNPNTAAFRE  
 TEV MVETPDIVEGESGESVTNQG.KLLAMLKEQYPDFPMAEKLLTRFLQOKSLVNTNLTACVS  
 TuMV 31 VTDSELSQQAQSGFSMKHRLIQLRDVIKSSYPFKHV.QILDREYQSLSSANENYQDFAE  
 PPV AQKYSYMSQQEIRDREFTVIEQHEKTVMDNYPQFHVLAFLKRYRELMRVENQNYEAFKD  
 F L

403 \* \*  
**PVY-0** IFKSIGEKQQAPFKNLNVLNFFLKGKENTAHWQMAQLSLELSRFQKNRTDNIKKGD I  
**PVY-ONAT** IFKSIGEKQQAPFKNLNVLNFFLKGKENTAHWQMAQLSLELSRFQKNRTDNIKKGD I  
**PVY-1** IFKSIGEKQQAPFKNLNVLNFFLKGKENTAHWQMAQLSLELSRFQKNRTDNIKKGD I  
**PVY-N** IFKSIGEKQQAPFKNLNVLNFFLKGKENTAHWQVAQLSLELARFQKNRTDNIKKGD I  
 PVY IFKSIGEKQQAPFKNLNVLNFFLKGKENTAHWQVAQLSLELARFQKNRTDNIKKGD I  
 PVC IFKSIGEKQQAPFKNLNVLNFFLKGKENTAHWQVAQLSLELARFQKNRTDNIKKGD I  
 PVYH VFKSIGEKQQSPFKNLNVLNFFLKGKENTAREWQVAQLSLELARFQKNRTDNIKKGD I  
 PepMoV IFKMIGSKTQSPFTHLNKLNFEFLKGNENTSGEWLTARQHLRELVRQKNRTDNIKKGD I  
 TVMV ILRLIGDRNEAPFAHVNRLEILLGSKANPDSLAKASDSLELARYLNNRTENIRNGSL  
 TEV VKQLIGDRKQAPFTHVLAVSEILFKGNKLTGADLEEASTHMLEIARFLNNRTENMRIGHL  
 TuMV 31 IQSISDQVEKAAFPHINKLNAILIKGATATGEEFSQATKHLEIARYLKNRTENIEKGS  
 PPV ITHMIGERKEAPFSHLNKINELIKGGMMSAQDYIEASDHLRELARYQKNRTENIRSGSI  
 ZYMV E15-PAT GSLVTQGEDDLA  
 ZYMV R5A-PAT GSLVTQDELDLA  
 ZYMV R5A-AT GSLVTQDELDLA  
 F G A E R NRT N G

463 \*  
**PVY-0** SFFRNKLSAKANWNLYLSCDNQLDKNANFLWGQREYHAKRFFSNFFEEVDPTKGSAYEI  
**PVY-ONAT** SFFRNKLSAKANWNLYLSCDNQLDKNANFLWGQREYHAKRFFSNFFEEVDPTKGSAYEI  
**PVY-1** SFFRNKLSAKANWNLYLSCDNQLDKNANFLWGQREYHAKRFFSNFFEEVDPTKGSAYEI  
**PVY-N** SFFRNKLSAKANWNLYLSCDNQLDKNANFLWGQREYHAKRFFSNFFEEIDPAKGSAYEI  
 PVY SFFRNKLSARANWNLYLSCDNQLDKNANFLWGQREYHAKRFFSNFFDEIDPAKGSAYEI  
 PVC SFFRNKLSAKANWNLYLSCDNQLDKNANFLWGQREYHAKRFFSNFFEEVDPAKGSAYEI  
 PVYH SFFRNKLSAKANWNLYLSCDNQLDKNANFLWGQREYHAKRFFSNYFEEIDPAKGSAYEN  
 PepMoV ASFRNKLSARAQYNLYLSCDNQLDKNASFLWGQREYHARRFFLNFFQQIDPSKGYLAVED  
 TVMV KHFRNKISSKAHVNALSCDNQLDQNGNFWGLAGIAAKRFLNNYFETIDPEQGYDKYVI  
 TEV GSFRNKISSKAHVNNALMCDNQLDQNGNFIWGLRGAAHAKRFLKGFTEIDPNEGDKYVI  
 TuMV 31 KSFRNKISSKAHINPTLMCDNQLDRNGNFIWGERGYHAKRFFSNYFEIIDPKKGYTQYET  
 PPV KAFRNKISSKAHVNMQLMCDNQLDTNGNFWVGQREYHAKRFFRNYFDVIDVSEGYRRHIV  
 FRNK S A N L CDNQLD N F WG A R F F D GY

523  
**PVY-0** RKHPNGTRKLSIGNLVVPLDLAEFRQRMKGDYRKQPGVSKKCTSSKDGNYVYPCCTTLD  
**PVY-ONAT** RKHPNGTRKLSIGNLVVPLDLAEFRQRMKGDYRKQPGVSKKCTSSKDGNYVYPCCTTLD  
**PVY-1** RKHPNGTRKLSIGNLVVPLDLAEFRQRMKGDYRKQPGVSKKCTSSKDGNYVYPCCTTLD  
**PVY-N** RKHPNGTRKLSIGNLVVPLDLAEFRQRMKGDYRKQPGVSKKCTSSKDGNYVYPCCTTLD  
 PVY RKHPNGTRKLSIGNLVVPLDLAEFRQRMKGDYRKQPGVSRKCTSSKDGNYVYPCCTTLD  
 PVC RLHPNGTRKLSIGNLVVPLDLAEFRQRMKGDYRKQPGVSKKCTSSKDGNYVYPCCTTLD  
 PVYH RLHPNGTRKLSIGNLVVPLDLAEFRQRMKGDYRKQPGVSKKCTSSKDGNYVYPCCTTLD  
 PepMoV RTIPNGSRKLAIGNLIVPLDLAEFRKRMNGIDTQQPPIGKYCTSQLDGNFVYPCCTTLD  
 TVMV RKNPNGERKLAIGNFIISTNLEKLRDQLEGESIARVGIITEECVSRKDGNYRYPCCCVTLE  
 TEV RKHIRGSRKLAIGNLIMSTDFQTLRQQIQGETIERKEIGNHCISMRNGNYVYPCCTTLE  
 TuMV 31 RAVPNGSRKLAIGKLIPTNFVLRQMKGEPEVYPTDECVSKLQGDVHACCCVTE  
 PPV RENRPGIRKLAIGNLVMSTNLALRKLQLLGEECIHFEVSKECTSKRGENFVYQCCCVTHE  
 R G C S C C C T

583  
**PVY-0** DGSAIESTFYPPTKKHLVIGNSGDQKYVDLPKGDSEMLYIAKQGYCYINFLAMLINVSE  
**PVY-ONAT** DGSAIESTFYPPTKKHLVIGNSGDQKYVDLPKGDSEMLYIAKQGYCYINFLAMLINVSE  
**PVY-1** DGSAIESTFYPPTKKHLVIGNSGDQKYVDLPKGDSEMLYIAKQGYCYINFLAMLINVGE  
**PVY-N** DGSAIESTFYPPTKKHLVIGNSGDQKYVDLPKGDSEMLYIAKQGYCYINFLAMLINISE  
 PVY DGSAIESTFYPPTKKHLVIGNSGDQKYVDLPKGDSEMLYIAKQGYCYINFLAMLINISE  
 PVC DGSAIESTFYPPTKKHLVIGNSGDQKYVDLPKGDSEMLYIAKQGYCYINFLAMLINVSE  
 PVYH DGSAVESTFYPPTKKHLVIGNSGDQKYVDLPKGNSEMLYIARQGFYINIFLAMLINISE  
 PepMoV DGQPIRSVAVYPTTKKHLVIGNSGDQKYVDLPKGDTEMLYIALDGYCYINIFLAMLINISE  
 TVMV DGSPMYSELKMPKTKKHLVIGNSGDQKYVDLPGEISNLMYIAKEGYCYINIFLAMLINVDE  
 TEV DGKAQYSDLKHPKTKRHLVIGNSGDQKYVDLPVLEEKMYIANEGYCYMNIFALLVNVKE  
 TuMV 31 SGDPVLSIEMKPTKTKKHLVIGNSGDQKYVDLPVLEEKMYIANEGYCYINIFLAMLINVKE  
 PPV DGTPLSEIISPTKTKKHLVIGNSGDQKYVDLPVLEEKMYIANEGYCYINIFLAMLININE  
 ZYMV E15-PAT PAK  
 ZYMV R5A-PAT PTK  
 ZYMV R5A-AT PTK  
 G S PTK HLV GN GD KY LP IA G CY N A L N E

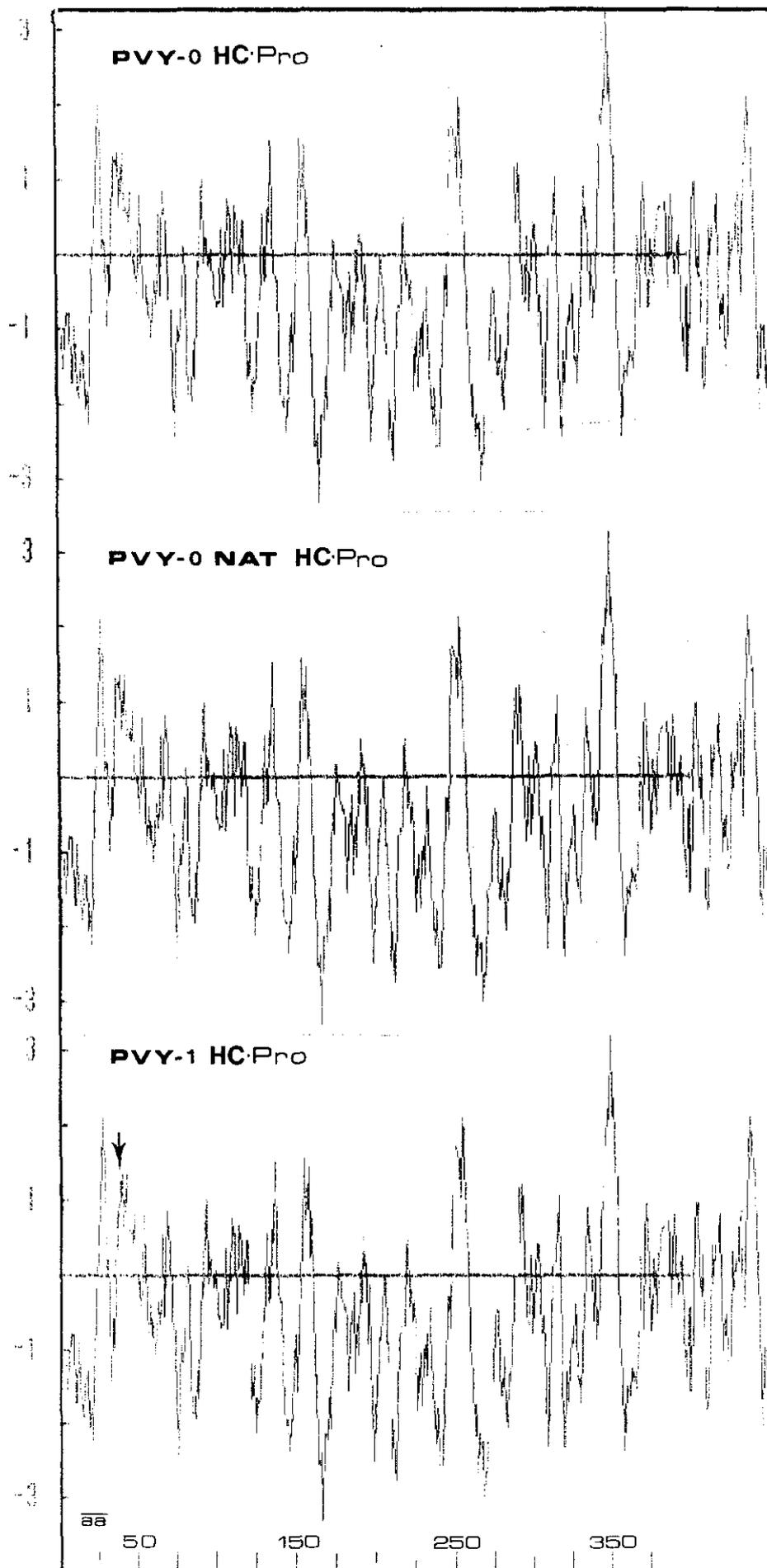
643  
**PVY-0** EDADKFTKKVRDMCVPKLGWPTMMDLATTCQMRIFYPDVHDAELPRILVDHDTQTCHV  
**PVY-ONAT** EDADKFTKKVRDMCVPKLGWPTMMDLATTCQMRIFYPDVHDAELPRILVDHDTQTCHV  
**PVY-1** EDADKFTKKVRDMCVPKLGWPTMMDLATTCQMRIFYPDVHDAELPRILVDHDTQTCHV  
**PVY-N** EDADKFTKKVRDMCVPKLGWPTMMDLATTCQMRIFYPDVHDAELPRILVDHDTQTCHV  
 PVY EDADKFTKKVRDMCVPKLGWPTMMDLATTCQMRIFYPDVHDAELPRILVDHDTQTCHV  
 PVC EDADKFTKKVRDMCVPKLGWPTMMDLATTCQMRIFYPDVHDAELPRILVDHDTQTCHV  
 PVYH EDADKFTKKVRDMCVPKLGWPTMMDLATTCQMRIFYPDVHDAELPRILVDHDTQTCHV  
 PepMoV EEAKDFTKKVRDFMPKLGKWPFLMDLATTCQMRIFYPDVHDAELPRILVDHDTQTCHV  
 TVMV ANAKDFTKKVRDESQKLGKWPFLMDLATTCQMRIFYPDVHDAELPRILVDHDTQTCHV  
 TEV EDADKFTKFIKIRDTIVPKLGAWPTMMDLATTCQMRIFYPDVHDAELPRILVDHDTQTCHV  
 TuMV 31 SQAKEFTKVVDRDKLVGELGKWPFLMDLATTCQMRIFYPDVHDAELPRILVDHDTQTCHV  
 PPV DEAKSFTKTVRDTLVPKLGWPTMMDLATTCQMRIFYPDVHDAELPRILVDHDTQTCHV  
 AK FTK RD LG WP D AT C P AELPR LVDH HV

703  
**PVY-0** VDSFGSQTTGYHILKASSVSQLILFANDELESDIKHYRVGG..  
**PVY-ONAT** VDSFGSQTTGYHILKASSVSQLILFANDELESDIKHYRVGG..  
**PVY-1** VDSFGSQTTGYHILKASSVSQLILFANDELESDIKHYRVGG..  
**PVY-N** VDSFGSQTTGYHILKASSVSQLILFANDELESDIKHYRVGG..  
 PVY VDSFGSQTTGYHILKASSVSQLILFANDELESDIKHYRVGG..  
 PVC VDSFGSQTTGYHILKASSVSQLILFANDELESEIKHYRVGG..  
 PVYH VDSFGSQTTGYHILKASSVSQLILFANDELESDIKHYRVGG..  
 PepMoV VDSYGSISTGYHILKAATVSQLVLFADDNLESEIKHYRVGG..  
 TVMV VDSYGSINTGYHILKANTVSQLKFASTLESPMAQYKVG..  
 TEV LDSYGSRTTGYHMLKMNNTSQLIEFVHSGLESEMKTYNVGG..  
 TuMV 31 VDSYGSLSSTGYHVLKNTVEQLIKFTRCNLESSLKHRYVGG..  
 PPV VDSYGSLSSTGYHVLKANTINQLISFASDTLDSNMKTYLVGG..  
 DS GS TG H LK QL F L S Y VGG

Fig. 6

HC	PVY-ONAT	PVY-1	PVC	PVY-N	PVY	PVY-H	PepMoV	TVMV	PPV	TuMV31	TEV
PVY-0	99,7	99,5	97,3	95,8	95,4	89,9	63,6	52,7	47,9	47,7	46,8

Fig. 7



#### **IV- CAPITULO CUARTO**

**Producción y caracterización de un anticuerpo policlonal y de anticuerpos monoclonales contra el componente "helper" del virus Y de la patata.**

#### **IV.1- INTRODUCCION**

El genoma de los potyvirus codifica una única poliproteína que se procesa proteolíticamente para generar los productos proteicos finales (Riechmann et al., 1992).

La mayoría de los métodos serológicos de detección de infección viral en planta se basan en la acumulación de virus que tiene lugar en la planta infectada, y por tanto en las propiedades inmunogénicas de la CP. Sin embargo, la organización genética de los potyvirus permitiría la producción de cantidades equimoleculares de cada proteína viral, aunque la regulación "in vivo" del procesamiento de la poliproteína viral no se conoce bien todavía. De hecho, los potyvirus inducen la formación de cuerpos de inclusión en la célula vegetal que están relacionados con proteínas virales no estructurales. Una de estas proteínas forma las inclusiones cilíndricas citoplasmáticas, que están presentes en todos los miembros del género y constituyen un criterio de clasificación taxonómica (Edwarson, J.R. 1992). Asimismo, algunos potyvirus, entre ellos PVY, inducen la acumulación de inclusiones amorfas en el citoplasma de las células infectadas, que han sido relacionadas serológicamente con la proteína HC-Pro (De Mejía et al., 1985, Baunoch et al., 1990).

Diferentes anticuerpos monoclonales (Mabs) contra proteínas no estructurales de potyvirus han sido ya descritos (Jordan, R. 1992; Purcifull et al., 1992). La producción y caracterización de Mabs contra HC-Pro purificado de PVY permitirá su utilización en el estudio de las características de esta proteína. Asimismo, el empleo de estos Mabs, conocida la variabilidad existente en las poblaciones de virus vegetales, y en particular en el Género Potyvirus, permitirá utilizarlos en la detección de infección viral y en la caracterización y diferenciación de aislados.

## **IV.2- MATERIALES Y METODOS**

### **IV.2.1- Preparación de inmunógenos**

Los aislados virales PVY-0 y PVY-0 NAT son los descritos en el punto II.2.1. El aislado PVY<sup>N</sup> C3 fué suministrado por G. Rose, Agricultural Scientific Services, East Craigs, Edinburgh, Scotland. El aislado del virus A de la patata (potato virus A, PVA) y el aislado PVY<sup>N</sup> PEI fueron suministrados por R. Stace-Smith, Agriculture Canada, Vancouver Research Station, Canada. Los aislados PVY<sup>N</sup> 10, 18, 19, 20, 21, 25, 33, 36, 37, 54 PVY<sup>o</sup> 5, 17, 49, 50 y PVY<sup>c</sup> 31 fueron suministrados por G. Adams, Biologische Bundesanstalt, Braunschweig, Alemania. Los aislados de PepMoV y de TEV fueron suministrados por R. Christie, Universidad de Florida, Gainesville, Florida, USA. El aislado PPV-5.15 fué suministrado por M. Cambra, del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias de Valencia, España.

Los virus fueron mecánicamente inoculados y propagados en *N. tabacum* cv. Xanthi nc, excepto PPV que lo fué en *N. benthamiana*. Plantas sistémicamente infectadas, a los 15-25 días postinoculación fueron utilizadas para los diferentes ensayos serológicos. La proteína HC-Pro fué purificada como describen Thornbury et al., (1985) (punto II.2.3) a partir de plantas infectadas con el aislado PVY-0 o PVY-0 NAT, con las siguientes modificaciones: Se omitió la columna de DEAE celulosa y todos los tampones y soluciones utilizados en los diferentes pasos del proceso purificación contuvieron 20 mM EDTA.

### **IV.2.2- Producción de un anticuerpo policlonal contra el HC-Pro de PVY**

En el procedimiento de elaboración de un suero policlonal contra el HC-Pro de PVY (HC-Pab), los conejos New Zealand fueron inyectados intramuscularmente cuatro veces a intervalos de dos semanas

utilizando como antígeno proteína HC-Pro del aislado PVY-0, electroeluída de geles de acrilamida (Rodríguez M.D., 1986). En la primera inyección, 0.5 ml del producto de elución (aprox. 0.5 mg de proteína) fueron emulsionados con 0.5 ml de adyuvante completo de Freund. En las tres inyecciones siguientes se utilizaron 0.5 ml de muestra emulsionados con igual cantidad de adyuvante incompleto de Freund.

Para lograr un antisuero libre de anticuerpos que reaccionaran con proteínas distintas al HC-Pro, presentes en planta infectada con PVY, el suero obtenido fué inmunoabsorbido con las proteínas totales de un extracto de tabaco Xanthi no sano (Ball, E.M., 1990), y las IgGs séricas fueron purificadas con una columna de afinidad de proteína A-Sepharosa (Pharmacia).

#### **IV.2.3- Producción de hibridomas e isotipaje**

Para su inmunización, hembras de seis semanas de ratón bab/c fueron inyectadas intraperitonealmente (IP) con 150 µl de HC-Pro de PVY-0 NAT purificado por gradiente (aproximadamente 1 µg/µl de proteína HC-Pro), sin adyuvante. Para las siguientes inyecciones, todas IP, se utilizaron 100 µl de la misma muestra de HC purificado. Los ratones inmunizados fueron sacrificados mediante asfixia con CO<sub>2</sub> y sus bazo extraídos asépticamente. Los linfocitos del bazo se fusionaron con células de mieloma FOX-NY (Hyclone laboratories) (Ellis y Wieczorek, 1992). Las líneas de hibridomas productoras de anticuerpos contra la proteína HC-Pro de PVY se detectaron y seleccionaron mediante ELISA Indirecto y ELISA DASÍ (Converse y Martin, 1992). En ELISA Indirecto, las placas se tapizaron durante toda la noche (ON) a 4°C con el sobrenadante de un extracto de hojas de plantas de tabaco sistémicamente infectadas con el aislado PVY-0 NAT preparado en tampón sodio-carbonato pH 9.6 (1/10 p/v) y clarificado durante 10 min a 10.000 rpm en un rotor SS-34. Como control negativo se repitió el mismo ensayo de ELISA indirecto utilizando un extracto preparado a partir de planta sana. En ELISA DASÍ, las placas se tapizaron ON a 4°C con el anticuerpo HC-Pab (1 µg/ml)

y se incubaron después con extracto de planta infectada preparado en PBS conteniendo un 0.1% de Tween y un 0.3% de leche desnatada. Los siguientes pasos fueron similares para ambos ensayos: Sobrenadantes del medio de cultivo de hibridomas, diluídos 1:1 hasta 100 µl en PBS conteniendo un 0.2% de Tween-20 y un 0.6% de leche desnatada se incubaron durante 2 horas a 30°C. Los Mabs se detectaron con un anticuerpo de cabra antiratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma). Como sustrato se añadió paranitrofenilfosfato, y la absorbancia se midió a 405 nm (OD<sub>405</sub>). Las líneas secretantes de anticuerpos así identificadas se clonaron dos veces consecutivas por dilución límite. Las subclases de isotipos se determinaron mediante ELISA DAS usando un Kit de subisotipaje de hibridomas (Calbiochem, Behring Diagnostics).

Seis líneas de hibridomas productoras de anticuerpos monoclonales contra el HC-Pro de PVY-0 NAT (HC-Mabs) fueron inoculadas intraperitonealmente en ratones Balb/c para la producción masiva de anticuerpos en líquido ascítico.

#### **IV.2.4- Reactividad de los HC-Mabs y del HC-Pab con los componentes "helper" de PVY y de otros potyvirus**

La batería de seis anticuerpos monoclonales seleccionados contra el HC-Pro de PVY-0 NAT se analizó en ELISA Indirecto usando extractos de plantas infectadas con diferentes aislados de PVY y con otros virus del género.

Por otro lado, se analizaron comparativamente los valores de absorbancia obtenidos en ELISA Indirecto por los extractos de seis hojas consecutivas de una misma planta infectada con PVY-0. Quince plantas, inoculadas entre 20 y 40 días antes del ensayo, fueron analizadas en cuatro tests independientes. Se utilizaron las mismas cantidades de tejido fresco por hoja (0.1 g/ml).

Se estudió, además, la funcionalidad de algunos de estos HC-Mabs en el sistema ELISA DAS, para lo cual estos anticuerpos fueron biotinizados (Kendall et al., 1983).

Los extractos de planta infectada se prepararon en PBS (1/10 p/v) y se clarificaron mediante centrifugaciones a bajas revoluciones (5000 rpm 1 min en microfuga Eppendorf), diluyéndose 1:1 en tampón sodio-carbonato pH 9.6 para ELISA Indirecto, ó en PBS con 0.2% Tween-20 y 0.6% de leche desnatada para ELISA DAS. Se estudió el efecto que la clarificación del extracto a altas revoluciones (50.000 rpm 1 hora en rotor Ti65), en lugar de a bajas revoluciones, tenía sobre las lecturas de absorvancia obtenidas en ambos tipos de ELISA.

En ELISA Indirecto, tras el tapizado de las placas ON a 4°C con el extracto, éstas se incubaron durante 2 horas a 30°C con líquido ascético correspondiente a cada HC-Mab, diluídos a 1/2000 en PBS con 0.1% Tween-20 y con 0.3% de leche desnatada, o con el HC-Pab diluído a 1µg/ml. Como segundo anticuerpo se utilizó en el caso de los monoclonales, un anticuerpo de cabra antiratón conjugado con fosfatasa alcalina o con peroxidasa (Sigma). En el caso del anticuerpo HC-Pab, se utilizó un anticuerpo de cabra anticonejo conjugado con peroxidasa (Nordic Immunology).

En ELISA DAS, se tapizaron las placas ON a 4°C con líquido ascético a una dilución 1/2000 en tampón sodio-carbonato. Posteriormente se incubaron con el extracto de planta durante 2 horas a 30°C, y seguidamente con el anticuerpo monoclonal conjugado con biotina diluído a 1µg/ml otras 2 horas a 30°C, ambos en PBS con 0.1% Tween-20 y con 0.3% de leche desnatada. Finalmente las placas se incubaron con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (Sigma) (1µg/ml en PBS) durante 30 min a temperatura ambiente.

Cuando se utilizó fosfatasa alcalina, se añadió como sustrato paranitrofenilfosfato, y la absorvancia se midió a 405 nm ( $OD_{405}$ ). Cuando se utilizó peroxidasa de rábano, se añadió como sustrato OPD y

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y la absorbancia se midió a 492 nm (OD<sub>492</sub>) (Kendall et al., 1983).

Los distintos métodos de ELISA utilizados aparecen esquematizados en la **Fig. 1**.

#### **IV.2.5- Análisis por inmunoelectrotransferencia**

Preparaciones de HC-Pro purificado de PVY y extractos obtenidos a partir de planta infectada se analizaron en Western blot (II.2.6). Los extractos de planta se prepararon en tampón Tris-CIH 0.625 M, pH 6.8 con SDS al 2% y 2-ME al 1% (v/v).

### **IV.3- RESULTADOS**

#### **IV.3.1- Producción de un anticuerpo policlonal y de anticuerpos monoclonales contra el HC-Pro de PVY**

Se comprobó inicialmente que algunas inmunoglobulinas del antisuero policlonal contra el HC-Pro de PVY-0 reconocían a proteínas de planta. Este efecto desapareció tras su inmuoabsorción con proteínas totales de planta sana, que eliminaron estas inmunoglobulinas. Tras la purificación de las IgGs séricas, la dilución de trabajo se estableció en 1/500, tanto para ELISA como para Western blot.

Para la obtención de HC-Mabs, los bazos de tres ratones, con los que se siguieron diferentes protocolos de inmunización, se utilizaron en tres eventos de fusión independientes (**Tabla 1**). En los aproximadamente 12.000 pocillos de hibridomas testados, un total de 12 líneas de hibridomas fueron identificadas como elaboradoras de anticuerpos específicos contra el HC-Pro de PVY. De éstas, 10 fueron clonadas por dilución límite y sus isotipos caracterizados (**Tabla 2**).

Tanto en ELISA DASI como Indirecto, los 10 Mabs reaccionaron con extracto de planta infectada así como con preparaciones de HC-Pro purificado. No reaccionaron en cambio con extracto de planta sana (Tabla 2).

#### **IV.3.2- Reactividad de los HC-Mabs y del HC-Pab con el componente "helper" de PVY y de otros potyvirus**

Las lecturas de absorvancia que dieron extractos de distintas hojas dentro de una misma planta infectada con PVY-0 en ELISA Indirecto con el Mab 8B3, mostraron un incremento en las mismas de las hojas más jóvenes a las más viejas (Fig. 2), hasta la aparición de síntomas de senescencia en la hoja, a partir de los cuales la lectura disminuía.

Los dos Mabs utilizados en ELISA DAS, 1B1 y 8B9, funcionaron satisfactoriamente (Fig. 3). Cuando se analizaron extractos de diferentes hojas dentro de una misma planta sometidos a centrifugación a bajas o a altas revoluciones, los valores de absorvancia obtenidos fueron similares, tanto en ELISA Indirecto como en ELISA DAS (Fig. 3).

En ELISA Indirecto, usando líquido ascítico de las seis líneas de hibridomas seleccionadas y el antisuero policlonal, ninguna de estas líneas ni tampoco el HC-Pab reaccionaron con extractos de plantas infectadas con PVA o con los aislados de TEV. Tampoco reconocieron a un aislado de PPV (resultado no mostrado). Un Mab, 1A11, reconoció positivamente el HC-Pro de todos los aislados de PVY y sólo a un aislado de PepMoV. El HC-Pab reconoció al HC-Pro de todos los aislados de PVY y al de un aislado de PepMoV. Otro Mab, 8E1, reconoció positivamente el HC-Pro de todos los aislados del grupo PVY<sup>o</sup> y PVY<sup>c</sup> pero no el de los del grupo N. Tres Mabs, 5B10, 1B1 y 8B3, diferenciaron un subgrupo dentro del grupo PVY<sup>N</sup>. Estas diferencias en los reconocimientos de los distintos Mabs permiten relacionar a los aislados españoles PVY-0 y PVY-0 NAT con uno de los

subgrupos dentro de PVY° (Tabla 3).

#### IV.3.3- Análisis por inmunoelectrotransferencia

En el análisis por "Western blot" de HC-Pro de PVY-0 purificado o de extractos de plantas infectadas con el mismo virus, siete de los diez HC-Mabs y el Pab reconocieron una banda de 50 kDa de peso aparente, junto con algunas otras bandas minoritarias, que no estaban presentes en fracciones equivalentes de planta sana. El tamaño se corresponde con el esperado de la proteína HC-Pro (Thornbury et al., 1990) (Fig. 4). Los Mabs 2C6, 7E7 y 8E1 no reconocieron el HC-Pro ni ninguna otra proteína.

En un análisis por "Western blot" utilizando los HC-Mabs 1B1, 3G5, 1A11 y el HC-Pab, los tres Mabs así como el HC-Pab reconocieron a la proteína HC-Pro de PVY-0. (Fig. 4). El Mab 1A11 reconoció al HC-Pro de PVY y de PepMoV, pero no de TEV ni de PPV (Fig. 4).

#### IV.4- DISCUSION

La obtención de diez anticuerpos monoclonales así como la de un antisuero policlonal que reconocen específicamente el componente "helper" de PVY en los tipos de ELISA más utilizados para la detección de infección viral, puede ser útil en la profundización del estudio del HC-Pro, así como en la diferenciación de aislados potyviraes basándose en las características serológicas de proteínas virales no estructurales. Estos anticuerpos han sido herramientas fundamentales en los estudios presentados en los Capítulos II y V de esta tesis

Proteínas no estructurales como el HC-Pro, pueden ser importantes en la taxonomía del género Potyvirus, como ya se ha sugerido (Jordan, 1992). En este estudio hemos mostrado que Mabs

preparados usando el HC-Pro de PVY son útiles tanto para pruebas de especificidad de virus como para diferenciar los grupos común (PVY<sup>o</sup>) y de necrosis en venas (PVY<sup>N</sup>), así como subgrupos dentro de éstos. Esta capacidad de discriminación entre aislados de PVY cuyos componentes "helper" presentan homologías de secuencia de aminoácidos que posiblemente alcancen el 90%, indica que se pueden realizar distinciones serológicas en base a diferencias de pocos aminoácidos. Esta es una situación similar a la que se observa en la CP de PVY, en la que se basa la detección y diferenciación serológica de este virus (Van der Vlugt et al., 1993).

Además de su valor taxonómico, estos anticuerpos pueden tener gran utilidad en la detección de infección. Aunque los Mabs contra la CP de PVY han probado su valor para la detección, así como para la identificación de aislados de PVY (Ellis et al., 1992), ocasionalmente han presentado problemas para la correcta identificación de algunas cepas de PVY en tests de certificación de patata (McDonald et al., en prensa). Por otro lado, estos Mabs pueden ayudar a establecer relaciones filogenéticas entre los distintos miembros del Género Potyvirus. Así de entre los virus analizados, PepMoV parece ser el que está serológicamente más cerca de PVY, en concordancia con la relativamente elevada homología (64%) que la secuencia de aminoácidos del HC-Pro de un aislado secuenciado de este virus presenta con la del HC-Pro de PVY (III.3.2), aunque se trata de un aislado diferente a los utilizados en este capítulo, y con datos publicados (De Mejía et al., 1985b; Purcifull et al., 1992; Van der Vlugt et al., 1993).

Hemos comprobado que hojas inferiores de planta infectada con PVY que aún no muestren síntomas de senescencia dan mejores lecturas en ELISA indirecto que hojas superiores. Este dato está en concordancia con lo observado en un análisis similar por Western blot y con las cinéticas de acumulación de HC en hoja (Capítulo II, Figs. 8 y 9), utilizando el HC-Pab. Por otra parte, estos son los resultados esperados si se asume que se produce una acumulación de proteína no estructural a lo largo de la vida de la hoja.

Sin embargo, el incremento en las medidas del ELISA Indirecto con la edad de la hoja no sería el resultado de la mera acumulación de HC en forma de inclusiones insolubles. Los sobrenadantes de centrifugaciones de extractos de planta infectada a altas revoluciones (en los que las inclusiones insolubles precipitarían) o a bajas revoluciones dan en ambos casos unos patrones de lectura muy similares, sugiriendo que éstos corresponden posiblemente sólo a HC-Pro soluble o solubilizable durante el proceso de extracción.

El HC-Pro soluble estaría agregado o presentaría algún tipo de interacción que permitiera la existencia de al menos dos epítopos idénticos por molécula, dado que los sobrenadantes de centrifugación a altas revoluciones pueden ser utilizados en ELISA DAS. Estos resultados concuerdan con los de estudios cromatográficos previos (Govier et al., 1977; Thornbury et al., 1985). Sin embargo, la interacción podría ser inespecífica y estar causada bien por el procedimiento de extracción, o bien durante la incubación de las placas.

#### **IV.5- FIGURAS**

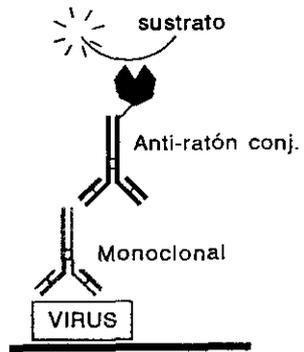
**Fig. 1** Modalidades de ELISA.

**Fig. 2** Lecturas de ELISA indirecto de extractos de hojas consecutivas (hojas 1 a 6, de superior a inferior) de cuatro plantas de tabaco infectado con PVY-0 (plantas A, B, C y D), usando el Mab 8B3.

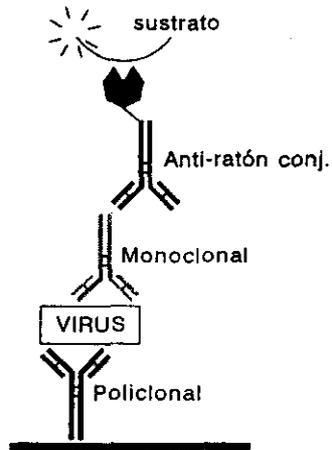
**Fig. 3** Lecturas de ELISA DAS (A,C) e indirecto (B,D), usando el Mab 1B1, de extractos de hojas consecutivas (hojas 1 a 6, de superior a inferior) de una planta de tabaco infectada con PVY-0, sometidos a clarificación por centrifugación en alta (A,B) ó en baja (C,D). Cada punto representa la media de absorvancia de cuatro pocillos.

**Fig. 4** Inmunoelectrotransferencia ("Western blot") de extractos de plantas infectadas con: PVY-0 (líneas 1, 3, 5 y 7), PPV (línea 8), PepMoV (línea 9) y TEV (línea 10). Línea 6, HC-Pro purificado de PVY-0. Línea 11, extracto de tabaco sano. Líneas 2 y 4, marcadores de tamaño (Bio-Rad) Se utilizó el anticuerpo HC-Pab (línea 1 y 2) y los anticuerpos monoclonales 1B1 (línea 3), 3G5 (línea 5) y 1A11 (líneas 6 a 11).

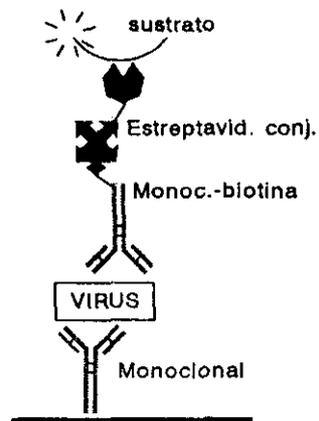
Fig. 1



ELISA indirecto (antígeno sobre la placa)

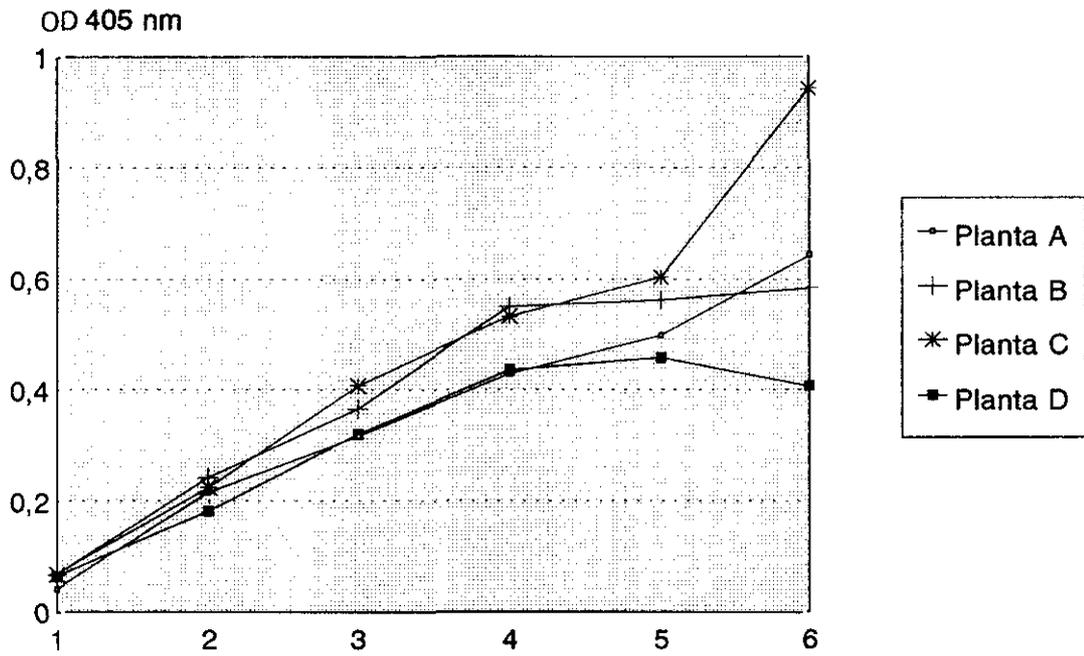


ELISA-DASI (captura con policlonal e indirecto)



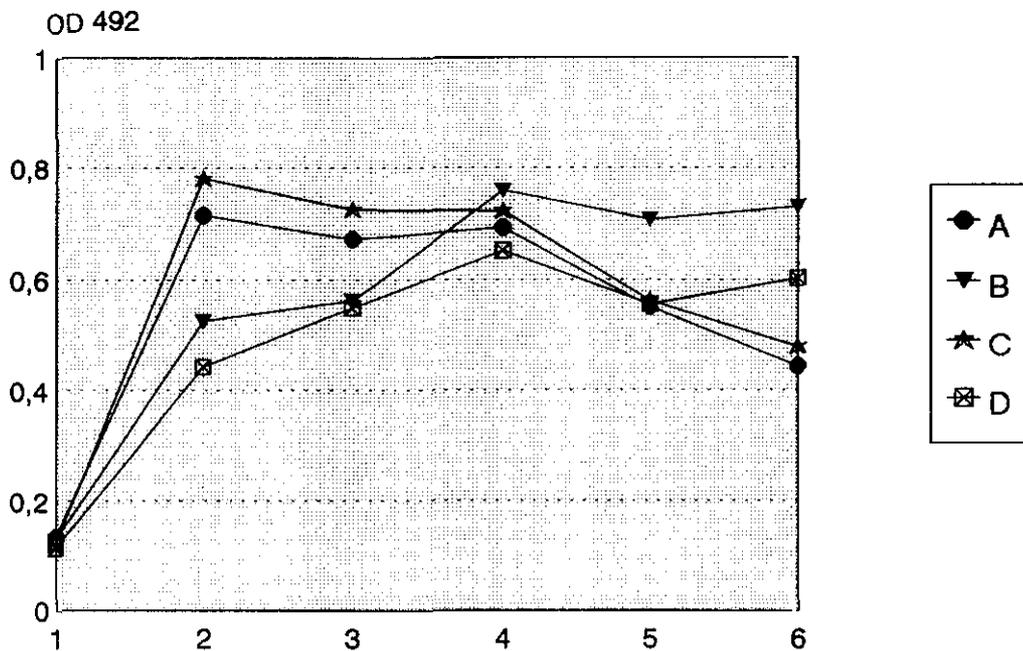
ELISA-DAS con anticuerpos monoclonales

Fig. 2



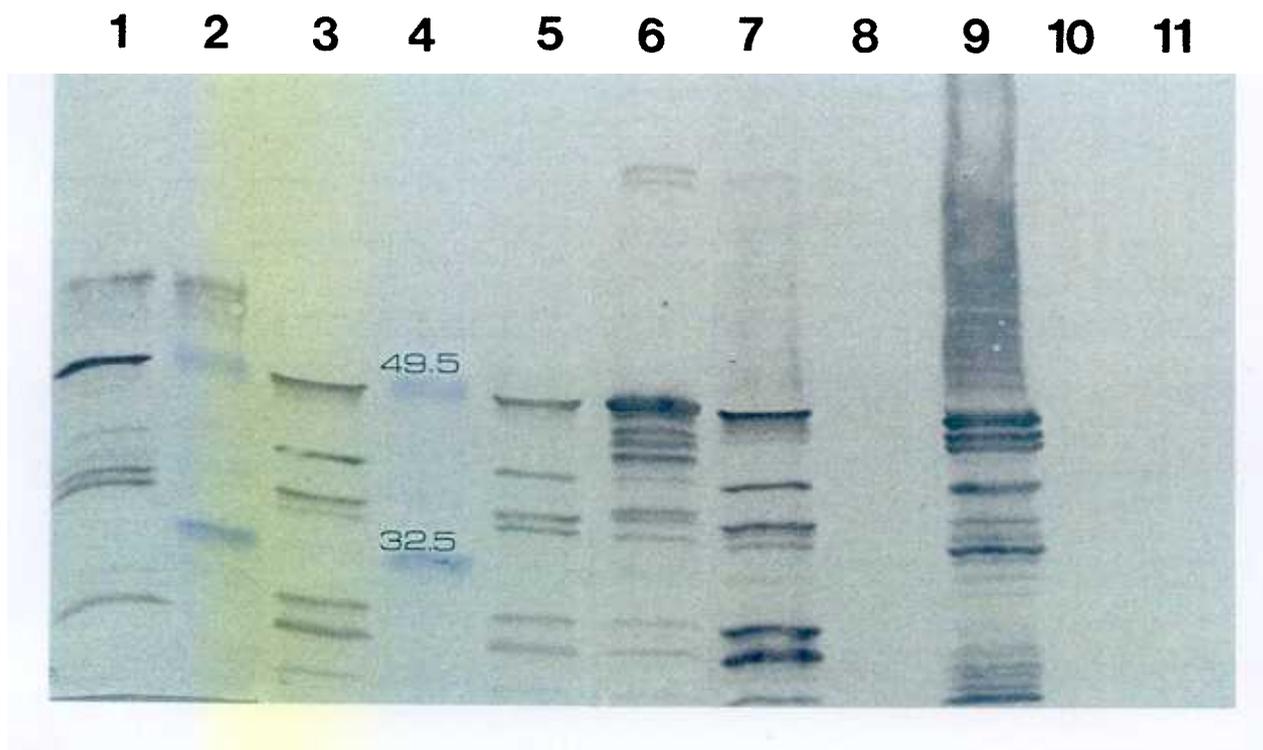
Números 1 a 6, hojas superiores a inferiores respectivamente

Fig. 3



Números 1 a 6, hojas superiores a inferiores respectivamente

Fig. 4



**Tabla 1.** Protocolos de inmunización seguidos en la obtención de anticuerpos monoclonales de ratón contra el componente "helper" de PVY

	primera inyección	segunda inyección	tercera inyección	inyección de recuerdo	FUSION	líneas +/total
1ª FUSION	día 0	día 16	no	no	día 27	6/8000
2ª FUSION	día 0	día 21	no	día 41	día 46	3/2000
3ª FUSION	día 0	día 16	día 39	día 61	día 69	3/2000

**Tabla 2.** Características de los anticuerpos monoclonales obtenidos contra el componente "helper" de PVY

Nombre	Subclase	ELISA Indirecto *	ELISA DASI *	Western blot **	ELISA DAS *	Producción de l. ascítico
F1 / 1B1	IgG 3	+	+	+	+	+
F1 / 2C6	IgM	+	+	-		
F1 / 3G5	IgM	+	+	+		
F1 / 5B10	IgG 1	+	+	+		+
F1 / 8B3	IgG 1	+	+	+		+
F1 / 8B9	IgG 1	+	+	+	+	+
F2 / 1A11	IgM	+	+	+		+
F2 / 7E7	IgG 1	+	+	-		
F3 / 7G7	IgG 1	+	+	+		
F3 / 8E1	IgG 1	+	+	-		+

\*: +, la media de las lecturas obtenidas con tres extractos de tabaco infectado con PVY-0 NAT al menos triplica la media de las obtenidas con tres extractos de tabaco sano

\*\* : +, implica una reacción visible con un sustrato precipitable

**Tabla 3. Inmunoreactividad de seis Mabs contra la proteína HC-Pro de PVY en ensayos con extractos de plantas infectadas con PVY y con otros potyvirus**

Virus	ELISA Indirecto (a,b) usando:						
	Anticuerpos monoclonales						
	5B10	1B1	8E1	1A11	8B3	8B9	Pab
<b>Potato virus A</b>							
PVA-CAN	0.032	0.022	0.022	0.028	0.022	0.026	0.068
<b>Tobacco etch virus</b>							
TEV-AF	0.026	0.020	0.022	0.029	0.020	0.023	0.030
TEV-TN	0.022	0.020	0.020	0.022	0.019	0.021	0.020
<b>Pepper mottle virus</b>							
PepMoV-FL	0.043	0.026	0.031	<b>0.429</b>	0.025	0.026	0.243
PepMoV-M	0.046	0.029	0.034	<b>0.537</b>	0.028	0.031	<b>0.624</b>
<b>Potato virus Y</b>							
PVYN-C3	0.057	0.026	0.030	<b>0.206</b>	0.032	<b>0.221</b>	<b>0.549</b>
PVYN-10	0.048	0.044	0.028	<b>0.251</b>	0.039	<b>0.293</b>	<b>0.769</b>
PVYN-18	0.069	0.095	0.033	<b>0.276</b>	0.042	<b>0.715</b>	<b>0.947</b>
PVYN-21	0.063	0.084	0.033	<b>0.304</b>	0.075	<b>0.787</b>	<b>1.284</b>
PVYN-25	0.051	0.042	0.029	<b>0.272</b>	0.052	<b>0.487</b>	<b>1.062</b>
PVYN-33	0.077	0.054	0.027	<b>0.262</b>	0.067	<b>0.629</b>	<b>0.879</b>
PVYN-54	0.072	0.057	0.036	<b>0.243</b>	0.063	<b>0.408</b>	<b>0.860</b>
PVYN-PEI	0.094	0.076	0.037	<b>0.334</b>	0.078	<b>0.727</b>	<b>1.709</b>
PVYN-19	<b>0.440</b>	<b>0.467</b>	0.053	<b>0.238</b>	<b>0.460</b>	<b>2.080</b>	<b>2.361</b>
PVYN-20	<b>0.266</b>	<b>0.254</b>	0.060	<b>0.258</b>	<b>0.752</b>	<b>1.657</b>	<b>2.085</b>
PVYN-36	<b>0.477</b>	<b>0.324</b>	0.044	<b>0.348</b>	<b>0.450</b>	<b>1.921</b>	<b>2.214</b>
PVYN-37	<b>0.296</b>	<b>0.260</b>	0.035	<b>0.226</b>	<b>0.254</b>	<b>1.132</b>	<b>1.290</b>
PVYO-BC	<b>0.753</b>	0.028	<b>0.271</b>	<b>0.946</b>	<b>0.284</b>	<b>0.169</b>	<b>0.881</b>
PVYO-17	<b>1.368</b>	0.031	<b>0.559</b>	<b>1.574</b>	<b>0.739</b>	<b>0.423</b>	<b>1.302</b>
PVYO-49	<b>0.764</b>	0.027	<b>0.227</b>	<b>0.840</b>	<b>0.264</b>	<b>0.181</b>	<b>0.872</b>
PVYO-50	<b>0.863</b>	0.072	<b>0.318</b>	<b>1.957</b>	<b>0.409</b>	<b>0.485</b>	<b>1.342</b>
PVYO-NC78	<b>0.742</b>	<b>0.192</b>	<b>0.283</b>	<b>0.508</b>	<b>0.245</b>	<b>0.616</b>	<b>2.001</b>
PVYO-NC138	<b>1.281</b>	<b>0.616</b>	<b>2.486</b>	<b>2.939</b>	<b>1.209</b>	<b>2.359</b>	<b>2.912</b>
PVYO-5	<b>1.035</b>	<b>0.889</b>	<b>0.764</b>	<b>1.906</b>	<b>0.437</b>	<b>1.193</b>	<b>1.182</b>
PVY-0	<b>0.929</b>	<b>1.059</b>	<b>0.806</b>	<b>2.602</b>	<b>0.411</b>	<b>1.331</b>	<b>1.398</b>
PVY-0 NAT	<b>1.145</b>	<b>1.300</b>	<b>1.223</b>	<b>2.450</b>	<b>0.575</b>	<b>1.605</b>	<b>1.454</b>
PVYC-31	<b>1.153</b>	<b>1.070</b>	<b>0.286</b>	<b>2.885</b>	<b>0.587</b>	<b>2.070</b>	<b>1.390</b>
Controles sanos <sup>c</sup>	0.037	0.035	0.029	0.061	0.032	0.024	0.133

a: Lectura de ELISA ( $OD_{405}$ ) después de una incubación del sustrato de 3 horas a 30°C. Cada cifra representa la media de cuatro tests.

b: Las cifras en negrita indican tests positivos: Valores medios mayores o iguales a tres veces la media de cuatro controles sanos. Los valores menores a esta cifra (tests negativos) se expresan en notación normal.

c: Valor medio de cuatro tests usando tabaco sano.

## **V- CAPITULO QUINTO**

**Algunas propiedades moleculares del componente "helper" del virus Y de la patata. Análisis electroforético y cromatográfico**

## **V.1- INTRODUCCION**

El carácter proteico y soluble del componente "helper" funcional en transmisión fué establecido por Govier et al., (1977) y por Pirone, (1977). Al analizar preparaciones semipurificadas mediante Cromatografía de Exclusión (Sephadex G-200), la actividad "helper", estimada en experimentos de transmisión, se encontró en eluidos correspondientes a pesos moleculares comprendidos entre 100 y 300 kDa (Govier et al., 1977). En un análisis posterior mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC), Thornbury et al., (1985) localizaron la actividad "helper" en eluidos correspondientes a pesos moleculares de 100 a 150 kDa, por lo que sugirieron que las moléculas de proteína activa eran dímeros solubles de la forma monomérica.

Se presenta un estudio electroforético y cromatográfico del HC-Pro del virus Y de la patata (PVY), en el que se ha apreciado la posible existencia de dos tipos de interacciones en los que intervendría esta proteína. También se ha comprobado el efecto que la presencia de diversos agentes químicos tiene sobre la transmisión viral mediada por áfidos.

## **V.2- MATERIALES Y METODOS**

### **V.2.1- Aislados virales y purificación del HC-Pro**

Los aislados virales empleados (PVY-0, PVY-0 NAT, PVY-1 y PVY-N) y su propagación se describen en el punto II.2.1. El HC-Pro del aislado PVY-0 fué purificado de planta infectada siguiendo el método de Thornbury et al., (1985), con algunas modificaciones (punto IV.2.1).

### **V.2.2- Análisis por inmunoelectrotransferencia del HC-Pro en preparaciones purificadas y en extractos de hoja**

Preparaciones de HC-Pro purificado y extractos de plantas de tabaco infectadas con PVY se analizaron electroforéticamente en geles discontinuos de SDS-PAGE de gradiente (4,5% gel concentrador, gradiente 5-15% gel separador) (Laemmli et al., 1975), seguido de inmunoelectrotransferencia ("Western blot") a membranas de nitrocelulosa (Towbin et al., 1979), utilizando el anticuerpo HC-Pab (punto II.2.6).

Los extractos de planta se prepararon macerando tejido de hoja fresca (1/10 p/v), en tampón de Laemmli (Tris-ClH 0.625M pH 6.8, 1% 2-ME, 2% SDS), o en tampón Tris-ClH 0.625M pH 6.8. Los extractos se clarificaron a 50.000 rpm durante 1 hora en un rotor Ty 65 (Beckman) a 4°C. Se tomaron alícuotas que se adicionaron con SDS hasta el 2% (v/v) y 2-ME hasta el 1% (v/v), si estos agentes no estaba ya incluidos en el tampón de extracción, y posteriormente con glicerol hasta el 10%. Finalmente se calentaron durante 5 min a 100°C.

### **V.2.3- Análisis por FPLC del HC-Pro en preparaciones purificadas y en extractos de hoja**

Las proteínas de muestras de HC-Pro purificado, así como las de extractos de planta de tabaco infectado con PVY fueron separadas por tamaños mediante FPLC (Fast Permeation Liquid Chromatography) usando una columna Superose 12 de Pharmacia. Se analizaron muestras de 100µl a una velocidad de elución de 0.3 ml/min. Los pesos moleculares correspondientes a cada tiempo de elución se estimaron comparándolos con los tiempos de elución de proteínas de peso molecular conocido: catalasa bovina, aldolasa, albumina de suero bovino y albúmina de huevo (Serva), con pesos moleculares respectivos de 240, 160, 66 y 45 kDa respectivamente. Como tampón de elución se utilizó TSM (Tris-sulfúrico 0.1M, 0.02M MgSO<sub>4</sub> pH 7.2). Las preparaciones de HC-Pro purificado se

analizaron sin diluir. Las muestras de extractos de planta infectada se prepararon macerando tejido fresco de hoja (1/10 p/v) en TSM, y clarificando el extracto durante 1 hora a 50.000 rpm en un rotor Ty65.

La separación en tamaños de ambos tipos de muestra (HC-Pro purificado y extracto de planta infectada) se realizó también incorporando un agente reductor de grupos sulfidrilo en el tampón de elución (TSM con ditioneitol 0.01M, DTT). En este caso, el extracto de planta se preparó también en TSM con DTT 0.01M.

Los elúdos obtenidos en la cromatografía se analizaron por SDS-PAGE seguido de inmunoelectrotransferencia ("Western blot") utilizando el HC-Mab 1A11 y un anticuerpo de cabra antiratón conjugado con peroxidasa (Sigma). La reacción se desarrolló por ECL siguiendo las instrucciones del fabricante (Amersham). Las bandas obtenidas se analizaron densitométricamente con ayuda del programa ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA. ).

#### **V.2.4- Transmisión por áfidos de virus con ayuda de preparaciones de HC-Pro tratadas con diferentes agentes químicos**

La susceptibilidad de la actividad biológica del HC-Pro a la presencia de diferentes agentes químicos se analizó en experimentos de transmisión por áfidos mediante adquisiciones a través de membranas y secuenciales, que se describen en el punto II.2.5.

En los experimentos de transmisión mediante adquisiciones a través de membranas, las soluciones conteniendo HC-Pro y virus purificados, ambos de PVY-0, se mantuvieron durante 15 min a temperatura ambiente con diferentes agentes, a concentraciones determinadas, antes de dar acceso a los áfidos a la solución.

En las transmisiones secuenciales, la solución conteniendo HC-Pro purificado de PVY-0 se mantuvo con diferentes agentes químicos durante 15 min a temperatura ambiente antes de dar acceso a los áfidos a la solución.

### **V.3- RESULTADOS**

#### **V.3.1- Análisis por inmunoelectrotransferencia del HC-Pro en preparaciones purificadas y en extractos de hoja**

Al analizar mediante SDS-PAGE seguido de inmunoelectrotransferencia extractos de plantas de tabaco infectado con PVY, preparados con dos tampones de extracción diferentes, la proteína HC-Pro generó dos patrones de bandas distintos: Si en la preparación del extracto se utilizaba un tampón Tris-ClH y el SDS y el 2-ME eran adicionados al extracto con posterioridad, aparecían varias bandas con pesos moleculares desde 100 kDa hasta más de 200 kDa que eran reconocidas por anticuerpos específicos del HC-Pro, además de la banda de 50 kDa correspondiente a la proteína monomérica (**Fig. 1A**). Sin embargo, si se utilizaba como tampón de extracción el tampón de Laemmli, sólo se detectaba la banda de 50 kDa (**Fig. 1B**). Siguiendo ambos procedimientos de extracción aparecían, junto a las bandas ya descritas, otras de pesos moleculares menores de 50 kDa, que posiblemente corresponden a HC-Pro degradado.

Se observó que el HC-Pro del aislado PVY-1 generaba un patrón de bandas específico y diferente del de los demás aislados analizados (**Fig. 1A**).

En nuestra experiencia, la inclusión de 2-ME en el tampón de extracción tuvo como efecto el que la proteína HC-Pro se detectara en "Western blot" como una banda mayoritaria de 50 kDa (**Fig. 2**). En un proceso de extracción llevado a cabo de forma paralela sin la presencia de este agente reductor,

diferentes bandas con pesos moleculares desde 100 kDa hasta más de 200 kDa fueron detectadas por anticuerpos específicos contra el HC-Pro en "Western blot", además de la banda de 50 kDa (Fig. 2). La presencia en el tampón de extracción de SDS o de Urea no evitaba la aparición de estas bandas adicionales (Fig. 2).

Los resultados permiten apreciar que la ausencia en el tampón de extracción del agente reductor 2-ME es la causa de que en el análisis por "Western blot" de extractos de planta infectada, anticuerpos específicos contra el HC-Pro reconozcan estas bandas proteicas adicionales con pesos moleculares superiores a 50 kDa.

Por otro lado, las preparaciones de HC-Pro purificado analizadas por "Western blot" generaron una banda mayoritaria de 50 kDa (Fig. 3). Sin embargo, si se analizaba una mezcla 1:1 de HC-Pro purificado y de extracto de planta sana (1/10 p/v, en tampón Tris-ClH 0.625M pH 6.8), incubada durante 10 min a temperatura ambiente, se reproducía el patrón de bandas múltiples de 100 KDa hasta más de 200 kDa obtenido al analizar tejido de tabaco infectado, extraído en ausencia de 2-ME (Fig. 3). Este patrón de bandas múltiples no se obtuvo cuando se analizó HC-Pro purificado incubado con extracto de tabaco sano elaborado en presencia de agentes reductores, con ovoalbúmina, con proteínas de extracto de bacteria *E. coli*, o con ácidos nucleicos totales de tabaco sano.

### **V.3.2- Análisis por FPLC del HC-Pro en preparaciones purificadas y en extractos de hoja**

En el análisis por FPLC de preparaciones de HC-Pro de PVY-0 purificado la mayor parte de esta proteína eluyó, con relación a los marcadores de tamaño, a tiempos que corresponden a pesos moleculares entre 200 y 100 kDa, con un máximo a 200 kDa (Figs. 4 y 7).

De modo similar, cuando se analizaron por FPLC extractos de plantas de tabaco infectado con PVY-0

se observó que, tanto en presencia como en ausencia del agente reductor DTT, el máximo de elución del HC-Pro se situaba a tiempos correspondientes a unos 200 kDa (Figs. 5 y 7). Sin embargo, el análisis por SDS-PAGE y ECL de las alícuotas de eluidos mostró que, en ausencia de DTT en los tampones de extracción y de elución, bandas de pesos moleculares desde 100 kDa hasta más de 200 kDa, eran reconocidas por el HC-Mab 1A11, junto con la banda de 50 kDa correspondiente al HC-Pro monomérico (Fig. 5B). Sorprendentemente, estas bandas no se distribuyeron entre las diferentes alícuotas de eluidos según sus pesos moleculares, lo que podría indicar que no representan agregados proteicos con existencia previa a la realización de la cromatografía (Fig. 5B).

Extractos de planta infectada con PVY-0 NAT y PVY-1 analizados por FPLC utilizando DTT dieron asimismo un máximo de elución del HC-Pro a 200 kDa (Fig. 6).

Los perfiles de elución del componente "helper" de PVY-0 en el análisis por FPLC de preparaciones purificadas y de extractos de planta infectada, tanto en presencia como en ausencia de DTT, se elaboraron a partir del análisis densitométrico de las bandas obtenidas por ECL, y se muestran en la Fig. 7.

### **V.3.3- Transmisión de virus por áfidos con ayuda de preparaciones de HC-Pro tratadas con diferentes agentes químicos**

Preparaciones de HC-Pro purificado o combinaciones de virus y de HC-Pro purificados fueron tratadas con diversos agentes químicos a concentraciones determinadas (Tabla 1) antes de la realización de transmisiones mediante adquisiciones a través de membranas o secuenciales, respectivamente. Un detergente iónico y uno neutro fuerte (CTAB y Tritón X-100) impidieron la transmisión en todos los casos, tanto en adquisiciones a través de membranas como secuenciales. En cambio, tratamientos con un agente reductor de grupos sulfhidrilo (2-ME), con dos agentes quelantes de metales (EDTA y

EGTA), con un inhibidor de serín proteasas (PMSF) o con un detergente neutro (Tween 20), no anularon la transmisión viral. La transmisión en presencia de urea se anuló a partir de concentraciones de 4M (Tabla 1).

#### V.4- DISCUSION

Con nuestro estudio hemos querido contribuir al conocimiento de las propiedades del componente "helper" a nivel molecular. Para ello hemos estudiado el comportamiento electroforético y cromatográfico de esta proteína en extractos obtenidos por trituración de material vegetal y en preparaciones purificadas, tanto en presencia como en ausencia de agentes reductores.

Cuando extractos de plantas infectadas con PVY o mezclas de preparaciones de HC-Pro purificado y extractos de planta sana son analizados por "Western blot" con anticuerpos específicos del HC-Pro, varias bandas proteicas de alto peso molecular (de 100 a más de 200 kDa), son reconocidas por estos anticuerpos, además de la de 50 kDa que corresponde a la proteína HC-Pro monomérica. Este efecto del extracto de planta sana sobre el HC-Pro no tiene lugar en presencia de agentes reductores de grupos sulfidrilo (2-ME o DTT). En este caso, el HC-Pro se detecta en "Western blot" como una banda de unos 50 kDa. Estos datos parecen indicar que un componente del extracto de planta produce una alteración en el HC-Pro que modifica su comportamiento electroforético. Este fenómeno podría no ser exclusivo del HC-Pro: Recientemente se ha publicado que un factor de un extracto de planta sana, posiblemente una enzima soluble, provoca alteraciones en la movilidad electroforética de las proteínas de la cápsida de ciertos potyvirus (Hassan et al., 1994).

Por otro lado, una vez el HC-Pro ha sido expuesto al extracto en ausencia del agente reductor, ulteriores tratamientos desnaturalizantes de la muestra con 2-ME no evitan la presencia de las bandas de 100 kDa hasta más de 200 kDa, indicando que se trata de un efecto irreversible.

El hecho de que HC-Pro purificado genere estas bandas de alto peso molecular (de 100 a más de 200 KDa) en SDS-PAGE, sólo si se combina con extracto de tabaco sano, parece descartar la posibilidad de que se trate de precursores del procesamiento de la poliproteína viral, representando posiblemente agregados de los que forma parte el HC-Pro.

Los áfidos, en sus inserciones de prueba en planta, penetran con su estilete y succionan el contenido celular mediante un proceso de ingestión y regurgitación (Harris, 1977). Este contenido celular adquirido por el áfido podría no diferir cualitativamente de un preparado de extracto de planta, con lo que el HC-Pro durante estas alimentaciones podría sufrir alteraciones similares a las que se producirían en un extracto de planta y que, si afectaran a su actividad biológica, podrían tener relación con el tiempo que el áfido permanece virulífero.

Así, preparaciones de extracto de planta infectada que se han utilizado en transmisiones de adquisición a través de membranas, y que son básicamente sobrenadantes de una centrifugación a alta velocidad de un extracto de planta, pierden su funcionalidad en pocas horas a 4°C (Sako y Ogata, 1980). En las preparaciones de HC-Pro purificado, que incluyen una concentración de dicho sobrenadante por precipitación con PEG 6000 y la presencia de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  en los tampones de purificación, la actividad biológica permanece durante un período de tiempo superior a tres días a 4°C (Govier et al., 1977; Thornbury et al., 1985). Por otro lado, la pérdida de actividad biológica de preparaciones de HC-Pro purificado parece tener un carácter irreversible (Thornbury et al., 1993). Estos datos sugieren la posibilidad de que la proteína "helper" nativa y funcional, pueda estar siendo modificada por un componente del extracto de planta. Podría ser que el efecto favorable que la inclusión de  $\text{Mg}^{2+}$  y la elección de tampones adecuados han tenido en la puesta a punto de un protocolo de purificación de HC-Pro activo, tenga su base en la neutralización o atenuamiento de un proceso alterador.

El uso de anticuerpos específicos contra el HC-Pro de PVY (Capítulo IV), ha permitido visualizar el

perfil de elución de esta proteína en FPLC, tanto de preparaciones de HC-Pro purificadas como de extracto de planta infectada. El HC-Pro eluye a tiempos que corresponden a pesos moleculares mayores de los esperados para una proteína monomérica (50 kDa), con un máximo alrededor de los 200 kDa, sugiriendo la existencia de agregados de HC-Pro en la forma de tetrámeros o de agregados de HC-Pro con otro factor de la muestra. Los resultados están en concordancia con otros trabajos de fraccionamiento de preparaciones de HC-Pro purificado (Govier et al., 1977; Thornbury et al., 1985), que asignan actividad "helper" a formas con pesos moleculares mayores que los de la proteína monomérica (150-100 kDa). Estas posibles formas agregadas y solubles podrían encontrarse en la célula o, alternativamente, la agregación podría tener lugar durante la preparación de extracto vegetal.

Por otra parte, el perfil de elución del HC-Pro no se altera en presencia de un agente reductor de grupos sulfidrilos, indicando que la agregación mencionada es estable en su presencia. Sin embargo, en el análisis en SDS-PAGE de las alícuotas eluidas de la FPLC, se obtiene una única banda HC-Pro de 50 kDa, lo que indica que la interacción descrita no resiste el tratamiento desnaturante del análisis electroforético (Fig. 5C).

Asimismo, el perfil de elución del HC-Pro en FPLC de extractos de plantas infectadas con los aislados PVY-0 NAT o PVY-1, en presencia de agentes reductores, es similar al del HC-Pro de PVY-0. Esto sugiere que las mutaciones de aminoácidos que presentan los componentes "helper" de ambos aislados (Capítulo III), que anulan su actividad a nivel de transmisión, no afectan en cambio a la estabilidad de los posibles agregados de HC-Pro detectados por FPLC.

La proteína HC-Pro expresada en bacteria o en baculovirus (Thornbury et al., 1993) y la de los mutantes de TVMV generados por mutagénesis dirigida (Atreya et al., 1992a), no es funcional en transmisión. Sin embargo, plantas transgénicas que expresan los tres primeros cistrones del genoma potyviral, sí producen HC-Pro activo (Berger et al., 1989). Sería interesante analizar los perfiles de

elución por FPLC de estas proteínas para obtener información sobre sus posibles conformaciones cuaternarias.

Al analizar el efecto que diferentes agentes tienen sobre la transmisión, se observa que la presencia de agentes reductores de grupos sulfidrilo no anula la transmisibilidad viral, en nuestras condiciones de trabajo. Lo mismo ocurre con agentes quelantes de metales (EDTA, EGTA). Esto último ya fue descrito (Govier y Kassanis, 1974a).

La proteína HC-Pro de PVY contiene unas trece cisteínas. El estado reducido de sus grupos sulfidrilo, al menos el de aquellos accesibles al 2-ME, no parece afectar a la función de transmisión. Es interesante destacar el contraste entre el hecho de que agentes reductores y agentes quelantes de metales no anulen la transmisibilidad viral y la propuesta de que el agrupamiento de cisteínas de la región amino del HC-Pro, que se ha sugerido interviene en la transmisión (Atreya et al., 1992a; Atreya y Pirone, 1993), forma un motivo de dedos de zinc "zinc-finger" (Robaglia et al., 1989). La estructura de este motivo debería ser sensible a dichos agentes. Una posible explicación sería la de que este dominio no fuese accesible a estos agentes en las condiciones experimentales. Menos sorprendente es el hecho de que detergentes iónicos o Urea 4M anulen la transmisión. El dato de que el HC pierde su actividad biológica si se trata con Urea 4M ha sido también obtenido por Thornbury et al., (1993).

A la luz de los datos obtenidos en este trabajo, un modelo hipotético de proteína HC-Pro funcional podría ser el de una estructura tetramérica soluble unida por interacciones iónicas, resistente a la presencia de agentes reductores de grupos sulfidrilo, pero no a la del tratamiento desnaturalizante de un análisis por SDS-PAGE. La proteína HC-Pro podría ser alterada por un componente del extracto de planta, dando lugar a un patrón electroforético característico. Esta alteración, evitable si en el medio hay un agente reductor, sería irreversible. Como la presencia de agentes reductores de grupos sulfidrilo impide la alteración mencionada, podrían estar implicados restos de cisteínas en la misma.

## **V.5.- FIGURAS**

**Fig. 1** Inmunoelectrotransferencia ("Western blot") de extractos de plantas infectadas con PVY analizados en SDS-PAGE (geles de gradiente del 5 al 15%), utilizando el anticuerpo HC-Pab.hoja de tabaco analizados en geles de gradiente del 5 al 15%, utilizando el anticuerpo HC-Pab. **A:** Extracto elaborado en tampón Tris-ClH 0.625M pH 6.8 (líneas 1 a 5), con adición posterior de 2-ME. **B:** Extracto elaborado en tampón Laemmli (líneas 6 a 10). Se analizaron extractos de plantas infectadas con los aislados PVY-0 (líneas 1 y 6), PVY-0 NAT (líneas 2 y 7) y PVY-1 (dos plantas distintas, líneas 3 y 8, 4 y 9) y PVY-N (líneas 5 y 10).

**Fig. 2** Inmunoelectrotransferencia ("Western blot") de extractos de plantas de tabaco infectado con PVY-0, analizados en SDS-PAGE (geles de gradiente del 5 al 15%), utilizando el anticuerpo HC-Pab. Línea 1, extracto preparado en tampón Tris-ClH 0.625M, pH 6.8 (TE). Línea 2 extracto preparado en tampón de Laemmli. Línea 3, extracto hecho en TE con SDS al 5%. Línea 4, extracto hecho en TE con 2-ME al 1%. Línea 5, extracto hecho en TE con Urea 8M.

**Fig. 3.** Inmunoelectrotransferencia ("Western blot") de preparaciones de HC-Pro purificado de PVY-0 analizadas en SDS-PAGE (geles de gradiente 5-15%), utilizando el anticuerpo HC-Pab. Línea 1, extracto de tabaco sano. Línea 2, HC-Pro purificado incubado con extracto de tabaco sano. Línea 3, HC-Pro purificado.

**Fig. 4 A:** Perfiles de elución en FPLC ( $OD_{280}$ ) de las proteínas presentes en una preparación de HC-Pro purificado de PVY-0 (azul). En negro se muestra el perfil de elución de los marcadores de peso molecular. **B:** Análisis por inmunoelectrotransferencia ("Western blot") de las alícuotas eluidas, revelado por ECL utilizando el HC-Mab 1A11. **C:** análisis densitométrico (Molecular Dynamics, ImageQuant) de las bandas de HC-Pro detectadas por ECL.

**Fig. 5 A:** Perfiles de elución en FPLC ( $OD_{280}$ ) de las proteínas presentes en un extracto de tabaco infectado con PVY-0. Línea verde, tampón de extracción y elución TSM. Línea naranja, tampón de

extracción y elución TSM con DTT. En negro se muestra el perfil de elución de los marcadores de peso molecular. El análisis por inmunoelectrotransferencia ("Western blot") de las alícuotas eluídas, revelado por ECL utilizando el HC-Mab 1A11, muestra el patrón de bandas HC-Pro obtenido al analizar un extracto en ausencia de DTT (B) o en presencia de DTT (C).

**Fig. 6** Patrón de bandas HC-Pro obtenido al analizar por inmunoelectrotransferencia ("Western blot"), revelada por ECL utilizando el HC-Mab 1A11, las alícuotas eluídas de una FPLC de extracto de planta infectada con PVY-0 NAT o con PVY-1, preparado en presencia de DTT.

**Fig. 7** Perfiles de elución del HC-Pro generados mediante el análisis densitométrico (Molecular Dynamics, ImageQuant) de las bandas HC-Pro detectadas por ECL. **A:** Perfil de elución del HC-Pro de PVY-0 purificado. **B:** Perfil de elución del HC-Pro de extracto de tabaco infectado con PVY-0 preparado y eluído en ausencia de DTT. **C:** Perfil de elución del HC-Pro de extracto de tabaco infectado con PVY-0 preparado y eluído en ausencia de DTT, analizando únicamente la banda de 50 kDa. **D:** Perfil de elución del HC-Pro de extracto de tabaco infectado con PVY-0 preparado y eluído en ausencia de DTT, analizando únicamente las bandas de peso molecular mayor o igual a 100 kDa. **E:** Perfil de elución del HC-Pro de extracto de tabaco infectado con PVY-0 preparado y eluído en presencia de DTT. \*: Se representa para cada alícuota eluída el porcentaje de proteína HC-Pro que contiene respecto a la alícuota que dió el valor máximo, a la que se asigna arbitrariamente el valor 100%.

Fig. 1

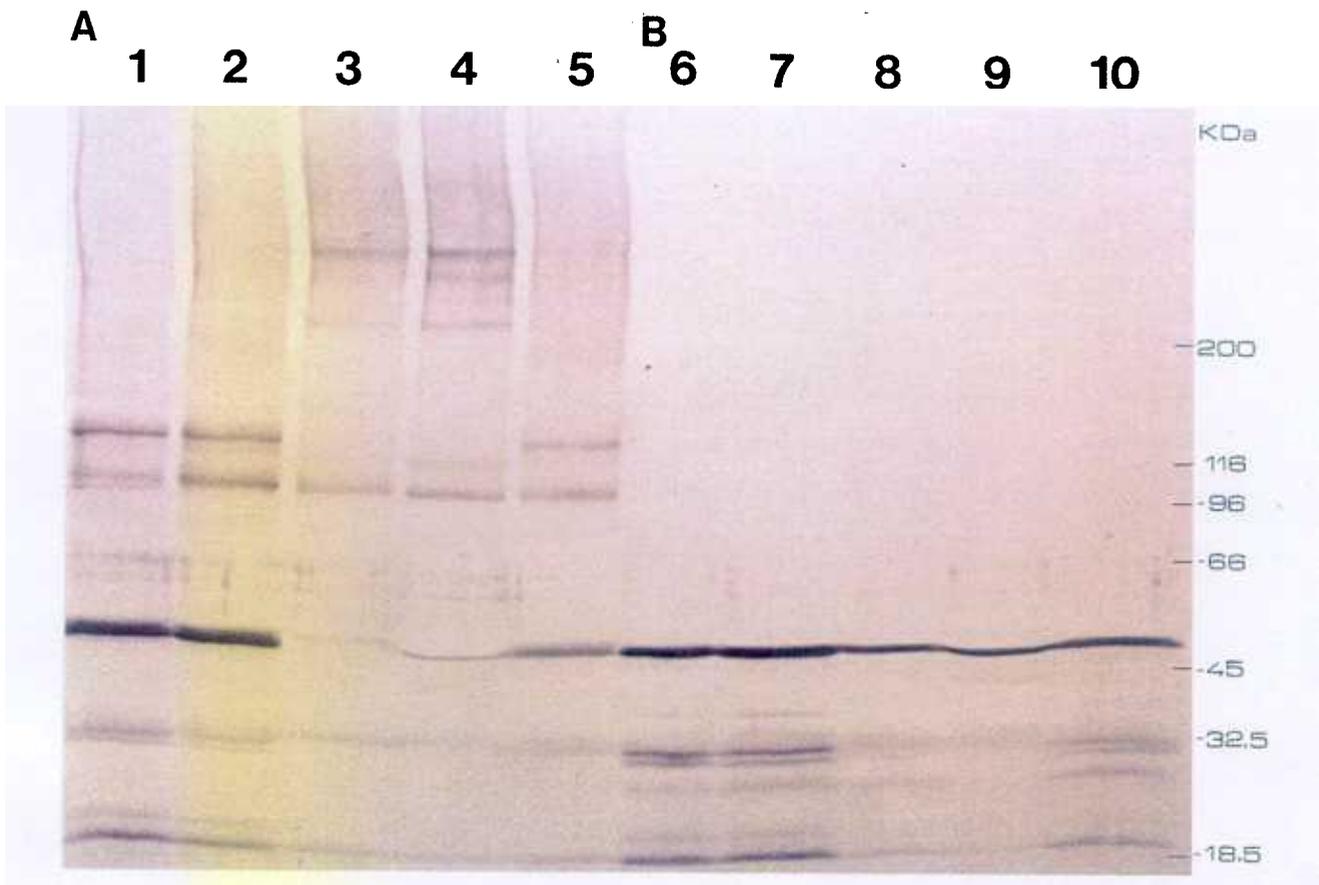
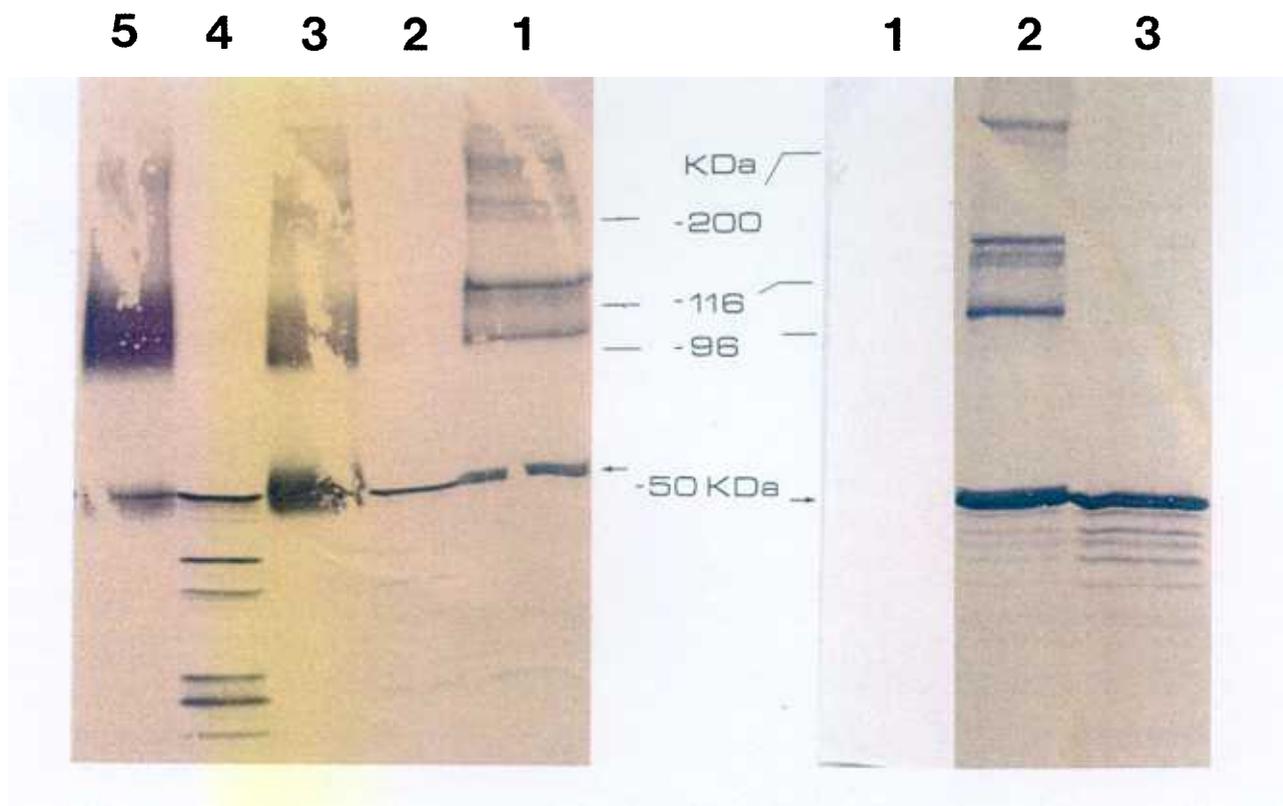
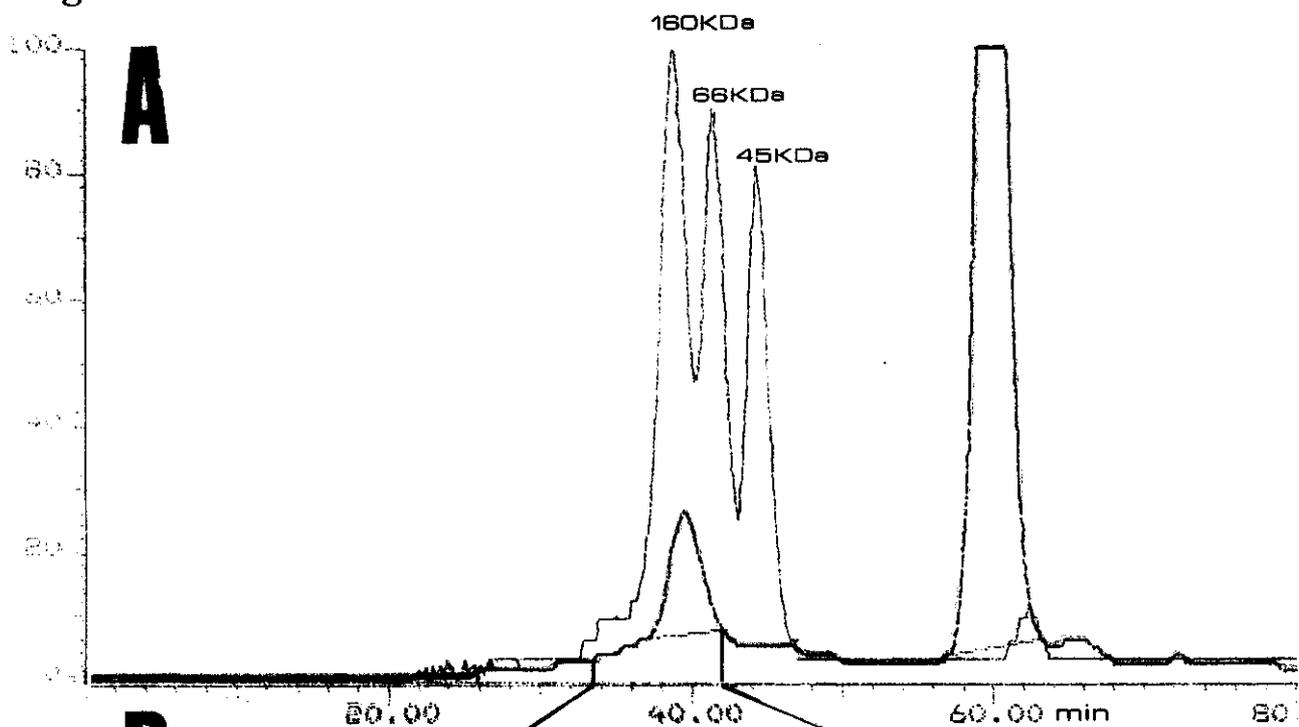


Fig. 2

Fig. 3



**Fig. 4**



**B**



**C**

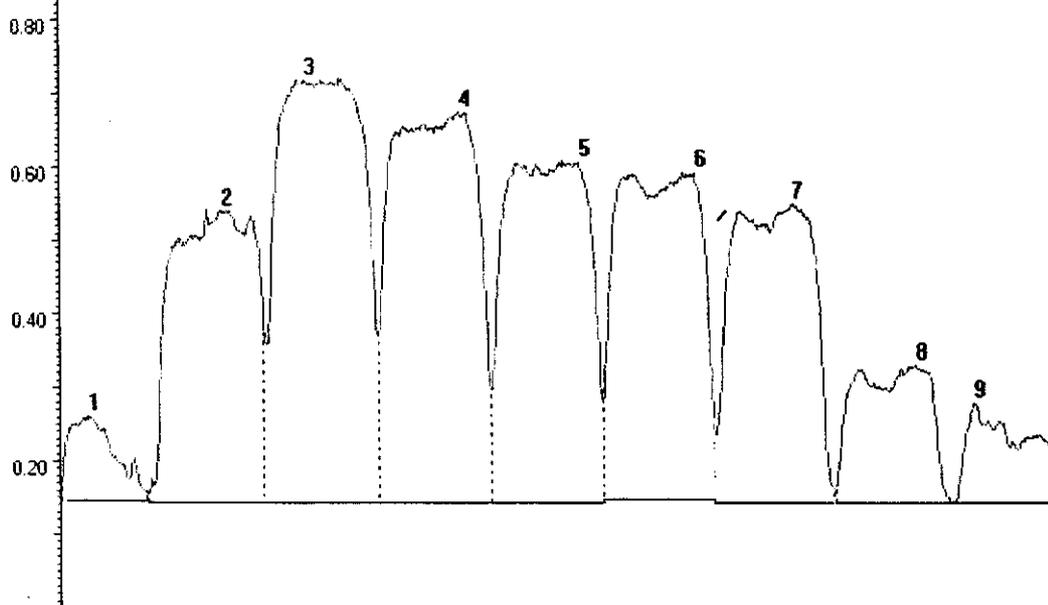
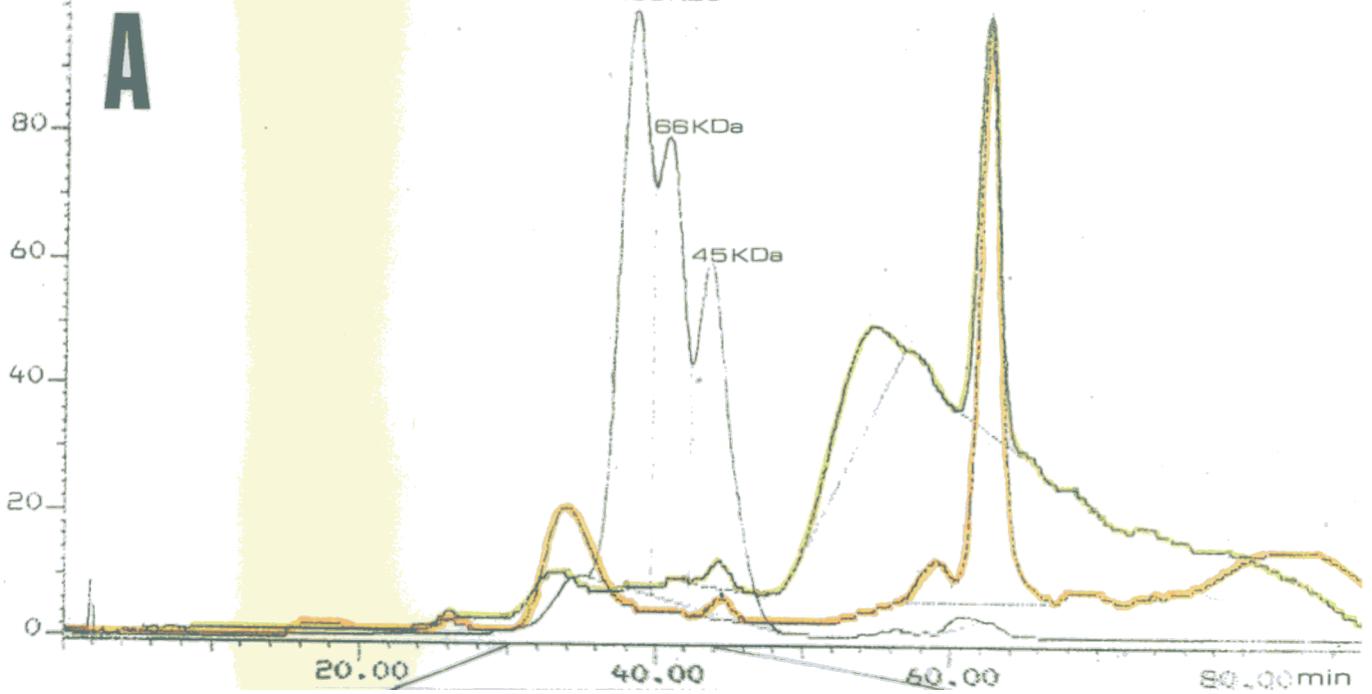
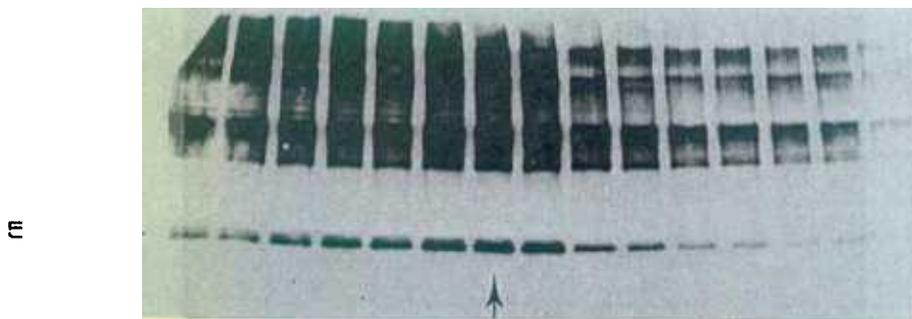


Fig. 5



**B**



**C**

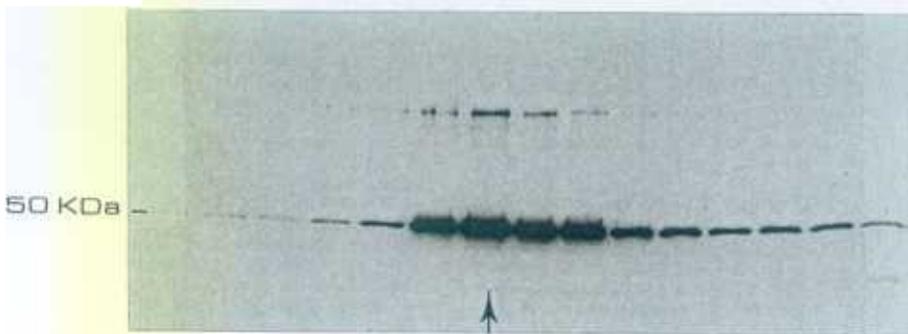


Fig. 6



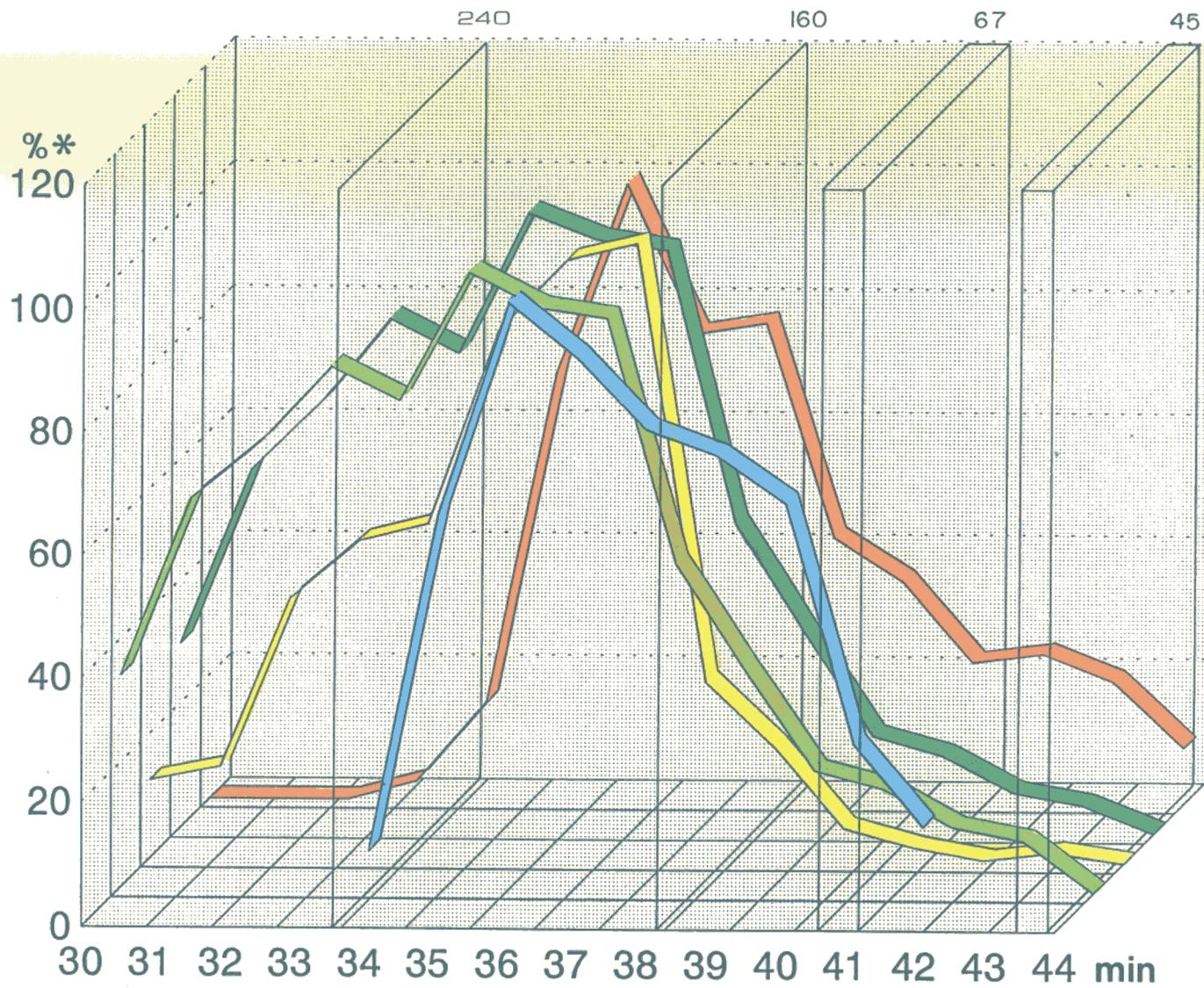


Fig. 7.

**Tabla 1. Transmisión por áfidos de PVY-0 NAT con ayuda de preparaciones de HC-Pro tratadas con diferentes agentes químicos. Efecto de diversos agentes sobre la transmisión viral**

		Experimentos de transmisión							
		Adquisición a				Secuenciales (*)			
		través de membranas							
Tritón X-100	2%					0/4	0/4	(**)	
Tween 20	5%	6/6				4/4	3/4		
CTAB	0.1%	0/6	0/6	0/6	0/6				
EDTA	0.05M					4/4	3/4		
EGTA	0.05M	4/4				5/10	2/4		
UREA	2M	4/4	4/4			4/4			
	4M	0/4				0/4	0/4		
	6M	0/4	0/4			0/4			
PMSF	0.05M	4/4	4/4			3/5	4/4		
2-ME	2%	6/6	6/6	6/6	4/4	3/4	4/4	4/4	4/4
		4/4	4/4			4/4			

\*: En los experimentos de transmisión control de planta a planta, la transmisión fué negativa en todos los casos.

\*\* : Los resultados se expresan como el número de plantas infectadas sobre el total de plantas utilizadas en cada experimento. Se utilizaron diez áfidos por planta.

## **VI- CONCLUSIONES**

El estudio de la transmisión de virus del Género Potyvirus por áfidos, y del factor de transmisión o componente "helper" nos ha permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1.- La transmisibilidad por áfidos de cuatro aislados del virus Y de la patata (aislados PVY-0, PVY-0 NAT, PVY-1 y PVY-N), ha sido estudiada en experimentos de transmisión de planta infectada a planta sana. Los aislados PVY-0 y PVY-N han sido caracterizados como transmisibles y los aislados PVY-0 NAT y PVY-1 como no transmisibles.

2.- Las proteínas de la cápsida viral de los aislados PVY-0 NAT y PVY-1 son funcionales en la transmisión de estos virus por áfidos, y en el caso del aislado PVY-0 NAT, su componente "helper" no es funcional en transmisión, según se ha demostrado en experimentos de adquisición a través de membranas y secuenciales.

3.- El componente "helper" del aislado PVY-0 NAT presentó un comportamiento electroforético similar al que presentaron los componentes "helper" de los aislados transmisibles PVY-0 y PVY-N, y como éstos, pudo ser purificado. En contraste, el componente "helper" del aislado PVY-1 no pudo ser purificado siguiendo el protocolo habitual, pese a que su presencia en planta fué confirmada. Mostró además un comportamiento electroforético diferente del que presentaron los componentes "helper" de los otros tres aislados de PVY analizados.

4.- Se han determinado las secuencias nucleotídicas de la región del ARN viral que codifica el componente "helper" de tres aislados españoles del virus Y de la patata. La secuencia de dicha región es de 1368 nucleótidos que codifican 456 aminoácidos. Se han identificado ocho aminoácidos comunes y exclusivos de estos tres aislados cuando se compararon con otras secuencias conocidas de componentes "helper" de PVY. La homología de secuencia a nivel de aminoácidos fué elevada con otros aislados de PVY siendo máxima con el virus C de la patata PVC, un 97%, y mínima con un

aislado húngaro PVY-H, un 89,9%. La homología con otros potyvirus comparados fué de alrededor del 50%.

5.- La secuencia del gen del componente "helper" del aislado PVY-0 NAT se diferencia de la de aislado PVY-0 en dos nucleótidos, que se traducen en una única diferencia aminoacídica. Se propone que la falta de actividad biológica del componente "helper" del aislado PVY-0 NAT tiene su origen en esta sustitución puntual.

6.- La secuencia del gen del componente "helper" del aislado PVY-1 se diferencia de la del aislado PVY-0 en dos nucleótidos, que se traducen en dos diferencias aminoacídicas. Se propone que las propiedades diferenciales del componente "helper" del aislado PVY-1 están causadas por una o por ambas sustituciones.

7.- Dentro de la región rica en cisteínas del extremo amino de la proteína "helper", los aislados PVY-0 NAT y PVY-1 *presentaron mutaciones en posiciones estrictamente conservadas en todos los potyvirus transmisibles por áfidos comparados*. Estos datos apoyan la propuesta de que esta región rica en cisteínas está implicada en el proceso de transmisión de virus por áfidos.

8.- Se han producido diez anticuerpos monoclonales y un anticuerpo policlonal contra el componente "helper" del virus Y de la patata. Todos los anticuerpos reconocieron el componente "helper" de PVY en ensayos de ELISA Indirecto y ELISA DASi. Siete de los monoclonales así como el anticuerpo policlonal reconocieron además al componente "helper" de PVY en análisis por inmunoelectrotransferencia ("Western blot").

9.- Estos anticuerpos monoclonales y el policlonal contra una proteína viral no estructural, posibilitan la detección de infección por potyvirus en planta y su diferenciación. Ningún anticuerpo reconoció el

componente "helper" del virus del grabado del tabaco, del virus A de la patata o del virus de la Sharka. El anticuerpo monoclonal 1A11 y el anticuerpo policlonal reconocieron los componentes "helper" de 22 aislados de PVY analizados y de un aislado del virus del moteado del pimiento. El anticuerpo monoclonal 8E1 diferencia a los aislados de los grupos PVY<sup>o</sup> y PVY<sup>c</sup> de los del grupo PVY<sup>N</sup>. Otros anticuerpos monoclonales pudieron ser utilizados para formar subgrupos de aislados de PVY.

10.- Al estudiar comparativamente extractos de tabaco infectado con PVY, clarificados por centrifugación a alta o a baja velocidad, se obtuvieron valores de absorvancia similares, tanto en ELISA Indirecto como en ELISA DAS. Se sugiere que el componente "helper" insoluble que pueda estar formando parte de inclusiones amorfas, no contribuye a las lecturas de ELISA obtenidas.

11.- La exposición de componente "helper" a extracto de planta en ausencia de agentes reductores de grupos sulfidrido provoca que, en análisis por inmunoelectrotransferencia, anticuerpos específicos del componente "helper" reconozcan varias bandas proteicas con pesos moleculares superiores a 100 kDa, además de la banda de 50 kDa correspondiente al componente "helper" monomérico. Se sugiere que estas bandas son inducidas como consecuencia de una alteración del componente "helper" por un componente del extracto de planta.

12.- El componente "helper" eluye a tiempos correspondientes a pesos moleculares mayores del esperado para una forma monomérica, con un máximo de elución sobre los 200 kDa, cuando preparaciones purificadas o extractos de planta infectada se analizan por FPLC. Se sugiere la existencia de una agregación entre proteínas monoméricas o con otro factor de la muestra. Se propone que el componente "helper" soluble de estas preparaciones se encontraría mayoritariamente en forma de tetrameros.

13.- Los componentes "helper" de los aislados PVY-0, PVY-0 NAT y PVY-1 eluyen mayoritariamente a tiempos correspondientes a pesos moleculares de 200 kDa, cuando se analizan por FPLC extractos de tabaco infectado preparados en presencia de un agente reductor de grupos sulfidrilos. Este hecho indicaría que la agregación sugerida es resistente a la presencia de dicho agente reductor, aunque no al tratamiento desnaturalizante que conlleva un análisis por SDS-PAGE, así como que los componentes "helper" defectuosos de los aislados no transmisibles mantienen la capacidad de formar agregados.

## **VII- BIBLIOGRAFIA**

## VII- BIBLIOGRAFIA

- Allison, R., Johnson, R.E. y Dougherty, W.G. (1986). The nucleotide sequence of the coding region of tobacco etch genomic RNA: Evidence for the synthesis of a single polyprotein. *Virology* 154, 9-20.
- Aramburu, J.M. (1992). Detección serológica de ácido ribonucleico de doble cadena (dsRNA) como método de diagnóstico de diferentes virosis vegetales. *Tesis doctoral, Universidad de Valencia, Facultad de Ciencias Químicas.*
- Atreya, C.D., Raccah, B. y Pirone, T.P. (1990). A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. *Virology* 178, 161-165.
- Atreya, C.D., Atreya, P.L., Thornbury, D.W. y Pirone, T.P. (1992a). Site-directed mutations in the potyvirus HC-PRO gene affect helper component activity, virus accumulation, and symptom expression in infected tobacco plants. *Virology* 191, 106-111.
- Atreya, C.D. (1992b). Application of genome sequence information in potyvirus taxonomy: An overview. *Archives of Virology, supplementum 5*, 17-23.
- Atreya, C. D. y Pirone, T.P. (1993). Mutational analysis of the helper component-proteinase gene of a potyvirus: Effects of amino acid substitutions, deletions, and gene replacement on virulence and aphid transmissibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90, 11919-11923.
- Atreya, P.L., Atreya, C.D. y Pirone, T.P. (1991). Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88, 7887-7891.
- Ball, E.M.(1990). Polyclonal antibodies. En: *Serological Methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens.* Hampton, R., Ball, E. y S. De Boer eds. APS Press.
- Baulcombe, D.C., Lloyd, J., Mannoussopoulos, I.N., Roberts, I.M. y Harrison, B.D. (1993). Signal for potyvirus-dependent aphid transmission of potato aucuba mosaic virus and the effect of its transfer to potato virus X. *Journal of General Virology* 74, 1245-1253.
- Baunoch, D.A., Das, P. y Hari, V. (1990). Potato virus Y helper component is associated with amorphous inclusions. *Journal of General Virology* 71, 2479-2482.
- Baunoch, D.A., Pritam, D., Browning, M.E. y Hari, V. (1991). A temporal study of the expression of the capsid, cytoplasmic inclusion and nuclear inclusion proteins of tobacco etch potyvirus in infected plants. *Journal of General Virology* 72, 487-492.
- Barnett, O.W. (1992). A summary of potyvirus taxonomy and definitions. *Archives of Virology, supplementum 5*, 435-444.
- Berger, P.H. y Pirone, T.P. (1986). The effect of helper component on the uptake and localization of potyviruses in *Myzus persicae*. *Virology* 153, 256-261.

- Berger, P.H., Hunt, A.G., Domier, L.L., Hellmann, G.M., Stram, Y., Thornbury, D.W. y Pirone, T.P. (1989). Expression in transgenic plants of a viral gene product that mediates insect transmission of potyviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86, 8402-8406.
- Bourdin, D. y Lecoq, H. (1991). Evidence that heteroencapsidation between two potyviruses is involved in aphid transmission of a non-aphid-transmissible isolate from mixed infections. *Phytopathology* 81, 1459-1464.
- Brandes, J. y Wetter, C. (1959). Classification of elongated plant viruses on the basis of particle morphology. *Virology* 8, 99-115.
- Brunt, A.A. (1992). The general properties of potyviruses. *Archives of Virology, supplementum* 5, 3-16.
- Carrington, H.C. y Dougherty, W.G. (1987). Small nuclear inclusion protein encoded by a plant potyvirus genome is a protease. *Journal of General Virology* 61, 2540-2548.
- Carrington, J.C., Chang, S.M., Parks, T.D. and Dougherty, W.G. (1989a). A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *EMBO Journal* 8, 365-370.
- Carrington, J.C., Freed, D.D. y Sanders, T.C. (1989b). Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in *Escherichia coli* and *in vitro*. *Journal of General Virology* 63, 4459-4463.
- Carrington, J.C., Haldeman, R., Dolja, V.V. y Restrepo, M. A. (1993). Internal cleavage and trans-proteolytic activities of the VPg-proteinase (NIa) of tobacco etch potyvirus *in vivo*. *Journal of Virology* 67, 6995-7000.
- Christie, R.G. y Edwardson, J.R. (1977). Light and electron microscopy of plant virus inclusions. *Florida Agricultural Experimental Station Monograph Series* 9.
- Clark, M.F. y Adams, A.N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34, 475-483.
- Converse, R.H. y Martin, R.R. (1991). Methods for plant viruses. En: *Serological methods for detection and identification of viral, bacterial and plant pathogens*. R. Hampton, E. Ball y S. De Boer eds. APS Press, St. Paul. Minnesota USA.
- De Bokx J.A. y Huttinga, H. (1981). Potato virus Y. *CMI/AAB description of plant viruses* N° 242.
- De Mejía, M.V.G., Hiebert, E. y Purcifull, D.E. (1985a). Isolation and partial characterization of the amorphous cytoplasmic inclusions associated with infections caused by two potyviruses. *Virology* 142, 24-33.
- De Mejía, M.V.G., Hiebert, E., Purcifull, D.E., Thornbury, D.W., y Pirone, T.P. (1985). Identification of potyviral amorphous inclusion protein as a non structural virus specific protein related to helper component. *Virology* 142, 34-43.
- Dixon, A.F.G. (1985). *Aphid ecology*. Backie, Glasgow and London.

- Dolja, V.V., Herndon, K.L., Pirone, T.P. y Carrington, J.C. (1993). Spontaneous mutagenesis of a plant potyvirus genome after insertion of a foreign gene. *Journal of Virology* 67, 5968-5975.
- Domier, L.L., Franklin, K.M., Shahabuddin, M., Hellmann, G.M., Overmeyer, J.H., Hiremath, S.T., Siaw, M.F.E., Lomonosoff, G.P., Shaw, J.G. y Rhoads, R.E. (1986). The nucleotide sequence of tobacco vein mottling virus RNA. *Nucleic Acids Research* 14, 5417-5430.
- Domier, L.L., Shaw, J.G. y Rhoads, R.E. (1987). Potyvirus proteins share aminoacid sequence homology with picorna-, como-, and caulimoviral proteins. *Virology* 158, 20-27.
- Dougherty, W.G., Willis, L. y Johnston, R.E. (1985). Topographic analysis of tobacco etch virus capsid protein epitopes. *Virology* 144, 66-72.
- Dougherty, W.G. y Dawn Parks, T. (1991). Post-translational processing of the tobacco etch virus small nuclear inclusion polyprotein: identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains. *Virology* 183, 449-456.
- Eastop, V.F. (1977). Worldwide importance of aphids as virus vectors. En: *Aphids as virus vectors*. K.F. Harris y K. Maramorosch eds. Academic Press, New York, 361-383.
- Edwardson, J.R. (1966). Cylindrical inclusions in the cytoplasm of leaf cells infected with tobacco etch virus. *Science* 153, 883-884.
- Edwardson, J.R. (1974a). Some properties of the potato virus Y group. *Florida Agricultural Experimental Station Monograph Series* 4.
- Edwardson, J.R. (1974b). Host range of viruses in the PVY group. *Florida Agricultural Experimental Station Monograph Series* 5.
- Edwardson, J.R. (1992). Inclusion bodies. *Archives of Virology, supplementum* 5, 25-30.
- Ellis, P., Bowler, G., Mackenzie, D.J. y Stace-Smith, R. (1992). Monoclonal antibodies for detection and identification of strains of potato virus Y in Canada and the United States. (Abstr.) *Canadian Journal of Plant Pathology* 14, 241.
- Feng, D.F. y Doolittle, R.F. (1987). Progressive alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. *Journal of Molecular Evolution* 25, 351-360.
- Fenner, F. (1976). Classification and nomenclature of viruses. Second report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* 7, 1-116.
- Forbes, A.R. (1977). The mouthparts and feeding mechanism of aphids. En: *Aphids as virus vectors*. K.F. Harris y K. Maramorosch eds. Academic Press, New York, 361-383.
- Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L. y Brown, F. (1991). Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee of the Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology, Supplementum* 2.
- García, J.A., Riechmann, J.L., Martín, M.T. y Lafín, S. (1989). Proteolytic activity of the plum pox potyvirus NIa-protein on excess of natural and artificial substrates in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 257, 269-273.

- Gebre Selassie, K., Marchoux, G., Delecolle, B. y Pochard, E. (1985). Variabilité naturelle des souches du virus Y de la pomme de terre dans les cultures de piment du sud-est de la France. Caractérisation et classification en pathotypes (1985). *Agronomie* 5, 621-630.
- Gelfand, D.H. y Sninsky, J.J. (1993). Fidelity questions and answers. En: *Amplifications. A Forum for PCR users. Issue 11. Perkin Elmer ed.*
- Goldbach, R. (1986). Molecular evolution of plant RNA viruses. *Annual Review of Phytopathology* 24, 289-310.
- Goldbach, R. (1987). Genome similarities between plant and animal RNA viruses. *Microbiological Sciences* 4, 197-202.
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P. y Blinov, V.M. (1989). Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair, and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Research* 17, 4713-4730.
- Govier, D.A. y Woods, R.D. (1971). Changes induced by magnesium ions in the morphology of some plant viruses with filamentous particles. *Journal of General Virology* 13, 127-132.
- Govier, D.A. y Kassanis, B. (1974a). Evidence that a component other than the virus particle is needed for aphid transmission of potato virus Y. *Virology* 57, 285-286.
- Govier, D.A., Kassanis, B. y Pirone, T.P. (1974b). A virus induced component of plant sap needed when aphids acquire potato virus Y from purified preparations. *Virology* 61, 410-426.
- Govier, D.A., Kassanis, B. y Pirone, T.P. (1977). Partial purification and characterization of the potato virus Y helper component. *Virology* 78, 306-314.
- Granier, F., Durand-Tardif, M., Casse-Delbart, F. y Lecoq, H. (1993). Mutations in zucchini yellow mosaic virus helper component protein associated with loss of aphid transmissibility. *Journal of General Virology* 74, 2737-2742.
- Gugerli, P. y Fries, P. (1983). Characterization of monoclonal antibodies to potato virus Y and their use for virus detection. *Journal of General Virology* 64, 2471-2477.
- Hari, V. (1981). The RNA of tobacco etch virus: Further characterization and detection of protein linked to RNA. *Virology* 112, 391-199.
- Harris, K.F. (1977). An ingestion-egestion hypothesis of non circulative virus transmission. En: *Aphids as virus vectors. K.F. Harris y K. Maramorosch eds. Ac. Press, New York.*
- Harris, K.F. (1991). Aphid transmission of plant viruses. En: *Plant Viruses, Vol. II. C.L. Mandaban, ed. CRC Press.*
- Harrison, B.D. y Robinson, D.J. (1988). Molecular variation in vector-borne plant viruses: Epidemiological significance. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B*, 321, 447-462.

- Hassan, H., Borkhardt, B. y Albrechtsen, M. (1994). A surprising effect of extraction conditions on the mobility of some plant virus coat proteins in SDS-PAGE. *Journal of Virological Methods* 46, 255-261
- Hayat, M.A. (1986). *Basic techniques for transmission electron microscopy*. Academic Press INC.
- Hellmann G.M., Thornbury, D.W., Hiebert, E., Shaw, J.G., Pirone, T.P. y Rhoads, R.E. (1983). Cell-free translation of tobacco vein mottling virus RNA. *Virology* 124, 434-444.
- Jordan, R. (1992). Potyvirus, monoclonal antibodies and antigenic sites. *Archives of Virology, supplementum* 5, 81-95.
- Kamer, G. y Argos, P. (1984). Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Research* 12, 7269-7282.
- Karl, E., Schmidt, H.E. y Giersemehl, I. (1992). Artenspektrum der Aphidvektoren des clover yellow vein potyvirus (Kleegelbadrigkeits-Virus). *Journal of Phytopathology* 134, 117-120.
- Kassanis, B. (1961). The transmission of potato aucuba mosaic virus by aphids from plants also infected with potato virus A or Y. *Virology* 13, 93-97.
- Kassanis, B. y Govier, D.A. (1971). The role of the helper virus in aphid transmission of potato aucuba mosaic virus and potato virus C. *Journal of General Virology* 13, 221-228.
- Kendall, C., Ionescu-Matiu, y Dreesman, R. (1983). Utilization of the biotin-avidin system to amplify the sensitivity of the enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA). *Journal of Immunological Methods* 56, 329-339.
- Kyte, J. y Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hidropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 157, 105-132.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lafn, S., Riechmann, J.L. y García, J.A. (1989a). The complete nucleotide sequence of plum pox potyvirus RNA. *Virus Research* 13, 157-172.
- Lafn, S., Riechmann, J.L. y García, J.A. (1989b). Homologous potyvirus and flavivirus proteins belonging to a superfamily of helicase-like proteins. *Gene* 82, 357-362.
- Lafn, S., Riechmann, J.L. y García, J.A. (1989c). RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucleic Acids Research* 18, 7003-7006.
- Lafn, S. (1990). Secuencia del RNA genómico del virus de la Sharka. Actividad RNA helicasa asociada a una proteína viral. *Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias*.
- Lafn, S., Martfn, M.T., Riechmann, J.L. y García, J.A. (1991). Novel catalytic activity associated with positive-strand RNA virus infection: nucleic acid-stimulated ATPase activity of the plum pox potyvirus helicaselike protein. *Journal of Virology* 65, 1-6.

- Lawson, R.H. y Hearon, S.S. (1971). The association of pinwheel inclusions with plasmodesmata. *Virology* 44, 454-456.
- Lecoq, H., Bourdin, D., Raccach, B., Hiebert, E. y Purcifull, D.E. (1991). Characterization of a zucchini yellow mosaic virus isolate with a deficient helper component. *Phytopathology* 81, 1087-1091.
- Lecoq, H., Ravelonandro, M., Wipf-Scheibel, C., Monsion, M., Raccach, 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6, 403-406.
- Lesemann, D.E. (1988). Cytopathology. En: *The plant viruses, vol. 4. The filamentous plant viruses, 179-235. R.G. Milne ed.. Plenum Press, New York, London.*
- López-Abella, D., Pirone, T.P., Mernaugh, R.E. y Johnson, M.C. (1981). Effect of fixation and helper component on the detection of potato virus Y in alimentary tract extracts of *Myzus persicae*. *Phytopathology* 71, 807-809.
- López-Abella, D., Bradley, R.H.E. y Harris, K.F. (1988). Correlation between stylet paths made during superficial probing and the ability of aphids to transmit non persistent viruses. *Advances in Disease Vector Research, K.F. Harris ed. Springer-Verlag, New York vol. 5, 251-287.*
- López-Moya, J.J. (1993). Estudio de la transmisión por áfidos del virus de la sharka, plum pox virus (PPV). *Tesis doctoral E.T.S.I. Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid.*
- Luis Arteaga, M.P. (1989). Virosis y micoplasmosis de pimiento cultivado al aire libre en España Identificación de virus y caracterización de cepas. *Tesis doctoral E.T.S.I. Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid.*
- Maiss, E., Timpe, U., Brisske, A., Jelkmann, W., Casper, R., Himmler, R., Mattanovich, D. y Katinger, H.W.D. (1989). The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA. *Journal of General Virology* 70, 513-524.
- Marco, S. (1993). Incidence of non persistently transmitted viruses in peppers with whitewash, oil and insecticide, alone or combined. *Plant Disease* 77, 1119-1121.
- Matthews, R.E.F. (1991). *Plant Virology, Third edition. Academic Press, San Diego, California.*
- Mavankal, G. y Rhoads, R.E. (1992). In vitro cleavage at or near the amino terminus of the helper component protein of the tobacco vein mottling virus polyprotein. *Virology* 185, 721-731.
- McDonald, J.G., Dristjansson, G.T., Singh, R.P., Ellis, P.J. y McNab, W.B. (1993). Consecutive ELISA screening with monoclonal antibodies to detect potato virus Y N. *American Potato Journal (In press).*
- Moghal, S.M. y Francki, R.I.B. (1976). Towards a system for the identification and classification of potyviruses. *Virology* 73, 350-362.
- Murphy, J. F., Rhoads, R.E., Hunt, A.G. y Shaw, J.G. (1990a). The VPg of tobacco etch virus RNA is the 49 KDa proteinase or the N-terminal 24 KDa part of the proteinase. *Virology* 178, 285-288.

- Murphy, J.F., Rychlik, W., Rhoads, R.E., Hunt, A.G. y Shaw, J.G. (1990b). A tyrosine residue in the small nuclear inclusion protein of tobacco vein mottling virus links the VPg to the viral RNA. *Journal of Virology* 65, 511-513.
- Nakashima, H. Sako, N. y Hori, K. (1993). Nucleotide sequences of the helper component-proteinase genes of aphid transmissible and non-transmissible isolates of turnip mosaic virus. *Archives of Virology* 131, 17-27.
- Nakayashiki, H., Tsuge, S., Kobayashi, K., Okuno, T. y Furusawa, I. (1993). Reasons for the low accumulation level of aphid transmission factor protein in infected leaves with an aphid-non-transmissible cauliflower mosaic virus isolate. *Journal of General Virology* 74, 2469-2472.
- Oh, C.S. y Carrington, J.C. (1989). Identification of essential residues in potyvirus proteinase HC-Pro by site-directed mutagenesis. *Virology* 173, 692-699.
- Pirone, T.P. y Megahed, E. (1966). Aphid transmissibility of some purified viruses and RNAs. *Virology* 30, 631-637.
- Pirone, T.P. (1967). Aphid transmission of a purified stylet-borne virus acquired through a membrane. *Virology* 31, 569-571.
- Pirone, T.P. y Kassanis, B. (1975). Polyaminoacid induced aphid transmission of plant viruses. *Journal of General Virology* 29, 257-266.
- Pirone, T.P. (1977). Accessory factors in non persistent virus transmission. En: *Aphids as virus vectors*. K. Maramorosch y H. Koprowski eds. Ac. Press, New York. 221-235.
- Pirone, T.P. (1981). Efficiency and selectivity of the helper-component-mediated aphid transmission of purified potyviruses. *Phytopathology* 71, 922-924.
- Pirone, T.P. y Thornbury, D.W. (1983). Role of virion and helper component in regulating aphid transmission of tobacco etch virus. *Phytopathology* 73, 872-875.
- Purcifull, D.E. y Hiebert, E. (1992). Serological relationships involving potyviral non structural proteins. *Archives of Virology, supplementum* 5, 97-122.
- Ravelonandro, M., Peyruchaud, O., Garrigue, L., Marcillac, G. y Dunez, J. (1993). Immunodetection of the plum pox virus helper component in infected plants and expression of its gene in transgenic plants. *Archives of Virology* 130, 251-268.
- Restrepo, M.A., Freed, D.D. y Carrington, J.C. (1990). Nuclear transport of plant potyviral proteins. *The Plant Cell* 2, 987-998.
- Restrepo-Hartwig, M.A. y Carrington, J.C. (1992). Regulation of nuclear transport of a plant potyvirus protein by autoproteolysis. *Journal of Virology* 66, 5662-5666.
- Restrepo-Hartwig, M.A. y Carrington, J.C. (1994). The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. *Journal of Virology* 68, 2388-2397.
- Riechmann, J.L., Lafn, S. y García, J.A. (1989). The genome-linked protein and 5' end RNA sequence of plum pox potyvirus. *Journal of General Virology* 70, 2785-2789.

- Riechmann, J.L., Laín, S. y García, J.A. (1992). Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology* 73, 1-16.
- Robaglia, C., Durand-tardif, M., Tronchet, M., Boudazin, G., Astier-Manifacier, S. y Casse-Delbart, F. (1989). Nucleotide sequence of potato virus Y (N strain) genomic RNA. *Journal of General Virology* 70, 935-947.
- Rodríguez, M.D. (1986). Mecanismo de transmisión del virus del mosaico de la coliflor por áfidos. *Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas.*
- Rodríguez-Cerezo, E. y Shaw, J.G. (1991). Two newly detected nonstructural proteins in potyvirus-infected cells. *Virology* 185, 572-579.
- Rodríguez-Cerezo, E., Ammar, E.D., Pirone, T.P. y Shaw, J.G. (1993). Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *Journal of General Virology* 74, 1945-1949.
- Rose, D.G. y Hubbard, A.L. (1986). Production of monoclonal antibodies for the detection of potato virus Y. *Annales of Applied Biology* 109, 317-321.
- Rubio-Huertos, M. y López-Abella, D. (1966). Ultraestructura de células de pimiento infectadas con un virus y su localización en las mismas. *Microbiología Española* 19, 77-86.
- Rubio-Huertos, M. (1978). Atlas on ultrastructure of plant tissues infected with viruses. *CSIC, Madrid.*
- Sako, N. (1980). Loss of aphid transmissibility of turnip mosaic virus. *Phytopathology* 70, 647-649.
- Sako, N. y Ogata, K. (1981). Different helper factors associated with aphid transmission of some potyviruses. *Virology* 112, 762-765.
- Salomon, R. (1992). Proteolytic cleavage of the N-terminal region of potyvirus coat protein and its relation to host recovery and vector transmission. *Archives of Virology, supplementum* 5, 75-76.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual (2nd edition).* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74, 5463-5467.
- Sanz, A., Cambra, M., Pérez de San Roman, J.G., Miguet, E., Cortés, E., Gorris, M.T. y Vela, C. (1990). Preparation of additional monoclonal antibodies for detection and discrimination of potato virus Y isolates infecting potato. *Potato Research* 33, 365-375.
- Shahabuddin, M., Shaw, J.G. y Rhoads, R.E. (1988). Mapping of the tobacco vein mottling virus VPg cistron. *Virology* 163, 635-637.
- Shaw, J.G., Hunt, A.G., Pirone, T.P. y Rhodes, R.E. (1990). Organization and expression of potyviral genes. En: *Viral genes and plant pathogenesis.* T.P. Pirone y J.G. Shaw eds. Springer-Verlag, New York. 107-123.

- Shukla, D.D., Strike, P.M., Tracy, S.L., Gough, K.H. y Ward, C.W. (1988a). The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes. *Journal of General Virology* 69, 1497-1508.
- Shukla, D.D. y Ward, C.W. (1988b). Aminoacid sequence homology of coat proteins as the basis for identification and classification of the potyvirus group. *Journal of General Virology* 69, 7203-7210.
- Shukla, D.D. y Ward, C.W. (1989). Structure of potyvirus coat protein and its application in the taxonomy of the potyvirus group. *Advances in Virus Research* 36, 273-314.
- Soto, M.J., Arteaga, M.L., Fereres, A. y Ponz, F. (1994). Limited degree of serological variability in pepper strains of potato virus Y as revealed by analysis with monoclonal antibodies. *Annales of Applied Biology* 124, 37-43.
- Suzuki, N., Kudo, T., Shirako, Y., Ehara, Y. y Tachibana, T. (1989). Distribution of cylindrical inclusion, amorphous inclusion and capsid proteins of watermelon mosaic virus 2 in systemically infected pumpkin leaves. *Journal of General Virology* 70, 1085-1091.
- Sylvester, E.S. (1956). Beet yellows virus transmission by the green peach aphid. *Journal of Econ. Entomology* 49, 789-800.
- Thole, V., Dalmay, T., Burgyán, J. y Balázs, E. (1993). Cloning and sequencing of potato virus Y (Hungarian isolate) genomic RNA. *Gene* 123, 149-156.
- Thornbury, D.W. y Pirone, T.P. (1983). Helper components of two potyviruses are serologically distinct. *Virology* 125, 487-490.
- Thornbury, D.W., Hellmann, G.M., Rhoads, R.E. y Pirone, T.P. (1985). Purification and characterization of potyvirus helper component. *Virology* 144, 260-267.
- Thornbury, D.W., Patterson, C.A., Dessens, J.T. y Pirone, T.P. (1990). Comparative sequence of the helper component (HC) region of potato virus Y and a HC-defective strain, potato virus C. *Virology* 178, 573-578.
- Thornbury, D.W., Van den Heuvel, J.F.J.M., Lesnaw, J.A. y Pirone, T.P. (1993). Expression of potyvirus proteins in insect cells infected with a recombinant baculovirus. *Journal of General Virology* 74, 2731-2735.
- Towbin H., Staehlin, T. y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76, 4350-4354.
- Van der Vlugt, R.A.A., Leunissen, J. y Goldbach, R. (1993). Taxonomic relationships between distinct potato virus Y isolates based on detailed comparisons of the viral coat proteins and 3'-nontranslated regions. *Archives of Virology* 131, 361-375.
- Vance, V.B., Moore, D., Turpen, T.H., Bracker, A. y Hollowell, V.C. (1992). The complete nucleotide sequence of pepper mottle virus genomic RNA: Comparison of the encoded protein with those of other sequenced potyviruses. *Virology* 191, 19-30.

- Vance, V.B., Jordan, R., edwarson, J.R., Christie, R., Purcifull, D.E., Turpen, T. y Falk, B. (1992). Evidence that pepper mottle virus and potato virus Y are distinct viruses: analysis of the coat protein and 3' untranslated sequence of a California isolate of pepper mottle virus. *Archives of Virology, supplementum 5*, 337-345.
- Verchot, J., Kootin, E.V., and Carrington, J.C. (1992). The 35 KDa protein from the amino terminus of the potyviral polyprotein processing functions as a third virus encoded proteinase. *Virology 185*, 527-535.
- Ward, C.W. y Shukla, D.D. (1991). Taxonomy of potyviruses: current problems and some solutions. *Intervirolgy 32*, 269-296.
- Ward, C.W. (1993). Progress towards a higher taxonomy of viruses. *Research in Virology 144*, 419-453.
- Watson, M.A. y Roberts, F.M. (1939). A comparative study of the transmission of Hyoscyamus virus 3, potato virus Y, and cucumber virus 1 by the vectors *Myzus persicae* (Sulz.), *M. circumflexus* (Buckton) and *Macrosiphum gi* (Koch). *Proceedings of the Royal Society of London, Ser. B.* 127, 543-576.
- Webbs, S. y Linda, S.B. (1993). Effect of oil and insecticide on epidemics of potyviruses in watermelon in Florida. *Plant Disease 77*, 869-875.
- Zeyen, R.J. y Berger, P.H. (1990). Is the concept of short retention times for aphid-borne nonpersistent plant viruses sound?. *Phytopathology 80*, 769-771.
- Zimmern, D. (1987). Evolution of RNA viruses. En: *RNA genetics. J. Holland, E. Domingo y P. Ahlquist eds. CRC Press, Boca Ratón, Florida.* 211-214.