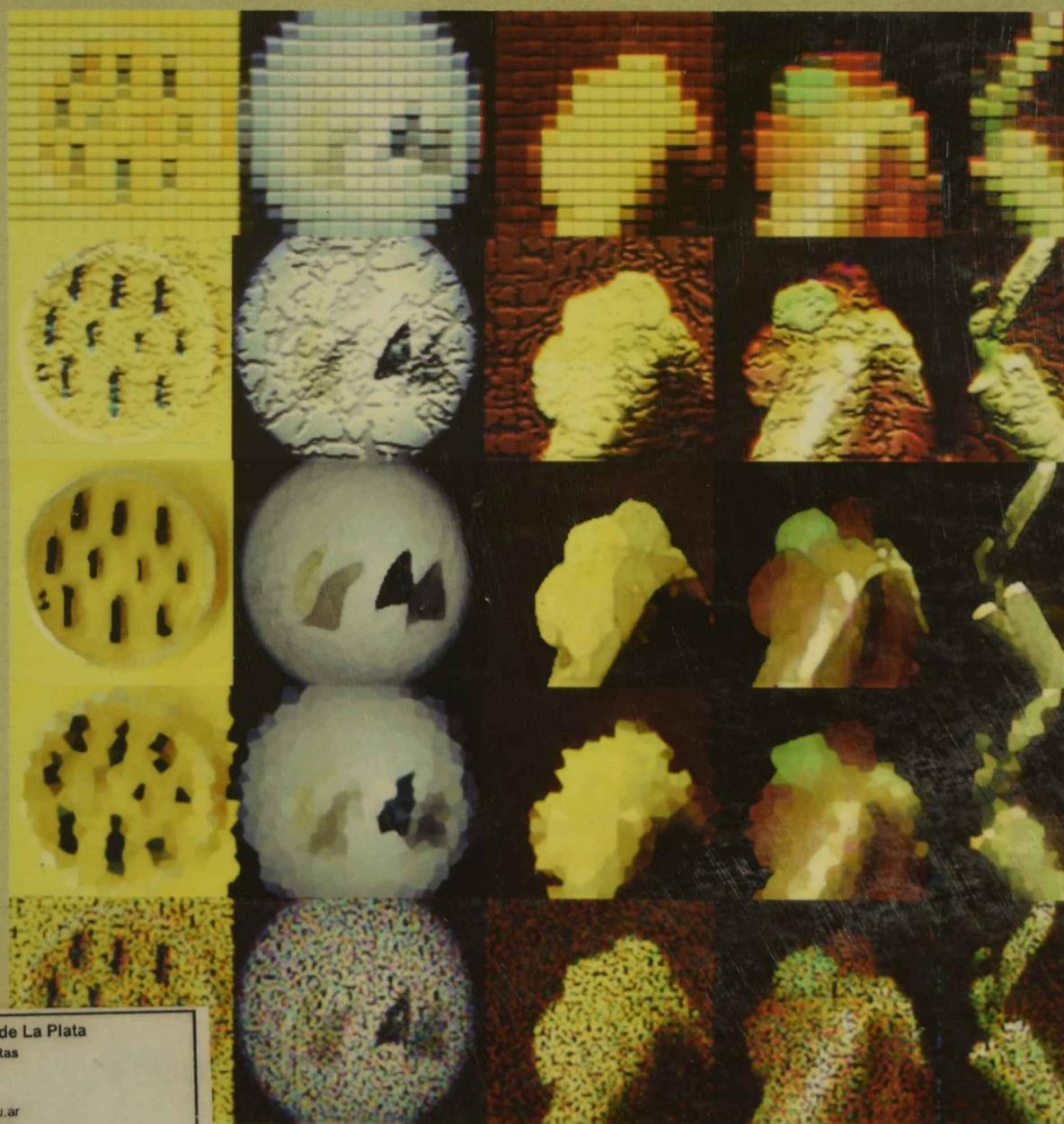




*Resistencia derivada del patógeno
aplicada al virus de la psorosis de los cítricos.
Estudio de la expresión y localización intracelular
de la proteína de cubierta viral.*



DE TESTES
DE 1139

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Biblioteca
50 y 115 1° subsuelo
biblioteca@exactas.unlp.edu.ar
Tel 0221 422-6977/79 int. 129



DEX-58450

María Cecilia Zaneck
Tesis Doctoral
La Plata 2007

07-02-08

El presente trabajo de Tesis, para optar al grado de Doctor en Ciencias de la Facultad de Ciencias Exactas, ha sido realizado en el Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM) del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. María Laura García y la codirección del Dr. Oscar Grau.

Lic. María Cecilia Zaneck
Tesista

Dra. María Laura García
Directora

Dr. Oscar Grau
Co-Director

A mi mamá, Oksana
A mi familia y amigos

Mi reconocimiento,

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por posibilitarme realizar el Doctorado en Ciencias Exactas dentro del ámbito de la Institución.

Al Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM) por brindarme los recursos necesarios para llevar a cabo el presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por las becas otorgadas.

Mi agradecimiento,

A la Dra. María Laura García por su dirección y apoyo académico, su estímulo, por brindarme la posibilidad de concretar este trabajo y confiar en mí.

Al Dr. Oscar Grau, por otorgarme la posibilidad de trabajar en el IBBM, su incentivo durante el transcurso del trabajo y la lectura crítica de esta tesis.

A la Ing. Agr. Norma Costa por el material de cítrico para los experimentos de transformación y todos los experimentos realizados en conjunto. A la Biol. María Inés Plata, por enseñarme los secretos del microinjerto. A la Ing. Agr. Beatriz Stein por colaborar en los experimentos de detección en el NOA.

Al Dr. Elliot Kitayima, por su colaboración en los ensayos de microscopía.

Al Dr. Leandro Peña, por permitir mi estadía en el IVIA, por su ayuda y aliento. A la Dra. Magdalena Cervera, por enseñarme y ayudarme a transformar cítricos. A todos los integrantes de su grupo de trabajo que hicieron muy ameno mi trabajo y mi estadía en España. A Selma por compartir su casa y por su compañía.

Al Dr. Guillermo Docena, por su paciencia y consejos para el desarrollo de mi "veta" inmunológica. Al Dr. Roberto Rule en mi primera ronda de trabajo con conejos y al Dr. Rodolfo Goya por su colaboración en el segundo intento. Al Dr. Federico Sisti por su ayuda en la inoculación, mantenimiento, sangría, etc. de los ratones (gracias Fedé!). A Alina y Marina, con quienes aprendí a infectar células.

A toda la gente del Instituto, pasada y presente, que me ha ayudado en todas esas pequeñas cosas que facilitan y hacen que sea grato el trabajo diario. Gracias por estar siempre dispuestos.

A Gonzalo, con quien empecé en el laboratorio, por hacerme reír. A Eduardo, el "niño" mimado del laboratorio, por ser tan buena persona, brindarme su ayuda desinteresada y compartir la mesada alegrándome el día. A Carina por "resistir" su primer año en el laboratorio poniendo a punto los ensayos de *Northern* y *Southern* que me ayudaron

mucho en la tesis, y por enseñarme otro idioma, el uruguayo. A Vero, que incentivó este último tiempo de escritura, no solo con sahumeros y galletitas, sino también, con su buena compañía. A Darío, tan bueno, que me sufrió como ayudante de Bioquímica y ahora en el laboratorio se ríe de mis chistes malos. En estos últimos meses, a Karelia, por toda su ayuda y estar siempre dispuesta a colaborar para que pueda dedicarme a escribir. A todos, gracias por su afecto y ayuda, por hacer que el trabajo sea gratificante cuando parece que no lo es.

A Martín Sarachu, por compartir tantas charlas y mates. Por ayudarme, junto con Diego, cada vez que lo necesitaba con las computadoras y afines. A Silvia Moya, por ayudarme siempre que se lo requiero. Gracias.

A los que alguna vez compartieron su trabajo de docencia conmigo, sobre todo a Celina y a Tirso, por todo su apoyo en mis inicios como docente.

A mis amigos, de elección (y por añadidura), por estar siempre presentes, por preguntar y preocuparse. Especialmente a Gaby, a Caro y a mi queridísima Flor. A Juli, que “encontré” en la facultad y se convirtió en mi amiga, con la que compartimos un paralelo laboral y de amistad.

Por sobre todo, a mi familia. A mis hermanos, mis cuñado/as y mis sobrinos que me alegran continuamente, por todo su apoyo incondicional y tanto cariño. A mi papá, por educarme y mostrarme el camino correcto. A mi mamá, por haberme criado como lo hizo, por todo el amor que me dió y su confianza.

Y, porque no, le agradezco y dedico a todo aquel que alguna vez me preguntó, ¿seguís con eso de las naranjas?

INDICE

INTRODUCCION GENERAL.....	1
I. Origen de los cítricos y su cultivo.....	3
II. Citricultura Mundial y en Argentina.....	3
III. Enfermedades que afectan el cultivo.....	4
IV. Enfermedades transmisibles por injerto.....	5
V. Psorosis de los cítricos.....	6
V. A. Incidencia de psorosis en Argentina y en el mundo.....	7
V. B. Los síntomas.....	7
V. C. El agente causal.....	10
V. D. Detección de CPsV.....	12
V. E. Control de la enfermedad.....	13
VI. Resistencia derivada del patógeno.....	14
VII. Transformación genética de cítricos.....	17
VII. A. Breve historia.....	17
VII. B. Consideraciones importantes para la transformación de cítricos.....	17
VII. B. 1) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> en cítricos.....	18
VII. B. 2) <i>Uso de fitohormonas y condiciones de cultivo</i>	18
VII. B. 3) <i>Uso de genes marcadores</i>	18
VII. B. 4) <i>Injerto in vitro</i>	19
VII. C. Mejora de cítricos mediante transformación.....	19
OBJETIVOS.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
I. Reactivos químicos.....	24
II. Cepas bacterianas y aislamientos virales utilizados.....	24
II. A. Cepas bacterianas.....	24
II. B. Aislamientos virales.....	25
II. C. Secuencias presentes en banco de datos utilizadas en el análisis de secuencias.....	25
III. Vectores utilizados.....	26
III. A. Vectores de clonado.....	26
III. B. Vectores de expresión.....	26
III. C. Plásmidos binarios.....	27
IV. Primers.....	28
IV. A. <i>Primers</i> diseñados.....	28
IV. A. 1. Específicos para el RNA 1.....	28
IV. A. 2. Específicos para el RNA 2.....	28
IV. A. 3. Específicos para el RNA 3.....	28
IV. B. Otros <i>primers</i> utilizados diseñados previamente.....	28

IV. B. 1. Específicos para el RNA 1 (24K).....	28
IV. B. 2. Específicos para el RNA 2 (54K).....	28
IV. B. 3. Específicos para el RNA 3 (48K).....	29
IV. B. 4. <i>Primers comerciales</i>	29
IV. B. 5. <i>Primers específicos para los plásmidos binarios p35SGUSINT y pBIN19sgfp</i>	29
V. Sueros comerciales utilizados	29
VI. Minipreparación de DNA plasmídico	30
VII. Colony-PCR	30
VIII. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa (<i>Gene clean</i>)	31
IX. Precipitación de productos de PCR utilizando PEG₆₀₀₀	31
X. Preparación de bacterias competentes	31
X. A. Bacterias competentes para el método químico.....	31
X. B. Bacterias competentes para electroporación.....	31
XI. Métodos para la transformación bacteriana	32
XI. A. Mediante <i>shock</i> térmico.....	32
XI. B. Mediante electroporación.....	32
XII. Reacciones enzimáticas utilizadas en Ingeniería genética	32
XII. A. Reacción de <i>Fill-in</i> con el fragmento <i>Klenow</i> de la DNA polimerasa.....	33
XII. B. Desfosforilación de fragmentos de restricción.....	33
XII. C. Ligación de <i>linkers</i>	33
XII. D. Reacciones de ligación.....	33
XII. E. Digestión con enzimas de restricción.....	34
XII. E. 1) <i>Digestión total</i>	34
XII. E. 2) <i>Digestión parcial</i>	34
XIII. Extracción y purificación de partículas virales, RNA, DNA y proteínas	34
XIII. A. Purificación parcial de partículas virales (P54).....	34
XIII. B. Purificación de ácidos nucleicos mediante fenol-cloroformo.....	34
XIII. C. Extracción de RNA.....	35
XIII. C. 1) <i>Utilizando el reactivo TRIZOL</i>	35
XIII. C. 2) <i>Mediante el método descrito por Bekesiova et al. (1999)</i>	35
XIII. D. Extracción de DNA de tejido foliar.....	35
XIII. D. 1) <i>Para Southern blot</i>	35
XIII. D. 2) <i>Para PCR</i>	36
XIV. Métodos utilizados para el análisis de ácidos nucleicos	36
XIV. A. Tratamiento del RNA total con desoxirribonucleasa I (DNasa I).....	36
XIV. B. Obtención del cDNA (reacción de transcripción reversa, RT).....	37
XIV. C. Reacción de RT-PCR en una etapa.....	37
XIV. D. Reacción de PCR.....	37
XIV. E. Obtención de sonda de DNA marcada mediante PCR.....	38
XIV. E. 1) <i>Marcada con DIG-11-dUTP</i>	38
XIV. E. 2) <i>Marcada con $\alpha^{32}P$-CTP</i>	38
XIV. F. <i>Southern blot</i>	38
XIV. G. <i>Northern blot</i>	39
XV. Expresión y purificación de proteínas recombinantes	39

XV. A. Expresión de proteínas en células de insecto utilizando el sistema Bac-to-Bac.....	39
XV. A. 1) <i>Transposición</i>	39
XV. A. 2) <i>Aislamiento del DNA del Bámido recombinante</i>	40
XV. A. 3) <i>Transfección de células Spodoptera frugiperda (Sf9) con el DNA del bámido recombinante</i>	40
XV. A. 4) <i>Infección de células Sf9 para generar stocks virales</i>	41
XV. A. 5) <i>Ensayo de plaqueo viral para determinar el título de los sotcks virales</i>	41
XV. A. 6) <i>Amplificación de stocks virales</i>	41
XV. A. 7) <i>Infección de células para la producción de la proteína recombinante</i>	42
XV. A. 8) <i>Purificación de la proteína 24K mediante columna de afinidad</i>	42
XV. B. Expresión de proteína recombinante en <i>E. coli</i> utilizando el sistema pET.....	43
XV. B. 1) <i>Inducción de proteína recombinante en células bacterianas</i>	43
XV. B. 2) <i>Preparación de fracción periplásmica de células bacterianas</i>	43
XV. B. 3) <i>Precipitación de proteínas mediante TCA</i>	43
XV. B. 4) <i>Purificación de cuerpos de inclusión (CI)</i>	44
XV. B. 5) <i>Purificación de proteína 54K mediante columna de afinidad</i>	44
XV. C. Diálisis de las proteínas purificadas por cromatografía de afinidad.....	44
XVI. Obtención de antisueros policlonales	45
XVI. A. Esquema de inmunización.....	45
XVI. B. Obtención del suero.....	45
XVII. Análisis de las proteínas recombinantes y proteínas expresadas en tejido foliar	45
XVII. A. Extracción de proteínas totales de tejido foliar para ser analizadas mediante <i>Western blot</i>	45
XVII. B. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE).....	49
XVII. C. <i>Western blot</i>	49
XVII. D. <i>Dot blot</i>	50
XVII. E. ELISA indirecto.....	50
XVII. F. Extracción de proteínas totales de tejido foliar para ser utilizadas en el ELISA competitivo secuencial.....	50
XVII. G. Cuantificación de proteínas mediante el método Bradford.....	50
XVII. H. ELISA competitivo secuencial.....	51
XVII. I. TAS-ELISA.....	51
XVII. I. 1) <i>TAS-ELISA-AP</i>	51
XVII. I. 2) <i>TAS-ELISA-HRP</i>	52
XVII. J. Análisis estadístico de los datos de lectura de DO.....	52
XVIII. Transformación y regeneración de cítricos	52
XVIII. A. Procedimiento.....	52
XVIII. B. Dificultades encontradas durante el procedimiento de transformación.....	53
XVIII. C. Ensayos de genes marcadores.....	54
XVIII. C. 1) <i>Reacción histoquímica para GUS</i>	54
XVIII. C. 2) <i>Visualización de fluorescencia por iluminación UV (GFP)</i>	54
XVIII. D. Desarrollo de la plántula transgénica.....	54

XVIII. D. 1) <i>Injerto in vitro</i>	54
XVIII. D. 2) <i>PCR aplicada al análisis de las plántulas transgénicas</i>	55
XVIII. D. 3) <i>Injerto sobre un pie vigoroso en invernáculo</i>	55
XIX. Propagación de líneas transgénicas e inoculación mediante injerto	55
XX. Agroinfiltración de hojas de <i>N. benthamiana</i>	55
XXI. Microscopía confocal	56
XXII. Diagnóstico de la psorosis de los cítricos (Métodos biológicos)	56
XXII. A. Muestras de campo.....	56
XXII. B. Indexing utilizando plantas indicadoras.....	56
XXII. C. Protección cruzada.....	57

CAPÍTULO 1. Obtención de plásmidos recombinantes utilizados durante el desarrollo de la tesis..... 58

I. Construcciones para la generación de las plantas transgénicas que contengan marcos de lectura abiertos de CPsV	60
I. A. Plásmidos que contienen el ORF 24K (RNA 1).....	60
I. A. 1) <i>Obtención del plásmido pGemT-24K</i>	60
I. A. 2) <i>Obtención del plásmido pMOG180-24K</i>	61
I. A. 3) <i>Obtención del vector binario pBIN19sGFP-24K</i>	62
I. B. Plásmidos que contienen el ORF 48K (RNA 3).....	62
I. B. 1) <i>Obtención del plásmido pMOG180-48K</i>	62
I. B. 2) <i>Obtención de los vectores binarios pBIN19sgfp-48K y p35SGUSINT-48K</i>	64
I. C. Plásmidos que contienen el ORF 54K (RNA 2).....	64
I. C. 1) <i>Obtención del plásmido pMOG180 (EIE)</i>	64
I. C. 2) <i>Obtención del plásmido pGemT-54K</i>	66
I. C. 3) <i>Obtención del plásmido pMOG180-54K</i>	66
I. C. 4) <i>Obtención del vector binario p35SGUSINT-54K</i>	67
II. Construcciones para la expresión de proteínas de CPsV en sistemas heterólogos (<i>Escherichia coli</i> y células de insecto)	67
II. A. Plásmidos que contienen el ORF 24K (RNA 1).....	67
II. A. 1) <i>Obtención del plásmido pET22b-24K</i>	67
II. B. Plásmidos que contienen el ORF 54K (RNA 2).....	68
II. B. 1) <i>Obtención del plásmido pET22b-54K</i>	68
II. B. 2) <i>Obtención del plásmido pET30a-54K</i>	68
II. C. Plásmidos que contienen el ORF 48K (RNA 3).....	69
II. D. Obtención de construcciones en vectores que permitan expresar la proteína 24K mediante el sistema Bac-to-Bac.....	69
II. D. 1) <i>Obtención de pFastBacHtb-24K</i>	70
II. D. 2) <i>Obtención de AcNPV-24K</i>	71
III. Construcciones para la expresión de proteínas de CPsV fusionadas a proteínas reporteras para estudios de localización subcelular	71
III. A. Obtención de plásmidos binarios conteniendo proteínas virales fusionadas a GFP (pGDG) y DsRed (pGDR).....	73

CAPÍTULO 2. Desarrollo de herramientas y metodologías para la detección de las proteínas 24K, 48K y 54K de CPsV.....	76
I. Producción de las proteínas heterólogas 24K, 48K y 54K en <i>Escherichia coli</i> y células de insecto.....	78
I. A. Obtención de la proteína 24K.....	79
I. A. 1) <i>Análisis de expresión de la proteína 24K en células de E. coli.....</i>	79
I. A. 2) <i>Obtención de la proteína 24K mediante su expresión en células de insecto utilizando el sistema Bac-to-Bac.....</i>	83
I. A. 2) 1. <i>Transfección de AcNPV-24K en cultivo de células de insecto.....</i>	84
I. A. 2) 2. <i>Optimización de las condiciones de infección de las células de insecto.....</i>	84
I. B. Obtención de la proteína 54K.....	85
I. B. 1) <i>Expresión y purificación de la proteína 54K utilizando el plásmido pET22b-54K.....</i>	85
I. B. 2) <i>Purificación de 54K a partir de su expresión utilizando el plásmido pET30a-54K.....</i>	87
I. C. Obtención de la proteína 48K.....	88
I. C. 1) <i>Expresión y purificación de la proteína 48K utilizando el plásmido pET19b-48K.....</i>	88
II. Obtención de antisueros 24K, 48K y 54K y su titulación mediante inmunoensayos.....	89
II. A. Obtención de antisueros policlonales 48K y 54K a partir de proteína parcialmente purificada (cuerpos de inclusión).....	89
II. A. 1) <i>Inmunización.....</i>	89
II. A. 2) <i>Análisis de los sueros desarrollados.....</i>	90
II. B. Obtención de antisueros policlonales 24K y 54K a partir de proteína purificada por columna de afinidad.....	91
II. B. 1) <i>Inmunización.....</i>	91
II. B. 2) <i>Análisis de los sueros desarrollados.....</i>	91
III. Desarrollo de un método de detección para las proteínas 24K y 54K. aplicando la técnica de ELISA competitivo secuencial.....	93
III. A. Titulación mediante ELISA indirecto.....	93
III. A. 1) <i>Selección de los sueros anti-24K y anti-54K.....</i>	94
III. A. 2) <i>Determinación de la dilución de anticuerpo secundario (anti-IgG).....</i>	94
III. A. 3) <i>Determinación de la dilución del anticuerpo primario.....</i>	95
III. B. ELISA competitivo secuencial.....	96
III. B. 1) <i>ELISA competitivo secuencial (24K).....</i>	98
III. B. 2) <i>ELISA competitivo secuencial (54K).....</i>	99
III. B. 3) <i>Determinación de la concentración de proteína total en las muestras (ensayo Bradford).....</i>	99
IV. Modificación del método TAS-ELISA (HRP) para la detección de la proteína de cubierta viral (48K).....	100
IV. A. Diferentes métodos aplicados a la detección de la proteína 48K en cítricos transgénicos.....	100

IV. B. Modificación del método TAS-ELISA-HRP.....	100
IV. C. Comparación de los métodos TAS-ELISA aplicados a la detección de 48K en cítricos transgénicos.....	101
IV. C. 1) <i>Consideraciones para realizar los cálculos</i>	101
IV. C. 2) <i>Ensayo en muestras de plantas transgénicas 48K</i>	101
CAPÍTULO 3. Búsqueda de resistencia derivada del patógeno mediante la obtención de cítricos transgénicos conteniendo ORFs de CPsV.....	104
I. Obtención de líneas transgénicas 24k, 48k y 54k de naranjo dulce Pineapple.....	107
I. A. Transformación de explantos y regeneración selectiva.....	107
I. B. Selección de brotes transgénicos.....	107
I. B. 1) <i>Análisis de la presencia de quimeras</i>	109
I. B. 2) <i>Análisis de la integración del transgén mediante PCR</i>	109
I. C. Plantas transgénicas establecidas en el invernáculo.....	111
II. Caracterización molecular de las líneas transgénicas obtenidas.....	112
II. A. Análisis de la integridad y el número de copias del <i>cassette</i> de expresión en líneas transgénicas 24K, 48K y 54K.....	112
II. A. 1) <i>Integridad del transgen</i>	113
II. A. 2) <i>Número de copias del transgén</i>	113
II. B. Análisis de la expresión del RNA mensajero en las líneas transgénicas 24K, 48K y 54K mediante <i>Northern blot</i> o RT-PCR.....	115
II. B. 1) <i>Northern blot aplicado al análisis de las líneas transgénicas 48K</i>	115
II. B. 2) <i>RT-PCR aplicada al análisis de las líneas transgénicas 24k y 54k</i>	117
II. C. Análisis de la expresión de las proteínas 24K, 48K y 54K en los cítricos transgénicos.....	117
II. C. 1) <i>Análisis de las líneas transgénicas 48K aplicando el TAS-ELISA- HRP</i>	117
II. C. 2) <i>Análisis de las líneas transgénicas 24K y 54K aplicando ELISAS competitivos secuenciales</i>	120
II. D. Análisis de la metilación del transgén en líneas transgénicas 48K.....	122
III. Evaluación de la resistencia de las líneas transgénicas seleccionadas al virus de la psorosis de los cítricos.....	124
III. A. Primer ensayo de desafío de líneas transgénicas 48K para evaluar su resistencia al virus de la psorosis de los cítricos.....	124
III. B. Segundo ensayo de desafío líneas transgénicas 24K, 48K y 54K para evaluar su resistencia al virus de la psorosis de los cítricos.....	125
III. B. 1) <i>Ensayo de carga viral</i>	126
III. B. 2) <i>Ensayo de desafío de líneas transgénicas 24K, 48K y 54K para evaluar su resistencia al virus de la psorosis de los cítricos aplicando el procedimiento optimizado previamente (Ensayo de carga viral)</i>	127
CAPÍTULO 4. Estudio de la expresión de la proteínas 24K, 48K y 54K y la localización sub-celular de la proteína de cubierta viral de CPsV.....	136

I. Estudio de la expresión de las proteínas virales durante el curso de la infección en hospedantes herbáceos.....	138
I. A. Infección de plantas herbáceas utilizando una purificación parcial de CPsV. Toma de muestra.....	138
I. B. Presencia de la proteína 48K durante el transcurso de la infección local y sistémica.....	139
I. C. Presencia de las proteínas 24K y 54K durante el transcurso de la infección local y sistémica.....	141
II. Análisis de probables secuencias de transporte nuclear en los ORFs 24K, 48K y 54K.....	141
III. Expresión transitoria de las proteínas 24K, 48K y 54K fusionadas a GFP y dsRed en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>.....	144
III. A. Análisis mediante <i>western blot</i> de la expresión transitoria de las proteínas 24K, 48K y 54K en agroinfiltraciones de hojas de <i>N. benthamiana</i>	144
III. A. 1) <i>Proteína 48K</i>	145
III. A. 2) <i>Proteínas 24K y 54K</i>	146
III. B. Análisis de la expresión de los RNA mensajeros 24k y 54k en agroinfiltraciones de hojas de <i>N. benthamiana</i>	147
III. C. <i>Ensayos de co-infiltración con la proteína supresora p19 de TBSV</i>	148
IV. Localización sub-celular de la proteína 48K en hojas de <i>N. benthamiana</i> mediante microscopía confocal.....	149
IV. A. Observación de hojas de <i>N. benthaminana</i> agroinfiltradas mediante microcopía confocal.....	150
 CAPÍTULO 5. Detección de CPsV aplicando el TAS-ELISA – HRP.....	152
I. Ensayo de dilución a punto final para la detección de CPsV.....	155
II. Comparación de los ensayos TAS-ELISA aplicados a muestras de campo..	156
III. Presencia de CPsV en la región citrícola del Noroeste Argentino.....	156
 CONCLUSIONES GENERALES.....	162
 BIBLIOGRAFÍA.....	164
 ANEXO 1: Mapa del plásmido pET30a.....	178
 ANEXO 2: Mapa del plásmido pET19b.....	179
 ANEXO 3: Mapa del plásmido pET22b.....	180
 ANEXO 4: Mapa del plásmido pFastBacHt.....	181
 ANEXO 5: Mapa del plásmido pGEM-T Easy.....	182
 ANEXO 6: <i>Primers</i> y condiciones utilizadas en las reacciones de PCR desarrolladas	

en el trabajo de tesis..... 183

ANEXO 7: Región de transposición del DNA del Bámido en el sistema Bac-to-BacTM 184

ANEXO 8: Detection of *Citrus psorosis virus* in the northwestern citrus production area of Argentina by using an improved TAS-ELISA..... 186

ANEXO 9: Genetic transformation of sweet orange with the coat protein gene of *Citrus psorosis virus* and evaluation of resistance against the virus..... 196

ABREVIATURAS

AIA	ácido indol acético
2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
amiRNA	miRNA artificial
AP	<i>Alkaline Phosphatase</i>
Ap	Ampicilina
ATP	adenosina 5'-trifosfato
B	<i>Bottom</i>
BAP	6-bencilaminopurina
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolyl-phosphate
BH	<i>buffer</i> de homogenización
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
°C	grados Celsius
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CI	cuerpos de inclusión
CIP	<i>calf intestinal Phosphatase</i>
CP	proteína de la cápside
CTAB	hexadecyltrimethyl-ammonium bromide
dCTP	2'-deoxicitosina 5'-trifostato
α ³² P-CTP	α ³² P-2'-deoxicitosina 5'-trifostato
DIG-11-dUTP	DIG-11-2'-deoxiuracilo 5'-trifostato
DNA pol	DNA polimerasa dependiente de DNA
DNA	ácido 2' desoxirribonucleico
DNasa	deoxirribonucleasa
dNTPs	2'-deoxirribonucleósidos 5-trifosfato
DO	densidad óptica
DTT	dithiothreitol
dTTP	2'-deoxitiamina 5'-trifostato
EDTA	<i>etilen diamine tetra acetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
g	gramo(s)
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Gm	Gentamicina
GUS	<i>β-glucuronidase</i>
2iP	2-isopentenil adenina
h	hora(s)
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
hpRNA	RNA tipo <i>hairpin</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactósido
KCl	cloruro de potasio
kDa	kilodaltons
KH ₂ PO ₄	fosfato de potasio monobásico
Kn	Kanamicina

KOH	hidróxido de potasio
LB	<i>Luria Bertoni</i>
LiCl	cloruro de litio
LP	<i>Long Pass</i>
M	molar
μCi	microcurie
μF	microfaradios
μg	microgramo(s)
μl	microlitro(s)
μM	micromolar
mg	miligramo(s)
MgSO ₄	sulfato de magnesio
min	minuto(s)
miRNA	micro-RNA(s)
ml	mililitro(s)
mM	milimolar
mmol	milimol
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
mRNA	RNA mensajero
MS	sales Murashige y Skoog
N x g	número multiplicado por la aceleración de la gravedad
N	normal
Na ₂ HPO ₄	fosfato de sodio dibásico
NaCl	cloruro de sodio
NaI	ioduro de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
NBT	nitro blue tetrazolium
NEA	Nordeste Argentino
NES	<i>nuclear export signal</i>
ng	nanogramo(s)
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
nm	nanómetro(s)
NOA	Noroeste Argentino
nt	nucleótido(s)
OPD	orto-fenilendiamina
Ω	ohms
pb	pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDR	<i>Pathogen-Derived Resistance</i>
PEG	polientilenglicol
Pfu pol	DNA polimerasa de <i>Pyrococcus furiosus</i>
PFU	unidades formadoras de placa
PM	peso molecular
PMSF	<i>α-toluen sulphonyl fluoride</i>

% p/v	porcentaje peso en volumen
% v/v	porcentaje volumen en volumen
P _{PH}	promotor de poliedrina
PTGS	<i>Post-Transcriptional Gene Silencing</i>
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
PVP	polivinilpirrolidona
RdRp	RNA polimerasa dependiente de RNA
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	ácido ribonucleico
RNasa	ribonucleasa
RNasin®	ribonuclease inhibitor
RT	reverse transcription
SB	<i>Sample buffer</i>
SDS	<i>sodium dodecil sulfate</i>
seg	segundo(s)
SFM	<i>serum free medium</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SSC	salt sodium citrate
T	<i>Top</i>
TAE	Tris-acetato-EDTA
Taq pol	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
TB	<i>Terrific Broth</i>
TBS	<i>Tris buffer saline</i>
Tc	tetraciclina
TCA	ácido tricloroacético
TE	Tris-EDTA
TGS	<i>Transcriptional Gene Silencing</i>
t	tonelada(s)
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
tRNA	RNA de transferencia
UV	ultravioleta
V	Volts
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido
X-Gluc	5-Bromo-4cloro-3-indolil-β-D-glucuronic acid cycloheximide salt



INTRODUCCION GENERAL

- I. Origen de los cítricos y su cultivo**
- II. La citricultura en el mundo y en Argentina**
- III. Enfermedades que afectan el cultivo**
- IV. Enfermedades transmisibles por injerto**
- V. Psorosis de los cítricos**
- VI. Resistencia derivada del patógeno**
- VII. Transformación genética de cítricos**



I. Origen de los cítricos y su cultivo

Se considera que el sudeste asiático y el archipiélago malayo son el centro de origen y diversidad de los cítricos y sus géneros relacionados. La ruta exacta de dispersión de los cítricos desde su origen es desconocida pero son mencionados en escrituras de algunas culturas antiguas. Se cree que algunas especies de cítricos, incluyendo los cidros, naranja amarga y limones se diseminaron lentamente (del 500 al 1300 DC) a través de amplias áreas incluyendo Europa por sucesivas olas de invasores y viajeros, como el ejército musulmán, los comerciantes árabes, los cruzados y otros movimientos a través de las rutas comerciales. Posteriormente, fueron introducidos en América de la mano de los conquistadores españoles y portugueses.

Actualmente, los cítricos son cultivados en diversas regiones del mundo donde las condiciones ambientales lo permiten, con un clima tropical y subtropical, en zonas comprendidas entre los paralelos 40° N y 40° S. Son apreciados tanto por su calidad alimenticia, como fuente de fragancias y por su uso medicinal.

Dentro de la citricultura se utilizan especies e híbridos pertenecientes a los géneros *Citrus*, *Poncirus* y *Fortunella* de la familia *Rutaceae*. Dentro del género *Citrus* se consideran tres especies verdaderas: *C. reticulata* (mandarina), *C. grandis* (pomelo) y *C. médica* (cidro), siendo todas las restantes híbridos de estas tres (Moore, 2001).

Debido a la facilidad de injerto de los cítricos, todos los cultivos para uso comercial se obtienen injertando las especies cultivares deseadas sobre un pie determinado seleccionado por su resistencia a las enfermedades, a las condiciones climáticas, al tipo de suelo, etc. Tanto los portainjertos como las yemas utilizadas comercialmente pertenecen al género *Citrus*, la excepción la constituyen los kinotos (*Fortunella* ssp.), muy apreciados por sus frutos y el naranjo trifoliado (*Poncirus trifoliata*) que se usa exclusivamente como pie.

II. La citricultura en el mundo y en Argentina

La producción mundial de cítricos para el año 2006 superó los 72 millones de toneladas. El total consistió en 47 millones de t de naranja, 15 millones de t de mandarinas, 4.3 millones de t de limones, 4 millones de t de pomelos y 2.4 millones de t de otros cítricos. Los países con mayor producción cítrica son: Brasil, China, Estados Unidos, México, España, Italia, Argentina, Turquía, Egipto y Sudáfrica. De acuerdo con las últimas estadísticas disponibles los países del Hemisferio Norte son los mayores productores de cítricos, con el 58% de la producción mundial; el resto proviene de los países del Hemisferio Sur donde el grueso de la producción se concentra en 5 países: Brasil, Sudáfrica, Nueva Zelanda, Uruguay y Argentina, la cual participa con un 80% de la producción de limones del Hemisferio Sur (1er productor mundial), un 40% de la producción de pomelo y casi 4% de la producción de naranja (Lic. Andrea Dansa, Mercados Frutihortícolas, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, <http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/agricultura/otros/frutas/perfiles/citricos.php>)

Dentro de la fruticultura nacional el sector cítrico argentino es el segundo en importancia desde el punto de vista económico y social, detrás de la vitivinicultura

comprendida por la uva para vinificar y de mesa. En el país la citricultura se desarrolla sobre una superficie de 147.466 hectáreas, de las cuales el 37,5% corresponde a plantaciones de naranja, el 24,5% de mandarina, el pomelo alcanza el 8,3% y el limón aporta el 29,7%. La actividad cítrica Argentina se desarrolla principalmente en regiones bien definidas; la región noroeste (NOA: Salta, Jujuy, Tucumán y Catamarca), la región mesopotámica (NEA: Misiones, Corrientes y Entre Ríos), el nordeste de Buenos Aires y el resto del país (Formosa, Santa Fe y Chaco). La producción de cítricos relativa por especies y región muestra una marcada especialización regional; así se observa que la región del NOA aporta el 95 % del limón y el 77% de pomelos producidos en el país, mientras que la región del NEA participa con el 57% del total de naranjas y con el 86 % de mandarinas (Ing. Agr. Víctor Juan Luppiz. Producción de Cítricos en Argentina. Dirección de Agricultura, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, <http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/agricultura/otros/frutas/citricos/citrikos2004.pdf>).

Durante el 2005 las exportaciones de frutas frescas fiscalizadas por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) sumaron 1.456.644 t. De ese total, las exportaciones de cítricos durante todo el 2005 fueron de 660.364 t. El principal producto exportado fue el limón con 379.462 t mientras que los envíos de mandarina y de pomelo fueron de 72.275 y 35.813 t, respectivamente y el resto, de naranjas y otras frutas (Informe SENASA, 2006).

III. Enfermedades que afectan el cultivo

El cultivo de cítricos, no solo puede verse afectado por estreses abióticos debido a las condiciones del suelo (ácido, arenoso, salino, etc.) y las condiciones climáticas (sequías, heladas, inundaciones, etc.) donde se cultivan, sino que puede resultar sometido a gran número de plagas y enfermedades cuyas causas pueden ser insectos, hongos, bacterias, virus, viroides, micoplasmas, además de otros organismos no identificados, algunos de los cuales inducen enfermedades conocidas como "declinamientos".

En la Argentina existen diversas enfermedades que afectan el cultivo entre las que se pueden citar las enfermedades cuarentenarias, tales como la cancrrosis de los cítricos producida por la bacteria *Xantomonas campestris pv citri*, la mancha negra producida por el hongo *Guignardia citricarpa*, la Mosca de los frutos (*Ceratitis capitata* y *Anastrepha fraterculus*) y la sarna de los cítricos, producida por hongos (*Elsinoe fawcettii* y *E. australis*), enfermedad que produce grandes pérdidas económicas especialmente en el cultivo de mandarinas para consumo en fresco. Otra enfermedad importante es la clorosis variegada de los cítricos producida por *Xylella fastidiosa*. También se presentan diversas plagas que afectan la producción como el minador de las hojas de los cítricos producido por una polilla (*Phyllocnistis citrella*) y los ácaros (del tostado, de la lepra y ácaro rojo). En las zonas húmedas, o cuando las condiciones ambientales son propicias, se puede desarrollar la podredumbre de las raicillas causada por diversos hongos del género *Phytophthora*, que afecta principalmente el tronco del árbol. En las plantaciones antiguas, debido a la falta de recaudos sanitarios (por ejemplo, uso de yemas no certificadas) es fácil encontrarlas afectadas por enfermedades transmisibles por injerto, causadas principalmente por diversos virus y viroides. En el siguiente apartado se describen las

características de estas enfermedades, en especial, la psorosis de los cítricos, objeto de estudio de la presente tesis.

IV. Enfermedades transmisibles por injerto

Los cítricos son afectados por gran número de enfermedades que pueden transmitirse al momento de realizar el injerto y se caracterizan porque los agentes que las producen están presentes en el material vegetal y son capaces de propagarse en el tejido receptor. Algunas de estas enfermedades se han asociado a virus, viroides, bacterias, micoplasmas, etc., aunque en la mayoría de ellas, no se ha podido aislar e identificar el agente causal y es normal encontrar varios virus en una misma planta. En muchos países como la Argentina casi la totalidad de las plantas adultas están afectadas por alguna virosis. Las principales enfermedades causadas por este tipo de microorganismos son tristeza, psorosis, exocortis y cachexia. Se estima que en el mundo las enfermedades transmitidas por injerto ocasionan pérdidas en la producción del 15 al 25% (Moreno *et al.*, 1990). Algunas de estas enfermedades, además de transmitirse por injerto, pueden ser transmitidas mecánicamente a través de las herramientas de trabajo o por insectos vectores, lo que incrementa su incidencia en la citricultura. En algunos casos, la infección de los árboles puede provocar pérdidas directas del cultivo por cese de la producción así como ejercer daños indirectos provocando pérdida de vigor y de longevidad de la planta, decaimiento del crecimiento, disminución del tamaño y la calidad de los frutos, o restricciones en la elección de portainjertos.

El control de las enfermedades transmisibles por injerto se realiza actualmente mediante saneamiento y certificación del material vegetal propagativo. Para realizar el saneamiento y obtener plantas libres de virus se parte de plantas de variedades cítricas agrónomicamente interesantes. Las técnicas aplicadas para la eliminación de los patógenos, como la termoterapia y la obtención de plantas nucelares, se han usado con éxito, así como el microinjerto de ápices caulinares *in vitro* (Navarro *et al.*, 1975), el cual se utiliza actualmente en gran parte de los países citrícolas que tienen programas de eliminación de virus y viroides. Con la combinación de la termoterapia y del microinjerto es posible obtener un elevado porcentaje de plantas cítricas libres de virus y viroides. Una vez obtenida la planta por dichas técnicas se somete a pruebas de comprobación sanitaria como ensayos biológicos, inmunoquímicos, serológicos, moleculares, etc. para asegurar que la planta se encuentra libre del patógeno. En la Argentina el PROCITRUS (Programa de Mejoramiento Varietal y Sanitario en Citrus) es un programa desarrollado por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) que tiene como objetivo la obtención, producción, mantenimiento y distribución de material cítrico con identidad varietal y estado sanitario controlados (Costa *et al.*, 2004). El Proyecto está conformado por el Centro Único de Introducción y Saneamiento (CUIS) ubicado en el INTA Concordia, Entre Ríos, responsable de la introducción de variedades, su saneamiento, el análisis de enfermedades para confirmar su sanidad y la centralización de la información referente a las variedades disponibles; el Centro Proveedor de Material Controlado (CPMC) ubicado en la EEA Catamarca del INTA, donde se realiza el mantenimiento de las Plantas Madres y la provisión de material de propagación a las diferentes regiones y Centros de

Incremento Regionales (CIR), ubicados en Concordia y Tucumán, responsables del incremento y la distribución de material de propagación a los productores y viveristas que lo requieran.

V. Psorosis de los cítricos

La psorosis fue la primera enfermedad estudiada de las virosis conocidas que afectan los cítricos, además de ser la primera en la que su síndrome completo fue reproducido a partir su transmisión por injerto, asociándole una naturaleza probablemente viral a la enfermedad (Fawcett, 1932). Fue originalmente descrita en 1896 por Swingle y Webber como una enfermedad relacionada con síntomas de descamaciones en tronco y ramas en el árbol afectado, lo que dio origen al nombre de la enfermedad.

En 1938, Fawcett y Klotz describieron dos tipos de descamación producida por psorosis, una denominada psorosis A que se caracteriza por la descamación lenta del tronco y las ramas principales, y otra forma, denominada psorosis B, más agresiva, donde los síntomas de descamación se producen más rápidamente incluso en ramas delgadas. Además, se asociaron otros síntomas a esta forma más virulenta de psorosis, como manchas cloróticas persistentes en hojas adultas y anillos incoloros en frutos.

Wallace, en 1945, mostró que cuando las yemas tomadas de árboles sospechosos eran injertadas a plantas de naranjo dulce, se producía reacción de *shock* y síntomas en hojas jóvenes, lo que fue tomado como diagnóstico de psorosis.

En 1957 se demostró que ambos tipos de psorosis, A y B, no eran diferentes enfermedades sino que estaban relacionadas. Esto se realizó mediante ensayos de protección cruzada, donde la corteza (sin síntomas) proveniente de un árbol infectado con psorosis A inoculada a un naranjo dulce de invernáculo era capaz de proteger contra el desafío con psorosis B (Wallace, 1957). A partir de ese momento se utilizó este ensayo de protección cruzada para diagnosticar psorosis A y estudiar su relación con otras enfermedades relacionadas.

En 1968, Wallace y Drake describieron otra enfermedad transmitida por injerto, *citrus ringspot*, la cual mostraba flecos cloróticos característicos de psorosis A y además presentaba manchas amarillentas, a veces en forma de anillos, que persistían en las hojas adultas. Aunque al inicio se consideró una enfermedad separada de psorosis, posteriormente Timmer (1974) determinó que la fuente original, así como otros aislamientos, eran capaces de proteger contra psorosis B.

Por mucho tiempo junto con la psorosis A, la psorosis B y *citrus ringspot*, se agruparon otras enfermedades como *concave gum*, *blind pocket*, *infectious variegation*, *crinkly leaf*, impietratura y cristacortis en el denominado "grupo psorosis" en base a su asociación con la presencia de flecos cloróticos en hojas jóvenes. Sin embargo, dado que los síntomas de estas enfermedades en campo son diferentes y no son capaces de proteger contra psorosis B, posteriormente fueron consideradas enfermedades diferentes, quedando incluidas bajo los mismos síntomas, psorosis y *citrus ringspot*, las cuales comparten características comunes, como ser transmisibles a *Chenopodium quinoa* (Garnsey y Timmer, 1988). Además, a partir de aislamientos provenientes de dichas enfermedades se purificaron partículas con propiedades biológicas similares (Derrick *et al.* 1988, García

et al. 1991a, Navas-Castillo et al. 1993). Por lo tanto, actualmente, se las considera dos síndromes de la misma enfermedad.

En la Argentina y Uruguay se han reportado formas muy severas de la enfermedad que producen una descamación rampante que suele afectar todo el árbol ocasionándole la muerte.

V. A. Incidencia de psorosis en Argentina y en el mundo

El desarrollo de la enfermedad es lento y los síntomas aparecen en árboles de 10 a 15 años de edad, cuando han llegado a su etapa de máxima producción de fruta. Esta ausencia de síntomas aparentes ha provocado que los agricultores propagasen, sin advertirlo, yemas infectadas con psorosis lo que influyó en la incidencia de la enfermedad en el cultivo de cítricos. Se han observado síntomas de psorosis en muchas zonas cítricas del mundo. La distribución de la enfermedad esta bien documentada y confirmada en América, África y en la costa mediterránea.

En muchos países la introducción de variedades de yemas no autóctonas infectadas, pero comercialmente importantes, provocó el desarrollo de la enfermedad, ocasionando grandes pérdidas en Estados Unidos, Argentina, Brasil, Israel, España, China, Uruguay y Egipto (Wallace, 1978).

Posteriormente se aplicaron programas de saneamiento basados en la utilización de yemas libres de virus y plantas de origen nuclear (Navarro et al., 1980) a fin de obtener cítricos libres de la enfermedad. Estos programas han logrado controlar la psorosis en la mayoría de los países donde se han aplicado. Sin embargo, en la región mesopotámica argentina y en San Pedro (Provincia de Buenos Aires), el programa de saneamiento implementado ha sido efectivo pero no lo suficiente para controlar la enfermedad, la cual causa importantes pérdidas económicas (Larocca, 1985, Danós 1990). En estas regiones, frecuentemente, se encuentran árboles con descamación en el tronco, incluso en plantas de semilla de origen nuclear, resultando así, la psorosis una epidemia difícil de erradicar. No hay evidencia experimental que la enfermedad pueda ser transmitida por polinización de flores o a través de las semillas (Roistacher, 1993). Observaciones epidemiológicas en Argentina y Texas (USA) sugieren que la enfermedad se disemina naturalmente (Pujol y Beñatena, 1965, Timmer y Garnsey, 1980, Beñatena y Portillo, 1984) pero no se ha podido determinar el vector asociado a esta dispersión natural. Un artículo preliminar, publicado recientemente, ha reportado la presencia de psorosis en Texas (Palle et al., 2004) cuya dispersión parece asociarse a un vector de suelo, *Olpidium brassicae*.

V. B. Los síntomas

La psorosis es una enfermedad asociada con síntomas de descamaciones en tronco y ramas jóvenes, principalmente en naranjo dulce y pomelo. Los limoneros y los naranjos amargos son susceptibles a la infección pero no muestran descamación y las mandarinas satsumas y clementinas solo ocasionalmente muestran este síntoma. En general, por debajo de la descamación se produce la desintegración de algunos elementos del xilema con formación de goma que impregna la madera y llega a obstruir los vasos con la consecuente disminución de la conducción de agua, lo que causa decaimiento progresivo

y, a veces, la muerte de las ramas afectadas (Figura 1). Esta acumulación de goma, con el tiempo, se vuelve parda y mancha la madera que puede observarse en cortes transversales de las zonas descamadas del tronco (Figura 2). Estos síntomas han sido usados para el diagnóstico de psorosis en el campo (Roistacher, 1991, Roistacher, 1993).



Figura 1. Síntomas de descamación en árboles de campo. Gentileza de la Ing. Agr. N. Costa, EEA-INTA, Concordia, Entre Ríos.

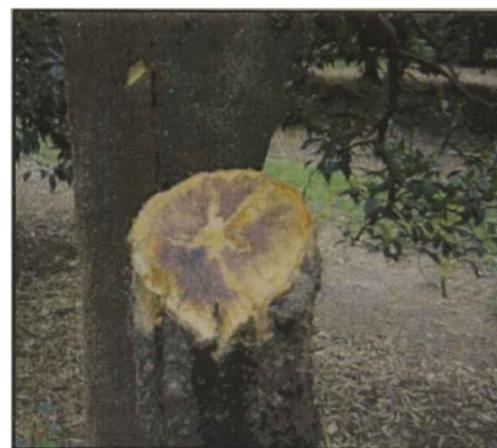


Figura 2. Corte transversal de una zona descamada del tronco afectado por psorosis donde puede apreciarse que la acumulación de goma provocó manchas pardas a la madera. Gentileza de la Ing. Agr. B. Stein, EEOC, Tucumán.

En el campo, además del descamado, otro síntoma particular es la presencia de flecos cloróticos y anillos en hojas jóvenes (Figura 3), los cuales aparecen como espacios aclarados entre las venas laterales de las hojas (Wallace, 1957). Estos síntomas pueden generarse en toda la hoja o solo afectar alguna parte de ella y suelen desaparecer a medida que la hoja madura. Sin embargo, los árboles afectados por psorosis B generalmente presentan manchas amarillentas en el haz de las hojas maduras, las cuales se corresponden con pequeños depósitos de goma parda en el envés (Figura 4). Los aislamientos de psorosis denominados *ringspot* muestran síntomas de manchas o anillos cloróticos en las hojas maduras y, a veces, en frutos. En algunos aislamientos, estos síntomas se presentan asociados a una descamación virulenta del tronco.



Figura 3. Presencia de flecos cloróticos y anillos en hojas jóvenes de un árbol de campo infectado con psorosis. Gentileza de la Ing. Agr. N. Costa, EEA-INTA, Concordia, Entre Ríos.

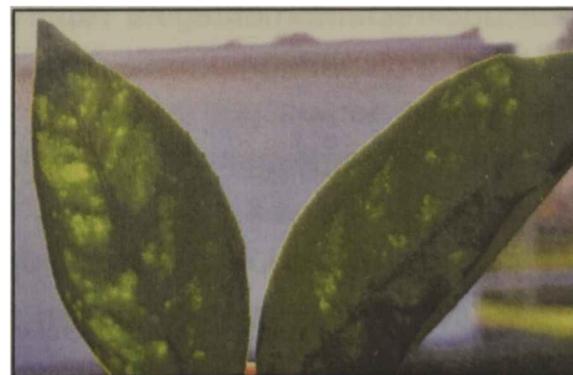


Figura 4. Manchas amarillentas en hoja madura de un árbol afectado por psorosis B. Gentileza de la Ing. Agr. B. Stein, EEAOC, Las talitas, Tucumán.

Los síntomas foliares son también manifestados experimentalmente, inoculando por injerto plantas de semilla mantenidas en el invernáculo a 18-24 °C. Las plantas indicadoras de naranjo dulce de las variedades Pineapple, Olivelihoods o Madam Vinous son los indicadores biológicos comúnmente usados para el *indexing* de psorosis A (Roistacher, 1993) aunque también podrían utilizarse otras especies como mandarina Temple (*C. reticulata* Blanco) y limón Rugoso (*C. jambhiri* Lush.) (García *et al.*, 1991b). En este ensayo, muchos aislamientos causan una reacción de *shock* con necrosis del brote en la primera brotación (Figura 5), seguida de flecos cloróticos y anillado foliar en las sucesivas brotaciones. Existe gran variación en la intensidad de los síntomas de psorosis según las variedades afectadas, los aislamientos de virus presentes y la época del año.



Figura 5. Reacción de *shock* de una planta indicadora de naranjo dulce Pineapple inoculada mediante injerto con el aislamiento 90-1-1 de psorosis A, Concordia, Argentina.

La psorosis puede ser transmitida mecánicamente a plantas herbáceas. En *Chenopodium quinoa* y *Gomphrena globosa* dicha inoculación causa lesiones locales cloróticas que posteriormente se vuelven necróticas (Figura 6). En *G. globosa* se desarrolla una infección sistémica produciéndose lesiones locales en hojas superiores no inoculadas. En 1988, Garnsey y Timmer pudieron transmitir mecánicamente un aislamiento de *ring spot* de cidro a *C. quinoa*. Luego, a partir de una única lesión de *C. quinoa* lograron infectar *G. globosa* y de ésta a cidro, el cual mostró los síntomas característicos de *ring spot*. Cuando se inoculó naranjo dulce mediante injerto con material proveniente del cidro infectado, la planta presentó síntomas de descamado, indicando que el agente presente en la *C. quinoa* sintomática era capaz de reproducir los síntomas de psorosis.

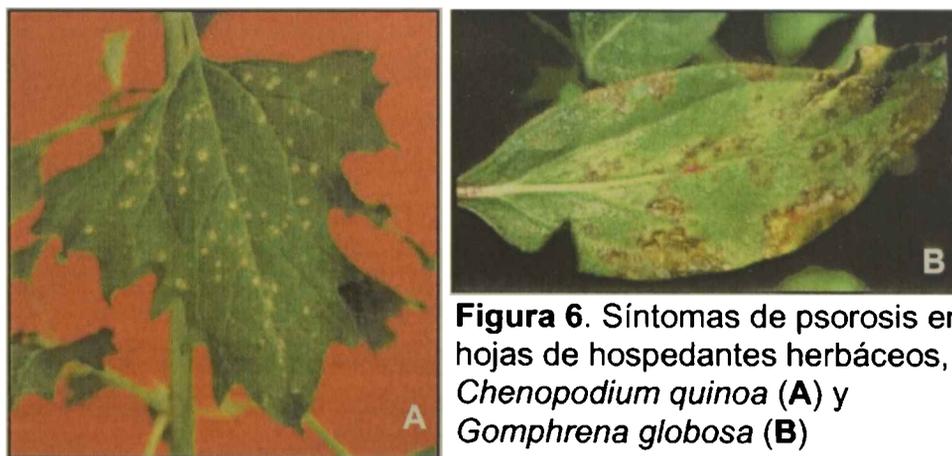


Figura 6. Síntomas de psorosis en hojas de hospedantes herbáceos, *Chenopodium quinoa* (A) y *Gomphrena globosa* (B)

V. C. El agente causal

A partir de diferentes aislamientos de psorosis se ha podido purificar el agente causal de la enfermedad, *Citrus psorosis virus* (CPsV) (Derrick *et al.*, 1988; da Graça *et al.*, 1991; García *et al.*, 1991a, Navas-Castillo y Moreno, 1993).

Las partículas virales son nucleocápsides no envueltas circulares de 3 nm de diámetro, las cuales adoptan varias conformaciones, desde muy enrollada hasta una forma sinuosa circular abierta (Figura 7), poseen diferentes tamaños y pueden ser separadas en dos componentes (*T*, *Top* y *B*, *Bottom*) mediante centrifugación en gradiente de sacarosa, los cuales no son infectivos separadamente. Las partículas más cortas, presentes en el componente T, poseen una longitud estimada entre 690-760 nm y las partículas más largas, presentes en el componente B, son alrededor de 5 veces mayores (aprox. 2000 nm). Las partículas circulares, que muy probablemente están cubiertas por una única proteína de la cápside (Derrick *et al.*, 1988, García *et al.*, 1991a), pueden colapsar *in vitro* para formar estructuras cerradas que pueden estar parcialmente ramificadas con alrededor de la mitad de la longitud del contorno circular y un diámetro de 9 nm (García *et al.*, 1994; Milne, 2000).

El virus es segmentado y su genoma consiste en tres RNAs de simple cadena de polaridad negativa. La proteína de la cápside posee un tamaño determinado por su movilidad electroforética que varía entre 46-50 kDa dependiendo del aislamiento (Derrick *et al.*, 1988; García *et al.*, 1991a, Navas-Castillo y Moreno, 1995).

En los últimos años se ha logrado secuenciar totalmente el genoma del aislamiento CPV-4 de Florida. La figura 7 muestra la organización genómica de CPsV. El RNA1, con una longitud de 8184 nt, en su secuencia complementaria codifica para dos ORFs. Hacia

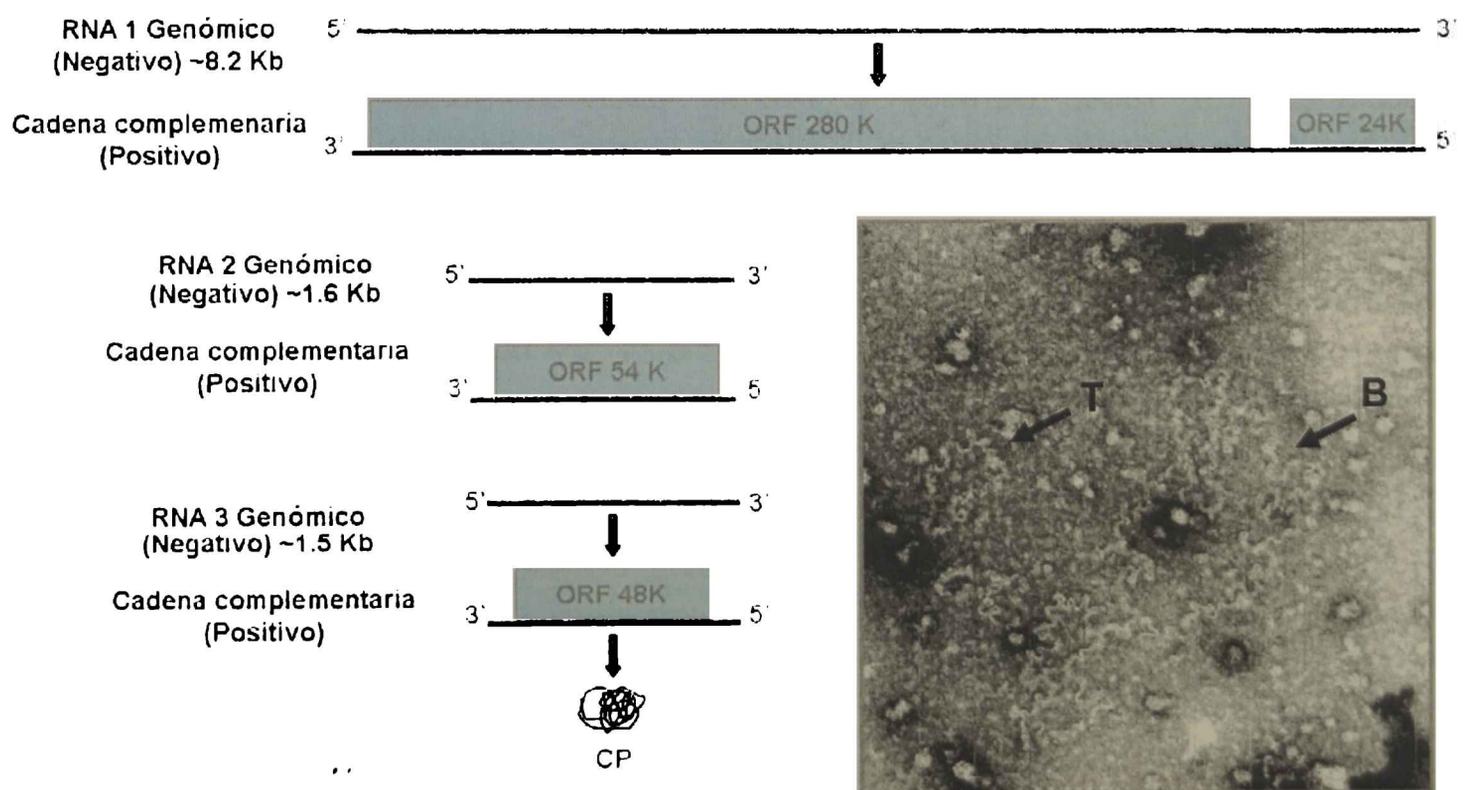


Figura 7. Organización genómica de CPsV. Se muestra una microscopía electrónica del virus donde se señalan partículas de forma sinuosa circular abierta del componente T y B. Gentileza del Dr. Robert Milne, Istituto di Virologia Vegetale, Torino, Italia.

el 5' terminal se encuentra el primer ORF, que codifica para un polipéptido de 24kDa de función desconocida (24K) y separado por una región intergénica de 109 nt, un segundo ORF codifica para la RNA polimerasa (280kDa) (Naum-Onganía *et al.* 2003). El RNA 2, de 1644 nt, contiene un ORF que codifica para un polipéptido de 54,7 kDa de función desconocida (54K), que al igual que el 24K, no tiene homología con otras secuencias presentes en los bancos. La región 3' terminal del RNA2 posee una probable señal de poliadenilación (Sanchez de la Torre *et al.*, 2002). El RNA 3, de 1454 nt, codifica para la proteína de la cápside (CP) de 48,6 kDa (48K) (Sánchez de la Torre *et al.* 1998, 2002). No se han encontrado RNAs subgenómicos o defectivos en preparaciones de RNAs provenientes de tejido infectado con CPsV (García *et al.*, 1997; Barthe *et al.*, 1998; Sanchez de la Torre *et al.*, 1998, 2002; Naum-Onganía *et al.*, 2003). Las tres regiones 3' terminales de los RNAs virales son muy similares, con una secuencia conservada de 12 nucleótidos A₇GUAUC, la cual podría estar involucrada en el reconocimiento de los RNAs por la RNA polimerasa viral, mientras que sus extremos 5' terminal difieren considerablemente en secuencia (Naum-Onganía *et al.*, 2003).

CPsV es el miembro tipo del género *Ophiovirus* (García *et al.* 1994; Milne *et al.* 2003) el cual es uno de los pocos géneros de virus negativos que infectan plantas. Las otras especies que lo constituyen son *Lettuce ring necrosis virus* (LRNV) (Torok y Vetten, 2002), *Mirafiori lettuce big-vein virus* formalmente llamado Mirafiori lettuce virus (MiLV) (Roggero *et al.*, 2000; Lot *et al.*, 2002; van der Wilk *et al.*, 2002), *Ranunculus white mottle virus* (RWMV) (Vaira *et al.*, 1997, 2003) y *Tulip mild mottle mosaic virus* (TMMMV) (Morikawa *et al.*, 1995). También existe una especie tentativa: *Fressia ophiovirus virus* (FOV) (Vaira *et al.*, 2003, Vaira, 2006).

Todos estos virus presentan morfologías similares, un genoma segmentado de RNA simple cadena de similar tamaño, entre 11.3 a 12.5 kb y poseen entre tres y cuatro segmentos. CPsV no está serológicamente relacionado con los otros ophiovirus pero el RNA 3 y su producto de expresión, la CP, posee una identidad de secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de 46.5% y 30.9%, respectivamente, con el aislamiento japonés de MiLV (Kawazu *et al.*, 2003). La probable RNA polimerasa de CPsV tiene similitud de secuencia aminoacídica con la proteína 263K de MiLV y con la secuencia parcial publicada de RWMV haciendo que su análisis los incluya en un nuevo género relacionado a otros virus negativos del orden Mononegavirales (Naum-Onganía *et al.*, 2003). De acuerdo al análisis de la proteína están relacionados a los géneros *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae* y *Rhabdoviridae* (Naum-Onganía *et al.*, 2003; Vaira *et al.*, 2003; van der Wilk *et al.*, 2002). También tiene similitud con *Lettuce big-vein-associated virus* (formalmente llamado Lettuce big-vein virus), el miembro tipo del género *Varicosavirus* (Sasaya *et al.*, 2002; Vaira *et al.*, 2003; van der Wilk *et al.*, 2002). Sin embargo, las RNA polimerasas de los ophiovirus contiene, en el motivo C, una secuencia SDD presente en las RNA polimerasa de los virus de RNA de cadena negativa segmentados (*Orthomyxoviridae*, *Arenaviridae* y *Bunyaviridae*), y no poseen la secuencia GDNQ que se encuentra en el motivo C de las RNA polimerasas de los Mononegavirales (Naum-Onganía *et al.*, 2003). Análisis filogenéticos utilizando las secuencias conocidas de la RNA polimerasa de CPsV, MiLV y RWMV y de otros virus de RNA de polaridad negativa de las familias *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae* y *Arenaviridae* y Tenuivirus refuerzan que no existe relación

taxonómica de estas familias con las especies de ophiovirus y sugieren su separación como un nuevo grupo, proponiéndolos como integrantes de una nueva familia, *Ophioviridae* (Naum-Onganía *et al.*, 2003).

Se ha encontrado una señal de localización nuclear (NLS por *nuclear localization signal*) bipartita en la RNA polimerasa (Naum-Onganía *et al.*, 2003) y en la proteína 54K de CPsV (Sanchez de la Torre *et al.*, 2002). Similares motivos también están presentes en las proteínas 263K y 55K de MiLV (van der Wilk *et al.*, 2002) y en la secuencia disponible correspondiente a la probable RNA polimerasa de RWMV (Vaira *et al.*, 1997). Dichas señales están presentes en la proteína N de los virus negativos no segmentados que se replican en el núcleo, como *Sonchus yellow net virus* (Martins *et al.*, 1998) y *Borna disease virus* (Pyper y Gartner, 1997), lo que sugiere que en los ophiovirus, como en los nucleorabdovirus y los virus de la familia *Bornaviridae*, parte del ciclo viral podría ocurrir en el núcleo (Naum-Onganía *et al.*, 2003).

V. D. Detección de CPsV

Hasta no hace mucho, el diagnóstico de psorosis se realizaba únicamente mediante la transmisión del patógeno por injerto de tejido proveniente de la planta incógnita a plantas indicadoras de los síntomas de la enfermedad (*indexing* biológico), método de diagnóstico desarrollado por Wallace en 1945. Esta metodología resultó muy importante e innovadora ya que permitía detectar otras enfermedades transmisibles por injerto. Así, el ensayo implica la inoculación por injerto con dos o más trozos de corteza del árbol a analizar sobre plantas de semilla de naranjo dulce (Pinapple, Olivelihoods o Madam Vinous) de aproximadamente un año de edad, las cuales se podan al momento del injerto para forzar la brotación. Las plantas injertadas son mantenidas en el invernáculo con temperatura controlada (18-24 °C) la cual es crítica para la manifestación de síntomas que aparecen entre las 3 a 4 semanas de realizado el injerto. Los síntomas incluyen reacción de *shock* en la primera brotación, en la cual los brotes se curvan y se van necrosando hasta la caída total del brote, y la aparición de manchas y flecos cloróticos en las hojas nuevas. En las siguientes brotaciones no suele presentarse el *shock* en los brotes y solo son observables los síntomas foliares en hojas jóvenes. La reacción de *shock* puede no manifestarse ya que depende del aislamiento y, dado que los síntomas foliares no son exclusivos de psorosis, para confirmar el diagnóstico se realiza el ensayo de protección cruzada contra psorosis B. Para este ensayo las plantas previamente inoculadas con la corteza del árbol candidato se inoculan con psorosis B. Luego de 3 a 6 meses, si la planta estaba sana o sin la presencia de psorosis A, aparecen los síntomas característicos de psorosis B, manchas cloróticas en hojas maduras con pústulas en el envés y depósitos de goma en los tallos (Figura 8). En cambio, si la planta inoculada estaba previamente infectada con psorosis A, ésta protegerá frente a la infección con psorosis B y no se desarrollarán los síntomas.

El *indexing* biológico y el ensayo de protección cruzada requieren de habilidad para el manejo de las plantas indicadoras y para la observación de los síntomas, siendo además, un procedimiento de diagnóstico lento y costoso.

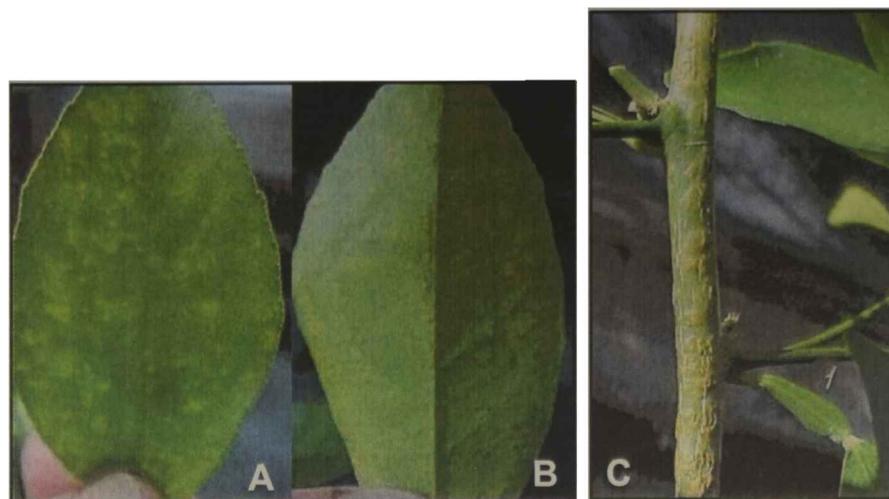


Figura 8. Síntomas de psorosis B en planta indicadora. **A.** Manchas amarillentas en el haz de las hojas maduras. **B.** Dichas manchas se corresponden con pequeños depósitos de goma parda en el envés. **C.** Goma en el tallo. Gentileza de la Ing. Agr. N. Costa, EEA-INTA, Concordia, Entre Ríos.

A medida que se avanzó en la caracterización del agente causal de psorosis, se fueron desarrollando herramientas alternativas para el diagnóstico de la enfermedad. Durante los últimos años, se han desarrollado diferentes métodos inmunológicos aplicados a cítricos infectados con CPsV en búsqueda de un procedimiento rápido de detección de psorosis. En 1997, García *et al.* desarrolló un ELISA doble sándwich (DAS-ELISA) para la detección de CPsV. Posteriormente, Alioto (1999), mejoró la detección mediante el desarrollo del ELISA triple sándwich (TAS-ELISA). Por otro lado, varios *primers* han sido diseñados para la detección de CPsV mediante RT-PCR como un método alternativo para el diagnóstico (García *et al.*, 1997; Barthe *et al.*, 1998; Legarreta *et al.*, 2000). Actualmente, el TAS-ELISA y la RT-PCR son los métodos más rápidos y confiables para la detección del virus en árboles de campo (Martín *et al.*, 2002).

V. E. Control de la enfermedad

CPsV infecta la mayoría de las variedades de *Citrus* y también ha sido encontrado en *Poncirus trifoliata* y los híbridos citrange Troyer y citrange Carrizo (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*), los cuales son usados como pie o patrón en la mayoría de los países citrícolas, incluyendo Argentina. No se conoce ninguna especie cítrica ni especies relacionadas utilizadas como pie en la citricultura que sean resistentes o tolerantes a CPsV.

Como se comentó previamente, en la región mesopotámica argentina y en San Pedro (Pcia de Bs As) la psorosis de los cítricos causa la muerte del 5% de las plantas productoras de cítricos en un año (Larocca, 1985, Danós, 1990). Actualmente en la Estación Experimental Agropecuaria-INTA, Concordia (Entre Ríos) se aplica el programa PROCITRUS, que utiliza técnicas por las que se obtienen plantas madres de variedades cítricas de alto valor comercial libres de virus. Pero, debido a que la enfermedad se difunde naturalmente en esta región, las plantas que en el momento de su plantación eran libres de virus, a veces, se infectan con el patógeno y desarrollan la enfermedad. El vector responsable de la difusión natural no se conoce, pero su participación es altamente probable (Roistacher, 1993).

Así, el control de la enfermedad podría ser abordado, en un principio, utilizando diversas estrategias como:

1) Determinar cual es el vector del virus y plantear un plan de control que dependerá del tipo de vector u

2) obtener cítricos de valor comercial que adquieran cierto nivel de resistencia a la infección viral,

y otras alternativas que puedan combinar ambas estrategias conociendo en detalle el sistema en estudio.

Para iniciar el estudio del vector responsable de la difusión natural del virus hay que tener en cuenta que habría dos candidatos muy diferentes para la transmisión del virus. Por un lado, un candidato podría ser *Toxoptera citricidus*, un vector muy eficiente que se encuentra frecuentemente en el cultivo, y que transmite otra enfermedad muy importante, la tristeza de los cítricos, causada por *Citrus tristeza virus* (CTV) que afecta el cultivo de cítricos. El otro candidato es un hongo de suelo, *O. brassicae*, que se ha demostrado como vector de dos virus del género *Ophiovirus*, MiLV (Lot *et al.*, 2002) y LRNV (Bos y Huijberts, 1996; Torok y Vetten, 2002). Estos dos candidatos, definirían estrategias de control completamente diferentes debido a sus características, vector alado respecto a un vector de suelo.

Por otro lado, la producción de plantas transgénicas tolerantes o resistentes al virus de la psorosis de los cítricos es una estrategia muy interesante. Dado que esta estrategia fue empleada en el presente trabajo de tesis, una explicación detallada de diferentes conceptos relacionados a la obtención de resistencia viral y transformación de cítricos serán desarrollados en los próximos apartados.

VI. Resistencia derivada del patógeno

Sanford y Johnston, en 1985, formularon que la introducción y expresión de secuencias o parte del genoma del virus en la planta podría interferir en el ciclo vital del mismo produciendo resistencia a la infección. Dicho concepto es conocido como resistencia derivada del patógeno (PDR, por *Pathogen-Derived Resistance*). Un requisito para el uso de PDR es que ninguna de las alternativas desarrolladas debería interferir con las funciones esenciales del huésped. Dado que los virus deben replicarse, encapsidar su genoma, y dispersarse desde el sitio inicial de infección a través del huésped y en el medio ambiente, ellos codifican genes específicos para el desarrollo de estos procesos. Por lo tanto, estos genes son excelentes candidatos para el desarrollo de la resistencia basada en PDR. Existen dos mecanismos moleculares básicos por los cuales se puede generar PDR, resistencia mediada por proteína y resistencia mediada por RNA (Goldbach *et al.* 2003, Prins, 2003, Ritzenthaler, 2005).

La primera publicación donde se demostró PDR contra virus de planta fue descrita por Abel *et al.*, en 1986, quien mostró que la expresión de la proteína de la cápside de *Tobacco mosaic virus* (TMV) en plantas de tabaco las protegía de la infección con TMV. Para un gran número de virus a RNA, incluyendo TMV, PVX (*Potato virus X*), AMV (*Alfalfa*

mosaic virus), CMV (*Cauliflower mosaic virus*) y TRV (*Tobacco rattle virus*), se ha demostrado que la expresión transgénica de su CP resultó en altos niveles de resistencia (Beachy, 1994, Baulcombe, 1996), la cual no se inducía si se usaba una alta presión de inoculación o mediante la infección con el RNA viral desnudo. Este último descubrimiento apoyó la idea que la resistencia mediada por proteína se basaba en el bloqueo de la desencapsidación del virus infectivo debido a la presencia de la CP expresada en la planta transgénica. También se ha generado una variedad de plantas transgénicas que expresan diferentes proteínas virales como proteína de movimiento o segmentos de la replicasa viral capaces de resistir la infección con el virus homólogo (Anderson *et al.*, 1992, Lapidot *et al.* 1993, Baulcombe, 1994, 1996; Lomonossoff, 1995, Palukaitis y Zaitlin, 1997). En cítricos se ha expresado la proteína de la cápside de CTV obteniendo niveles variables de resistencia al virus (Domínguez *et al.*, 2002).

Para inducir esta estrategia mediada por proteína es necesaria una expresión relativamente alta de la proteína transgénica. Muchas veces, los niveles de resistencia no se correlacionaban con los niveles de expresión proteicos. El descubrimiento que, en algunos casos, era el RNA mensajero el responsable de la inducción de la resistencia y no la expresión de las proteínas virales, llevó a acuñar el término de resistencia mediada por RNA. Lindbo *et al.*, en 1993, fue el primero en describir la resistencia a la infección viral mediada por RNA y mostrar que estaba relacionada al mecanismo de co-supresión previamente descrito (Van der Krol *et al.*, 1990; Napoli, *et al.*, 1990).

Posteriormente se comprendió que esta resistencia mediada por RNA era parte de un sistema de defensa antiviral, el mecanismo de silenciamiento de RNA, el cual monitorea la presencia de RNA aberrantes como, por ejemplo, los intermediarios doble cadena que se generan durante la replicación viral (Voinnet 2001, 2005, Dunoyer y Voinnet, 2005).

El silenciamiento de RNA es un proceso dependiente de homología disparado por la presencia de RNA de cadena doble, el cual lleva a la supresión de la expresión génica. Fue inicialmente descubierto en plantas y luego se demostró que es un mecanismo ubicuo, presente en todos los eucariotas incluyendo protozoos, plantas y animales. El silenciamiento de RNA se desarrolla en tres niveles en plantas: 1) un mecanismo de silenciamiento citoplasmático mediado por RNA doble cadena, el cual lleva a la degradación del RNA mensajero homólogo y es conocido como silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS, por *Post-Transcriptional Gene Silencing*) (Hamilton *et al.*, 1999); 2) los RNAs mensajeros endógenos pueden ser silenciados mediante micro-RNAs (miRNAs), los cuales regulan negativamente la expresión génica por su apareamiento específico a los RNAs mensajeros, lo cual lleva a su degradación o su inhibición traduccional (Bartel, 2004, Mallory y Vaucheret, 2006) y 3) el silenciamiento de RNA está asociado con la metilación del DNA específica de secuencia y con la consecuente supresión de la transcripción (TGS, por *Transcriptional Gene Silencing*). Una característica común de estos mecanismos de silenciamiento a RNA es que la molécula inductora, RNA de cadena doble, es reconocida por una enzima, DICER, que la procesa en pequeños fragmentos (21-25 nts), siRNA (*small interfering RNA*). Estos RNAs pequeños luego son incorporados a un complejo conocido como RISC (*RNA-induced silencing complex*) el cual es capaz de degradar RNA simple cadena de una manera específica de secuencia, dada por la molécula de RNA pequeña incorporada al complejo.

Existen numerosas revisiones del tema publicadas (Brodersen y Voinnet; 2006, Vaucheret, 2006).

Se han desarrollado numerosas plantas transgénicas capaces de inducir el mecanismo de PTGS ante la infección viral a fin de obtener resistencia al patógeno. Así, en las plantas transgénicas, tanto el RNA viral como el RNA mensajero del transgén derivado del virus son blancos de la degradación permitiendo a las plantas protegerse contra la infección viral (Baulcombe, 1999). Varias estrategias han sido utilizadas para producir RNA de cadena doble en las plantas transgénicas. Al inicio se transformaban plantas capaces de producir RNA sentido o RNA anti-sentido y posteriormente se cruzaban a fin de obtener una planta capaz de inducir la formación del RNA de cadena doble. Esta estrategia permitió demostrar que el RNA de cadena doble era mejor inductor del silenciamiento que la molécula sentido o anti-sentido (Waterhouse *et al.*, 1998). Así, se desarrollaron varias estrategias donde se clonan, bajo el mismo promotor, las secuencias sentido y anti-sentido separadas por un intrón. Una vez transcrita, esta molécula forma un RNA tipo *hairpin* (hpRNA) capaz de inducir el silenciamiento génico (Smith *et al.*, 2000). Actualmente, esta estrategia es ampliamente utilizada como sistema para silenciar genes en plantas con el objetivo de estudiar su función (Waterhouse y Helliwell, 2003; Miki *et al.*, 2004; Helliwell *et al.*, 2005).

A partir de la aplicación de esta tecnología se ha reportado correlación entre PTGS del transgén y resistencia a virus en muchas plantas transgénicas (Waterhouse, *et al.*, 1998; Pooggin *et al.*, 2003, Pandolfi *et al.* 2003; Di Nicola-Negri *et al.* 2005). Una publicación reciente ha reportado la resistencia tanto a un varicosavirus (LBVV) como a un ophiovirus (MiLV) en plantas transgénicas de lechuga que contienen la secuencia del gen *cp* de LBVV en orientación antisentido (Kawazu y Fujiyama, 2006).

En algunos casos, el PTGS puede ser disparado por la presencia de un alto número de copias en las plantas transgénicas desarrolladas, lo cual puede resultar en resistencia al virus homólogo (Kalantidis *et al.* 2002). En particular, en plantas leñosas, se ha reportado resistencia a *Plum Pox Virus* (PPV) en ciruelo (Scorza *et al.* 2001) y a CTV en cítricos (Fagoaga *et al.* 2006), mediante la inducción de PTGS por la incorporación de numerosas copias en la planta.

Recientemente, se han reportado nuevas estrategias basadas en el silenciamiento de RNA para la búsqueda de resistencia a la infección viral. Bucher *et al.* (2006) mostró que usando un simple transgén basado en la producción de *cassettes* quiméricos con tamaños mínimos de los RNA mensajeros virales a silenciar se puede inducir PTGS dirigido a cuatro tospovirus diferentes y obtener múltiple resistencia viral. Por otro lado, haciendo uso de un precursor modificado del miRNA159 de *Arabidopsis thaliana*, Niu *et al.* (2006) logró expresar un miRNA artificial (amiRNA) conteniendo secuencias de RNA mensajeros virales para dos diferentes supresores virales de silenciamiento, P69 de *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) y HC-Pro de *Turnip mosaic virus* (TuMV). Las plantas transgénicas que expresan ambos amiRNA a partir de un transgén dimérico presentan resistencia a ambos virus y, lo más interesante, es que dicha resistencia se mantiene a 15°C, temperatura en la cual el silenciamiento mediado por siRNA se ve inhibido (Szittyá *et al.*, 2003).

VII. Transformación genética de cítricos

VII. A. Breve historia

La transformación de cítricos resulta exitosa y se viene desarrollando desde hace más de una década. El primer trabajo publicado sobre el tema fue la transformación directa de protoplastos de naranjo dulce Trovita mediante tratamiento con polietilenglicol (PEG) (Kobayashi y Uchimiya, 1989) con un vector conteniendo un gen seleccionable (*ntplI*). Aunque en este trabajo se constató la transformación de dos líneas de callos obtenidas, no se consiguió regenerar ninguna planta. Posteriormente, Vardi *et al.* (1990) consiguió regenerar dos plantas transgénicas de limón Rugoso (*C. Jambhiri* Lush.), utilizando la misma técnica de transformación y mediante un proceso embriogénico de regeneración. Ese mismo año, Hidaka *et al.*, utilizando *Agrobacterium tumefaciens* como vector para la transformación de suspensiones celulares de callos embriogénicos de naranjo dulce Trovita y Washigton navel, a pesar de obtener frecuencias de regeneración extremadamente bajas, consiguió recuperar una plántula transgénica.

En 1992, Moore *et al.*, usando como explantos segmentos de tallos de plántulas de semillas crecidas *in vitro*, y por medio de la transformación con *A. tumefaciens*, luego de la regeneración de brotes mediante un proceso organogénico, y posterior enraizamiento, logró obtener dos plantas de citrange Carrizo transgénicas pero la eficiencia del proceso resultó muy baja (< 1%). Kaneyoshi *et al.* (1994), obtuvo naranjo trifoliado (*P. trifoliata*) transgénico con una eficiencia del 43% combinando la transformación mediante *Agrobacterium*, plántulas de semilla crecida *in vitro* y el enraizamiento de los brotes regenerados. Al año siguiente, Peña *et al.* (1995 a,b), incorporó diversas modificaciones a los trabajos precedentes y logró transformar citrange Carrizo a partir entrenudos de plántulas germinadas *in vitro* y naranjo dulce Pineapple a partir de entrenudos de plantas de 6 a 12 meses de edad crecidas en el invernáculo. Las modificaciones más importantes se efectuaron en la etapa de selección, incorporando un período de oscuridad que favorecía la formación de callo, y en la etapa de regeneración, realizando el injerto *in vitro* de los brotes regenerados en reemplazo de la etapa de enraizamiento.

A partir de ese momento, variando el material de partida utilizado para la transformación y las condiciones de cultivo se ha logrado con éxito la transformación de cítricos empleando *A. tumefaciens* en una cantidad considerable de especies: *C. sinensis* (naranjo dulce) (Peña, 1995b, Cervera, 1998a, Bond y Roose, 1998), *C. aurantifoliata* (lima) (Peña *et al.* 1997), *C. sinensis* x *Poncirus trifoliata* (citrange Carrizo) (Peña, 1995a; Cervera, 1998b), *C. aurantium* (naranjo amargo) (Ghorbel *et al.*, 2000), *C. paradisi* (pomelo) (Luth y Moore, 1999, Yang *et al.*, 2000) y *C. limon* (limón) (Ghorbel *et al.*, 2001a).

VII. B. Consideraciones importantes para la transformación de cítricos

En la transformación de cítricos se han utilizado diferentes materiales de partida y técnicas. Como se comentó anteriormente, la transformación directa de protoplastos o callos embriogénicos con PEG, electrotransformación o bombardeo de partículas no ha resultado lo suficientemente eficiente (Kobayashi y Uchimiya, 1989; Vardi *et al.*, 1990,

Hidaka y Omura, 1993; Niedz *et al.*, 1995; Kayim *et al.*, 1996). En cambio, la utilización de métodos de cocultivo de diferentes explantos con *Agrobacterium* ha permitido generar eficientemente cítricos transgénicos y es el método que se utiliza en la mayoría de los trabajos reportados hasta el momento.

En los siguientes apartados se describen las características más relevantes del proceso de transformación utilizado en el presente trabajo de tesis.

VII. B. 1) *Agrobacterium tumefaciens* en cítricos

Aunque las especies de cítricos no son huéspedes naturales de *A. tumefaciens* se ha demostrado que esta bacteria es capaz de transformar cítricos *in vivo* e *in vitro*, y que la cepa desarmada EHA 105, derivada de la cepa supervirulenta A281, es un muy eficiente vector para introducir el DNA foráneo en las células de cítrico (Cervera *et al.*, 1998c, Ghorbel *et al.*, 2001), por lo cual, dicha cepa es la que se utiliza en los procedimientos de transformación de cítricos.

VII. B. 2) *Uso de fitohormonas y condiciones de cultivo*

La producción de plantas transgénicas involucra la integración estable del DNA foráneo en el genoma de la planta y la subsiguiente regeneración de plantas enteras a partir de las células transformadas. Por lo tanto, las plantas transgénicas solo podrán ser obtenidas a partir de células que son competentes tanto para la transformación como para la regeneración, y la eficiencia de transformación dependerá del grado en que se solapan estos dos fenómenos (Potrykus, 1991). La utilización de un medio rico en auxinas y la exposición de los explantos a la oscuridad durante las primeras 2 a 4 semanas después de la inoculación bacteriana, permite aumentar la competencia de las células del cambium presente en los bordes de los explantos de cítricos hacia la formación de callo a través de la activa desdiferenciación, generando un estado competente para la transformación de dichas células (Cervera *et al.*, 1998a, Ghorbel *et al.*, 1999; Peña *et al.* 2004).

VII. B. 3) *Uso de genes marcadores*

Los genes marcadores o reporteros han sido muy importantes en la transformación de plantas utilizándose como sistemas de selección. Ellos son usados en experimentos de co-transformación para confirmar los eventos transgénicos, cuando los escapes suelen ser frecuentes. También, han sido usados para mejorar los sistemas de transformación y la eficiencia de obtención de plantas transgénicas por permitir la detección visual de tejidos transformados (Miki y McHugh, 2004). Así, la selección manual de tejidos transformados luego de la aplicación de los agentes de selección enriquece los tejidos en células transformadas. En cítricos existe alta frecuencia de regeneración de escapes y brotes quiméricos durante los eventos de transformación (Peña *et al.*, 1995, Gutiérrez *et al.*, 1997). En algunos casos esta alta frecuencia de regeneración suele ser problemática para la obtención de eventos transgénicos. El aumento de la concentración del agente de selección (antibióticos, herbicidas, etc.), a veces, provoca la inhibición de la proliferación

celular, por lo cual, una alternativa es el uso de genes marcadores. A fin de aumentar la eficiencia de transformación en cítricos, se han utilizado, además del gen de selección, los genes marcadores *uidA* (GUS) (Peña *et al.*, 1995) o *sgfp* (GFP) (Ghorbel *et al.*, 1999).

VII. B. 4) *Injerto in vitro*

Uno de los mayores problemas en la producción de cítricos transgénicos radica en la baja eficiencia de enraizamiento. En muchas publicaciones se ha reportado dificultades en la inducción de raíces durante los procedimientos de transformación de cítricos (Moore *et al.*, 1992; Gutierrez *et al.*, 1997). El injerto de ápices caulinares *in vitro* ha sido usado para obtener plantas libres de virus y es una alternativa aplicada por Peña *et al.* (1995 a, b; 1997) en reemplazo del enraizamiento, lo cual ha resultado un método rápido y eficiente para la regeneración de cítricos transgénicos.

VII. C. Mejora de cítricos mediante transformación

Los avances en la obtención de cítricos transgénicos comentados previamente permitieron la mejora genética mediante la introducción de diferentes genes capaces de conferir características agronómicas de interés. Entre los logros más relevantes se pueden enumerar: 1) la expresión de los genes *LEAFY* (LFY) o *APETALA1* (AP1) de *Arabidopsis thaliana*, implicados en el desarrollo floral, en búsqueda de acortar el período juvenil del cítrico (Peña *et al.*, 2001), 2) la expresión del gen *HAL2* en búsqueda de tolerancia a la salinidad (Cervera *et al.*, 2000), 3) la expresión de proteínas antifúngicas para generar resistencia a *Phytophthora citrophthora* (Fagoaga *et al.*, 2001), 3) el aumento de los niveles de β -carotenos (Costa *et al.*, 2002) y 4) resistencia a CTV mediada por PDR (Domínguez *et al.*, 2002, Fagoaga *et al.*, 2006).

OBJETIVOS

Actualmente, no se conocen especies cítricas ni especies relacionadas utilizadas como pie en la citricultura que sean resistentes o tolerantes al virus de la psorosis de los cítricos. Por sus características epidémicas, el control de la enfermedad y su erradicación son difíciles de llevar a cabo. La resistencia derivada del patógeno (PDR) se ha aplicado con éxito para el control de diversas enfermedades producidas por agentes virales. En muchos casos la expresión de la proteína de la cápside viral u otras secuencias virales, ha generado resistencia o tolerancia al virus sin producir efectos secundarios. Por lo tanto, uno de los objetivos generales planteado en la presente tesis fue aplicar la estrategia de resistencia derivada del patógeno al virus de la psorosis de los cítricos en búsqueda de resistencia a la enfermedad.

Dado que en los virus la información genética se encuentra muy condensada, es frecuente encontrar que la mayoría de sus genes están involucrados en varias de las funciones necesarias para completar el ciclo viral. CPsV posee 4 ORFs determinados a partir del análisis de su genoma, de los cuales, solamente se ha asignado y confirmado su función a la proteína 48K (proteína de cubierta viral) y determinado por homología de secuencia la función de replicasa viral en la proteína 280K. Por lo tanto, además de la función estructural de la proteína 48K es muy probable que participe de otras funciones vitales para la replicación e infección del virus. El análisis de la secuencia nucleotídica de la proteína 280K del RNA1 (RNA polimerasa) y de la proteína 54K parece indicar que podrían ejercer alguna función en el núcleo ya que poseen señales de localización nuclear. En general, el análisis de la localización subcelular de las proteínas virales a posibilitado dilucidar la función de las mismas durante el ciclo vital, por lo cual, se estableció como segundo objetivo general de la tesis estudiar la expresión y/o localización intracelular de las proteínas virales de CPsV.

Para lograr dichos objetivos, durante el trabajo de tesis se abordaron diferentes objetivos particulares que se desarrollaron en los capítulos que la conforman:

Capítulo 1. Obtención de plásmidos recombinantes utilizados durante el desarrollo de la tesis

Capítulo 2. Desarrollo de herramientas y metodologías para la detección de las proteínas 24K, 48K y 54K de CPsV

Capítulo 3. Búsqueda de resistencia derivada del patógeno mediante la obtención de cítricos transgénicos conteniendo ORFs de CPsV.

Capítulo 4. Estudio de la expresión de las proteínas 24K, 48K y 54K y la localización sub-celular de la proteína de cubierta viral de CPsV.

Capítulo 5. Detección de CPsV aplicando el TAS-ELISA –HRP



MATERIALES Y MÉTODOS

- I. Reactivos químicos
- II. Cepas bacterianas y aislamientos virales utilizados
- III. Vectores utilizados
- IV. *Primers*
- V. Sueros comerciales utilizados
- VI. Minipreparación de DNA plasmídico
- VII. *Colony-PCR*
- VIII. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa (*Gene clean*)
- IX. Precipitación de productos de PCR utilizando PEG₆₀₀₀
- X. Preparación de bacterias competentes
- XI. Métodos para la transformación bacteriana
- XII. Reacciones enzimáticas utilizadas en Ingeniería genética
- XIII. Extracción y purificación de partículas virales RNA, DNA y proteínas
- XIV. Métodos utilizados para el análisis de ácidos nucleicos
- XV. Expresión y purificación de proteínas recombinantes
- XVI. Obtención de antisueros policlonales
- XVII. Análisis de las proteínas recombinantes y proteínas expresadas en tejido foliar
- XVIII. Transformación y regeneración de cítricos
- XIX. Propagación de líneas transgénicas e inoculación mediante injerto
- XX. Agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana*
- XXI. Microscopía confocal
- XXII. Diagnóstico de la psorosis de los cítricos (Métodos biológicos)

INTRODUCCION

En las siguientes secciones se realiza una descripción general de las técnicas utilizadas durante el trabajo de tesis. El desarrollo y la puesta a punto de algunas de las metodologías se detallan en otros Capítulos de la tesis. Los reactivos empleados se expresan como concentraciones finales, salvo que se indique lo contrario.

MATERIALES

I. Reactivos químicos

Durante el desarrollo de este trabajo se usaron reactivos de grado analítico de Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma (St. Louis, EE.UU.), Fluka (Buchs, Suiza), Carlo Erba (Milán, Italia) o Mallinkrodt (New York, EE.UU.). Las drogas y enzimas empleadas en los experimentos de Ingeniería genética fueron de grado Biología Molecular de Sigma (St. Louis, EE.UU.), Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania), Stratagene (La Jolla, EE.UU.), Promega (Madison, EE.UU.), New England Biolabs, NEB (Beverly, EE.UU.), Gibco BRL (Gaithersburg, EE.UU) o PIERCE (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois EEUU).

II. Cepas bacterianas y aislamientos virales utilizados

II. A. Cepas bacterianas

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron las cepas bacterias de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* que se detallan a continuación:

1. DH5 α F': *E. coli* supE44 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1.
2. BL21(DE3): *E. coli* B F⁻ ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tet^r gal (DE3) endA
3. BL21(DE3)-CodonPlus-RIL: *E. coli* B F⁻ ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tet^r gal (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam^r]
4. DH10Bac: *E. coli* F⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 galU galK λ^- rpsL nupG /pMON14272 /pMON7124
5. TOP10: *E. coli* F⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG

6. LBA4404: *A. tumefaciens* LBA4404 (Ach5 pTiAch5) Sm/Sp^r en el plásmido de virulencia (de Tn904); el T-DNA completo de pTiAch5 eliminado en pAL4404 (Hoekema et al., 1983).

7. EHA105: es una cepa de *A. tumefaciens* Km^s derivada de la EHA101 (Hood et al., 1993). EHA101: genotipo C58 pTiBo542; T-region::aph, Km^r; cepa desarmada derivada de *A. tumefaciens* A281, el T-DNA reemplazado con nptII, eliminación de extremos del T-DNA no confirmado, supervirulenta (Hood et al., 1986).

II. B. Aislamientos virales

Para los experimentos de desafío, como fuente de inóculo, así como para la purificación parcial de partículas virales se utilizó el aislamiento CPV4 cuyo origen es, probablemente, texano (Garnsey et al., 1976) aunque es considerado de Florida (USA), donde fue aislado (Garnsey y Timmer 1980).

En los ensayos de protección cruzada se utilizó el aislamiento de psorosis B, Ps 189-32 proveniente de la colección de la Estación Experimental Agropecuaria INTA-Concordia.

II. C. Secuencias presentes en banco de datos utilizadas en el análisis de secuencias

En el análisis de secuencias utilizando los *softwares* online de predicción NetNES (<http://www.cbs.dtu.dk/index.shtml>, la Cour et al., 2004) y PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/>, Nakai y Horton, 1999) y en las comparaciones de secuencias utilizando el programa ClustalW provisto por los servidores online <http://www.ebi.ac.uk/clustalW> (Higgins et al., 1994) se utilizaron las secuencias de distintos genes depositadas en el GenBank (*National Institute of Health*, Bethesda, Maryland, USA). A continuación se indican los números de acceso:

Citrus psorosis virus segment RNA1, complete sequence (Naum-Ongania et al., 2003; AY224663)

Citrus psorosis virus RNA 2 segment, partial sequence (Sanchez de La Torre et al., 2002; AF218572)

Citrus ringspot virus coat protein gene, complete cds (Sanchez de la Torre et al., 1998, AF060855)

Mirafiori lettuce virus RNA 1 (Van der Wilk et al.2002, NC 004779)

Mirafiori lettuce virus RNA 2 (Van der Wilk, 2002, NC 004781)

Mirafiori lettuce virus RNA 3 (Van der Wilk et al.2002, NC 004782)

Mirafiori lettuce virus RNA 4 (Van der Wilk et al.2002, NC 004780)

Lettuce ring necrosis virus RNA 1, complete sequence. (Torok y Vetten, no publicado; NC006051)

Lettuce ring necrosis virus RNA 2, complete sequence. (Torok y Vetten, no publicado; NC006052)

Lettuce ring necrosis virus RNA 3, complete sequence. (Torok y Vetten, no publicado; NC006053)

Lettuce ring necrosis virus RNA 4, complete sequence. (Torok y Vetten, no publicado; NC006054)

Bhendi yellow vein mosaic virus-associated DNA beta (Jose y Usha, 2003, NC003405)

Human immunodeficiency virus type 2 EHO (Rey-Cuille et al., 1994; U27200 L14545)

X. laevis 5S RNA gene transcription factor (TFIIIA) mRNA (Ginsberg et al., 1984, K02938)

B. americanus mRNA for transcription factor IIIA (Gaskins et al., 1992; X58366 S46758)

Protein kinase inhibitor, alpha [*Mus musculus*] (Wen et al., 1995; NP 032888)

Squash leaf curl virus B component DNA, complete sequence (Lazarowitz y Lazdins, 1991; NC 001937)

III. Vectores utilizados

III. A. Vectores de clonado

pGemT, Promega. Provisto en el sistema pGEM[®]-T Easy Vector, este plásmido deriva del plásmido pGEM-5Zf(+) digerido con *EcoRV*, en cuyos extremos 3' se le agregan timidinas, lo cual permite la ligación exitosa de los productos de amplificación generados mediante PCR.

III. B. Vectores de expresión

pMOG180, MOGEN internacional. Es un plásmido derivado del plásmido pUC18 conteniendo el promotor 35S CaMV y la secuencia *leader* del RNA 4 de AMV (*Alfalfa mosaic virus*) en el fragmento *EcoRI-BamHI* y la secuencia terminadora de la transcripción nopalina sintasa (nos) en el fragmento *BamHI-HindIII*.

pFastBacHTb, Invitrogen. Este plásmido posee una secuencia His•Tag N-terminal la cual permite la purificación mediante columna de afinidad. También contiene un sitio de reconocimiento para la proteasa TEV que permite eliminar la secuencia de 6xHis luego de la purificación de la proteína recombinante. Posee el origen de replicación del plásmido pUC, el gen de resistencia a ampicilina (Ap^r) y secuencias derivadas del transposón Tn7 (Tn7L y TnR) que generan el DNA del báculo recombinante en *E.coli*. Para la selección y expresión en células de insecto posee el gen de resistencia a gentamicina (Gm^r), el promotor de poliedrina (P_{PH}) y la señal de poliadenilación de SV40.

La serie de plásmidos pET permite la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* usando la RNA polimerasa del bacteriófago T7, en el trabajo de tesis se utilizaron los siguientes plásmidos de la serie:

pET22b, Novagen. Este plásmido posee una secuencia señal *pelB* N-terminal para una potencial localización periplásmica además de una secuencia His•Tag[®] localizada en el extremo C-terminal.

pET30a, Novagen. Este plásmido posee una configuración N-terminal His•Tag[®]/trombina/S•Tag[™]/enteroquinasa además de una secuencia His•Tag opcional en el extremo C-terminal.

pET19a, Novagen. Este plásmido posee una secuencia His•Tag[®] seguida de un sitio de reconocimiento para la enteroquinasa y tres sitios de clonado.

III. C. Plásmidos binarios

p35SGUSINT. Este plásmido deriva del pBin19 y contiene el gen *uidA* (GUS) con el intrón derivado de ST-LS1 (Vancanneyt et al. 1990).

pBIN19sgfp. Este plásmido fue desarrollado por Chiu et al. (1996), deriva del plásmido binario pART27 y contiene el gen *sgfp* bajo el promotor constitutivo 35SSC4PPDK y el terminador de la transcripción *nos*.

Plásmidos de la serie pGD (pGD, pGDG y pGDR). Estos plásmidos binarios fueron desarrollados por Goodin et al. (2002) y derivan del plásmido binario pCAMBIA1301, el cual fue desarrollado a partir del plásmido pPZP descrito por Hajdukiewicz et al. (1994). Estos plásmidos fueron cedidos gentilmente por el Dr Michael M. Goodin, University of Kentucky.

pBin61-p19. Este plásmido fue desarrollado por Voinnet et al. (2003), deriva del plásmido binario pBin61 (Bendahmane et al., 2000) y contiene el ORF de la proteína p19 de *Tomato bushy stunt virus* (TBSV). Este plásmido fue cedido gentilmente por el Dr. Baulcombe (Sainsbury Laboratory, Norwich, UK).

IV Primers

IV. A. Primers diseñados

Para el diseño de los *primers* que se detallan a continuación se utilizó el programa *OLIGO 4.0* o *Primer Premier* a partir de la secuencia consenso publicada para los diferentes RNAs de CPsV.

IV. A. 1. Específicos para el RNA 1

24kdir 5' CGG GAT CCA TGG CTG AAT ATA TAG 3'
 24kdir2 5' GTG ATC ATC TCG AGC TAT GGC TG 3'
 24krev 5' CGG GAT CCA AGA TTT TAA TTT CAC 3'

IV. A. 2. Específicos para el RNA 2

54k9011dir 5' CGG GAT CCA TGG CAA TGG CAA GC 3'
 54kdir 5' TAG GCT CGA GCA ATG TCA ATG GC 3'
 54k9011rev 5' CCG GGA TCC GAR ATC AYT CWA TTT TG 3'

Donde W= T o A, Y= T o C, R= A o G

IV. A. 3. Específicos para el RNA 3

48kdir 5' TAA GCT CGA GCA ATG TCG ATT CC 3'
 48krev 5' CAG GAT CCA TAA AGC TTC GAA TTA C 3'

En verde se indica el sitio *XhoI* introducido

En rojo se indica el sitio *BamHI* introducido

Subrayado se indica el sitio *NcoI*

Los pares de *primers* 24kdir2 y 24krev; 54kdir y 54k9011rev; 48kdir y 48krev fueron utilizados para el clonado de los ORFs de CPsV en los plásmidos de la serie pGD.

IV. B. Otros *primers* utilizados diseñados previamente

IV. B. 1. Específicos para el RNA 1 (24K)

100Pdir 5' TCT GTT ATT TCC TGT TCC TG 3'
 100Prev 5' TGA CGC AGA ATG AAG AAG 3'
 EXT100P 5' TCC ACA TTC CGA TTA TTC TG 3'

IV. B. 2. Específicos para el RNA 2 (54K)

A 5' TAG ATC CAT GCT CAG TCA CC 3'

B	5' GGT CAC AGG TAG TAA CAG TT 3'
25	5' AGG GGC ACA ATG CTT TGA CC 3'
pD2	5' ATT GAG CCA TAA GCT CTG TC 3'
p699	5' GAA GAG GCA AGA AAA TCT G 3'
p1162	5' TGA TGG AAA AGA AGC AGC 3'
p1569	5' ACA CAA TGT CAA TGG CAA GC 3'

IV. B. 3. Específicos para el RNA 3 (48K)

CPV1	5' GCT TCC TGG AAA AGC TGA TG 3'
CPV2	5' TCT GTT TTT GTC AAC ACA CTC C 3'
CPV3	5' ATG TCG ATT CCT ATT AAA G 3'
CPV4	5' TTA AAG CAT AAC ATG CAA GC 3'
C2	5' TAT TGA GCT CAG CAT CTG GG 3'
C	5' ATC TTG AGA AAT ACC CTT GC 3'
D	5' CTC AAT ATG CTT GTG ACT GC 3'
NC2	5' AGC ACA GCT TAT CTG GCT GG 3'
55D	5' CCA GTC TCT CTC AGA ACT CC 3'

IV. B. 4. Primers comerciales

SP6	5' TAT TTA GGT GAC ACT ATA G 3'
T7prom	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'
T7term	5' TAG TTA TTG CTC AGC GGT GG 3'
M13dir	5' GTT TTC CCA GTC ACG AC 3'
M13rev	5' CAG GAA ACA GCT ATGAC 3'

IV. B. 5. Primers específicos para los plásmidos binarios p35SGUSINT y pBIN19sgfp

1GUS	5' GGT GGG AAA GCG CGT TAC AAG 3'
2GUS	5' TGG ATT CCG GCA TAG TTA AA 3'
1sGFP	5' ATG GTG AGC AAG GGC GAG GA 3'
2sGFP	5' GGA CCA TGT GAT CGC GCT TC 3'
1NTP	5' GAC GAG GCA GCG CGG CTA T 3'
2NTP	5' AAG AAG GCG ATA GAA GGC GA 3'

V. Sueros comerciales utilizados

1. Suero anti conejo IgG-HRP: goat Anti-Rabbit-IgG (H+L) – Peroxidase, PIERCE
2. Suero anti conejo IgG-AP: goat Anti-Rabbit IgG (H+L) – Alkaline Phosphatase Conjugate (Human-Ad.), GIBCO BRL.
3. Suero anti ratón IgG-HRP: goat Anti-Mouse-IgG (H+L) – Peroxidase, PIERCE
4. Suero anti ratón IgG-AP: goat Anti-Mouse IgG (H+L) – Alkaline Phosphatase Conjugate, GIBCO BRL.

5. Suero anti-DsRed: Living Colors® DsRed Monoclonal Antibody, Clontech
6. Suero anti-GFP: BD Living Colors™ A. v. Monoclonal Antibody (JL-8), Clontech

MÉTODOS

VI. Minipreparación de DNA plasmídico

La purificación de DNA plasmídico se realiza mediante el método de lisis alcalina desarrollado por Birnboim y Doly (1979) con algunas modificaciones. Una alícuota de 1 ml de cultivo bacteriano saturado en medio LB (*Luria Bertoni*) con el antibiótico adecuado se centrifuga a 14000 xg durante 1 minuto. Este procedimiento se repite tres veces. Si se desea obtener un mayor número de bacterias se reemplaza el medio LB por TB (*Terrific Broth*). El *pellet* obtenido se resuspende en 200 µl de Solución I (25 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM glucosa; 10 mM EDTA), se agregan 300 µl de Solución II (0,2 N NaOH; 1% v/v SDS) y se incuba en agua-hielo durante 5 minutos. Luego se agregan 300 µl de Solución III (3M acetato de potasio pH 4.8) permitiendo la neutralización de la solución. Se incuba en agua-hielo durante 5 minutos. Se realiza una centrifugación a 14000 xg por 15 minutos. Al sobrenadante obtenido se le agrega RNAsa A a una concentración final de 20 µg/ml incubando a 37°C por 30 minutos. Posteriormente se realizan dos extracciones con un volumen de cloroformo para eliminar proteínas y se precipita el DNA plasmídico presente en la fase acuosa por el agregado de un volumen de isopropanol. Se centrifuga por 20 minutos a 14000 xg, el *pellet* se lava con etanol 70% y se resuspende en 20 µl de agua bidestilada estéril.

Cuando la preparación de DNA plasmídico es utilizada para secuenciación automática, se realiza una segunda precipitación del DNA con 400 mM NaCl y 6,5% Polietilenglicol 8000 (PEG₈₀₀₀). Tras incubar en hielo por 20 minutos, se centrifuga a 4°C durante 20 minutos a 14000 xg. El precipitado se lava con etanol 70%, se seca y se resuspende en agua bidestilada estéril.

VII. Colony-PCR

La verificación de la presencia y tamaño de los insertos se realiza por PCR, con los *primers* adecuados. Para ello, se utiliza una pequeña cantidad de cultivo bacteriano crecido en medio sólido que se resuspende en 10 µl de agua bidestilada estéril y se incuba a 100°C durante 5 minutos. Se centrifuga a 14000 xg durante 10 minutos y una alícuota del sobrenadante se utiliza como molde en las reacciones de PCR utilizando las condiciones que se describen posteriormente (ver inciso XIV. D).

VIII. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa (*Gene clean*)

El procedimiento utilizado es el que se detalla en el protocolo de GENE CLEAN III (BIO 101 Inc., Vista, California, EEUU). El fragmento de gel que contiene el DNA a recuperar se disuelve con 3 volúmenes de NaI 6M, calentando a 55°C por 5 minutos. A la agarosa disuelta se le agrega matriz de sílice (*glass milk*), se mezcla y se incuba a temperatura ambiente por 5 minutos. La suspensión de sílice se centrifuga y se lava 3 veces con *New Wash* (solución de NaCl, Tris, EDTA, agua y etanol). El *pellet* se seca al aire para eliminar los restos de alcohol y se agrega agua bidestilada estéril incubando por 2 o 3 minutos a 50°C, seguida de centrifugación durante 1 minuto a 14000 xg. El sobrenadante contiene el DNA de interés.

IX. Precipitación de productos de PCR utilizando PEG₆₀₀₀

Para purificar productos de PCR, separándolos de los *primers* y nucleótidos no incorporados en la reacción, se agregan 0,6 volúmenes de 20% p/v PEG₆₀₀₀, 2,5 M NaCl y se incuba 10 minutos a 37°C y, posteriormente 30 minutos a 4°C. Se centrifuga durante 20 minutos a 14000 xg. El *pellet* se lava con etanol 70%, se seca y se resuspende en agua bidestilada estéril.

X. Preparación de bacterias competentes

X. A. Bacterias competentes para el método químico

La preparación de bacterias competentes se realizó de acuerdo a Sambrook *et al.* (1989). Se cultiva la cepa de *E. coli* en medio LB, *overnight* a 37°C con agitación (200 rpm). Posteriormente, se realiza una dilución 1:100 del cultivo en 1 litro del mismo medio y las bacterias se crecen hasta fase logarítmica (DO_{600nm} de 0,5). La suspensión bacteriana se incuba durante 30 minutos en hielo, se centrifuga a 4°C, durante 10 minutos a 5000 xg. El sedimento bacteriano se resuspende en 100 ml de una solución de CaCl₂ 100mM. Se incuba en agua-hielo durante 30 minutos, se centrifuga durante 10 minutos a 5000 xg y se resuspenden en 2 ml de CaCl₂ 100mM. Se fraccionan en alícuotas de 100 µl y se congelan rápidamente a -70°C hasta que sean utilizadas.

X. B. Bacterias competentes para electroporación

El protocolo para la obtención de bacterias de *E. coli* para electrotransformación se basa en el reportado por Dower *et al.* (1988). Las bacterias se lavan con glicerol 10% v/v para eliminar todas las sales que puedan interferir en la conducción del pulso eléctrico. A partir de un cultivo saturado se realiza una dilución 1:100 en 1 litro de medio LB sin NaCl y se cultiva a 37°C con agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,5. Las bacterias se centrifugan a 4°C durante 10 minutos y a 5000 xg. El sedimento bacteriano se resuspende en glicerol 10% v/v. Este procedimiento se repite tres veces disminuyendo el

volumen de glicerol utilizado en los lavados. Por último, las bacterias se resuspenden en 2 ml de glicerol 10% v/v, se fraccionan en alícuotas y se congelan rápidamente a -70°C hasta que sean utilizadas.

Para la obtención de bacterias competentes de *A. tumefaciens* para electrotransformación, a partir de un cultivo saturado en LB crecido 48 horas 28°C se realiza una dilución 1:20 en 25 ml de medio LB y se cultiva a 28°C con agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,5 (aproximadamente 3 horas). Las bacterias se incuban durante 15 minutos en hielo y se centrifugan a 8000 xg durante 10 minutos a 4°C. El *pellet* se resuspende en 10 ml de medio HEPES (1mM HEPES, pH 7) y se centrifuga a 8000 xg durante 10 minutos a 4°C. Este procedimiento se repite resuspendiendo en 500 µl de medio HEPES. Posteriormente, las bacterias se resuspenden en 500 µl de glicerol 10 % v/v y se centrifugan a 8000 xg durante 10 minutos a 4°C. Por último, las bacterias se resuspenden en 200 µl de glicerol 10% v/v, se fraccionan en alícuotas y se congelan rápidamente a -70°C hasta que sean utilizadas.

XI. Métodos para la transformación bacteriana

XI. A. Mediante *shock* térmico

Se mezclan las bacterias competentes obtenidas por el método químico con el producto de ligación y se incuban durante 30 minutos en agua-hielo. Luego se aplica un *shock* térmico por 2 minutos a 42°C y la mezcla se incuba nuevamente en agua-hielo durante 10 minutos. Posteriormente las bacterias se crecen a 37°C durante una hora, en medio LB sin antibiótico. Se siembran en placas de LB con el antibiótico adecuado incubando a 37°C *overnight*. En el caso de la transformación con plásmidos recombinantes que permiten la identificación por color, en cada caja se esparce en la superficie, antes de la siembra de las bacterias, 30 µl de una solución 10 mg/ml de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido) y 2 µl de 1M IPTG (isopropiltio-β-galactósido).

XI. B. Mediante electroporación

Para realizar las electroporaciones se utilizó un electroporador Bio-Rad Gene Pulser™. Se mezclan las bacterias competentes obtenidas para este método con el producto de ligación incubando en hielo por 5 minutos. Posteriormente dicha mezcla se coloca en una cubeta de electroporación, que se ubica en el electroporador. Una vez ajustadas las condiciones de la electroporación (2,2 kV/0,2 cm; 25 µF y 200 Ω para *E. coli*, 2,2 kV/0,2 cm; 25 µF y 400 Ω para *A. tumefaciens*) se somete a las bacterias al impulso eléctrico. Inmediatamente se las diluye con medio LB sin antibiótico, se las crece durante 1 hora a 37°C para *E. coli* o 3 horas a 28°C para *A. tumefaciens* y se las siembra en placas de LB conteniendo el antibiótico adecuado y, si corresponde, X-gal e IPTG.

XII. Reacciones enzimáticas utilizadas en Ingeniería genética

XII. A. Reacción de *Fill-in* con el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa

Para generar extremos romos en fragmentos de restricción 5' extendidos se incubaba por cada 1 µg del molde, 0,1 mM de dNTPs (de cada uno), 2 U del fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa (Promega), 1 mg/ml BSA y el *buffer* de la enzima (50 mM Tris-HCl pH 7.2; 10 mM MgSO₄; 0,1 mM DTT). La mezcla se incubaba a 37°C durante 20 min. Se inactiva la enzima incubando a 70°C por 15 minutos. Para eliminar la enzima se realiza una extracción con fenol-cloroformo (1:1) seguida de precipitación alcohólica del DNA.

XII. B. Desfosforilación de fragmentos de restricción

Para realizar la desfosforilación de los extremos del DNA digerido se utilizó la enzima Fosfatasa alcalina, CIP (*calf intestinal*) de NEB. Para fragmentos de restricción 5' extendidos se utiliza 0,1 U de enzima por pmol de molde y para fragmentos 3' extendidos o romos se utiliza 1 U de enzima por cada pmol de molde en presencia de *buffer* de la enzima (100mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.9). Se incubaba 1 hora a 37°C. Posteriormente se inactiva la enzima agregando EDTA pH 8 a una concentración final de 5mM, incubando 10 minutos a 75°C y realizando una extracción fenol-cloroformo seguida de precipitación alcohólica del DNA.

XII. C. Ligación de *linkers*

Una vez que se han generado extremos romos mediante reacción *fill-in*, se realiza la ligación de *linkers* a fin de incorporar un sitio de restricción en los extremos de la molécula de DNA. Para ello se utiliza una relación molar *linker* : inserto de aproximadamente 100:1. Por ejemplo, por cada 1µg de plásmido pMOG180 (3800 pb) se agregan 0,2 µg de *linkers* *EcoRI* NEB (8pb), 1 U de T4 DNA ligasa y el *buffer* de la enzima (30 mM Tris-HCl pH 7.8; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT, 1 mM ATP). Se incubaba 22 horas a 14°C. Se inactiva la enzima calentando a 65°C durante 15 minutos.

XII. D. Reacciones de ligación

En general, cuando se ligaron insertos con extremos extendidos o productos generados por PCR se usó una relación molar de inserto:vector de 3:1. En cambio, cuando se ligaron moléculas con extremos romos, la relación molar inserto:vector utilizada fue de 5:1. En la mezcla de reacción se utiliza 1 U de T4 DNA ligasa por cada 1µg de molde y el *buffer* de la enzima (30 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP). Para extremos cohesivos se realiza una incubación por 3 horas a temperatura ambiente. Cuando se realiza la ligación de extremos romos se incubaba a 10°C *overnight* para incrementar la eficiencia del proceso.

En el caso de ligaciones de productos de PCR siempre se realizó la ligación utilizando el sistema pGEM[®]-T Easy Vector (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

XII. E. Digestión con enzimas de restricción

XII. E. 1) Digestión total

Las reacciones de digestión de DNA se realizaron de acuerdo a las condiciones especificadas por los proveedores. En general, para digerir totalmente 1 µg de DNA se utiliza 1 U de enzima en el *buffer* correspondiente y se incuba en las condiciones adecuadas. La inactivación de la enzima se realiza de acuerdo a las especificaciones comerciales (por calor o eliminación mediante extracción con fenol-cloroformo). Para corroborar que la digestión fue completa se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa incluyendo los controles de digestión correspondientes y marcadores de peso molecular.

XII. E. 2) Digestión parcial

Cuando fue necesario realizar digestiones parciales del DNA a fin de recuperar un fragmento determinado del patrón de digestión obtenido, primero se realizó una digestión de prueba. Para ello, se mantiene la concentración de enzima (1U por 1 µg de molde, en *buffer* y temperatura adecuada) y se realiza la incubación a diferentes tiempos a fin de determinar la condición óptima para obtener el fragmento deseado. Una vez establecida dicha condición se realiza la digestión y se recupera del gel de agarosa el fragmento de tamaño adecuado mediante *gene clean*.

XIII. Extracción y purificación de partículas virales, RNA, DNA y proteínas

XIII. A. Purificación parcial de partículas virales (P54)

Para la purificación de partículas virales a partir de tejido foliar infectado de *Chenopodium quinoa* con CPsV se siguió el protocolo descrito por García et al. (1991a). Brevemente, se realiza la molienda de hojas con lesiones locales en mortero agregando 10 volúmenes de *buffer* de homogenización, BH (50 mM Tris-ClH pH 8, 0,1% p/v cisteína, 0,1% p/v ácido ascórbico, 0,5% v/v β-mercaptoetanol), se filtra por gasa y clarifica el extracto filtrado con Cl₄C 8% v/v en BH por 10 minutos con agitación suave. Se centrifuga a 10000 xg durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se ultracentrifuga a 300000 xg durante 1 hora. El *pellet* obtenido (P54) se resuspende en BH (1 ml por cada 5g de material de partida) y se centrifuga a 10000 xg durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido contiene las partículas virales parcialmente purificadas. Todo el procedimiento se realiza manteniendo la temperatura entre 0 y 4°C.

XIII. B. Purificación de ácidos nucleicos mediante fenol-cloroformo

Para eliminar las enzimas utilizadas en el procedimiento de clonado que no pueden ser inactivadas por calor se realiza una extracción fenólica. Primero se diluye el volumen

de reacción por el agregado de agua bidestilada estéril a 200 μ l. Se realiza una primera extracción por el agregado un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Luego se realiza otra extracción agregando un volumen de cloroformo a fin de eliminar las trazas de fenol que puedan interferir en las posteriores reacciones de clonado. A fin de concentrar el DNA molde se realiza una precipitación alcohólica agregando acetato de sodio pH 5.4 a una concentración final de 300 mM y un volumen de isopropanol. Se incuba en hielo por 30 minutos y se centrifuga a 14000 xg por 20 minutos a 4°C. Se realiza un lavado utilizando etanol 70%. Se deja secar el *pellet* obtenido para eliminar las trazas de alcohol y se resuspende en un volumen adecuado de agua bidestilada estéril.

XIII. C. Extracción de RNA

XIII. C. 1) Utilizando el reactivo TRIZOL

La extracción de RNA total extraído de muestras de material foliar se realizó utilizando el reactivo TRIZOL (Life Technologies) de acuerdo a las especificaciones del fabricante, partiendo de aproximadamente 100 mg de tejido y resuspendiendo el RNA obtenido en 10 a 50 μ l de agua bidestilada estéril libre de RNasa.

XIII. C. 2) Mediante el método descrito por Bekesiova et al. (1999)

Para la extracción de RNA total utilizado en los *Northern blots* realizados durante el presente trabajo de tesis se utilizó el protocolo descrito por Bekesiova et al. (1999) para la extracción de RNA a partir de tejido vegetal con alto contenido de polisacáridos. Para ello se muele en mortero 1g de material foliar con nitrógeno líquido, se resuspende la molienda en 7 ml de *buffer* de extracción (2% p/v bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB); 2% p/v Polivinilpirrolidona 360000 (PVP 360000); 100 mM Tris-HCl pH8; 25 mM EDTA; 2M NaCl; 2% v/v β -mercaptoetanol) y se calienta a 65°C por 5 minutos. Se extrae dos veces con un volumen de cloroformo-isoamílico (24:1), separando las fases por centrifugación a 10000 xg durante 10 minutos a 4°C. A la fase acuosa se le agrega 0,25 volúmenes de LiCl 10M, se mezcla bien y se precipita el RNA incubando a 4°C *overnight*. Se centrifuga a 10000 xg por 20 minutos a 4°C y el *pellet* obtenido se disuelve en 500 μ l de agua bidestilada libre de RNasa. Se re-precipita el RNA con el agregado de acetato de sodio pH 5.4 a una concentración final de 300 mM y 2,5 volúmenes de etanol absoluto, incubando al menos 30 minutos a -70°C o a -20°C *overnight*. Se centrifuga a 10000 xg por 20 minutos a 4°C. Se lava el *pellet* con etanol 70%, se seca al aire para eliminar las trazas de alcohol y se resuspende en 20 μ l de agua bidestilada libre de RNasa. La concentración e integridad del RNA obtenido se verifica analizando una alícuota mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8%–TAE 1X libre de RNasa y en presencia de bromuro de etidio.

XIII. D. Extracción de DNA de tejido foliar

XIII. D. 1) Para Southern blot

Para la extracción de DNA genómico utilizado en los *Southern blots* realizados durante el trabajo de tesis se utilizó el protocolo descrito por Futterer et al. (1995). Se muele en mortero 1g de material foliar con nitrógeno líquido, se resuspende la molienda en 1,6 ml de *buffer* de extracción (50 mM Tris-HCl pH 8; 700 mM NaCl; 10 mM EDTA; 1% p/v CTAB; 1% v/v β -mercaptoetanol). Se incuban las muestras a 56°C durante 15 minutos. Se realiza una extracción utilizando 1 volumen de cloroformo-isoamílico (24:1). Se centrifuga a 14000 xg durante 15 minutos. A la fase acuosa obtenida se le agrega 0,1 volúmenes de 10% p/v CTAB y se mezcla suavemente. Se re-extrae la fase acuosa agregando 1 volumen de cloroformo-isoamílico (24:1). Se centrifuga a 14000 xg durante 15 minutos. A la fase acuosa obtenida se le agrega 1,2 volúmenes de *buffer* de precipitación (50 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM EDTA; 1% p/v CTAB), se mezcla suavemente incubando a temperatura ambiente durante 20 minutos y centrifugando a 14000 xg por 10 minutos. Se resuspende el *pellet* obtenido con 400 μ l de NaCl 1M, agregando 3 μ l de RNAsa (20 mg/ml) e incubando a 37°C durante 30 minutos. Se precipita el DNA agregando 2,5 volúmenes de etanol absoluto e incubando a -70°C durante 30 minutos o a -20 °C *overnight*. Se centrifuga a 14000 xg por 10 minutos a 4°C y se lava el *pellet* obtenido con etanol 70%, secándolo al aire para eliminar las trazas de alcohol. Se resuspende el DNA agregando 20 μ l de agua bidestilada estéril. La concentración e integridad del DNA obtenido se verifica analizando una alícuota mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8%–TAE 1X en presencia de bromuro de etidio.

XIII. D. 2) Para PCR

La extracción de DNA total de tejido vegetal para ser utilizado como molde en reacciones de PCR se realizó de acuerdo al protocolo descrito por McGarvey y Kaper (1991). Brevemente, se muelen aproximadamente 10 mg de material foliar (por ejemplo, extraído de las plántulas crecidas *in vitro*) con nitrógeno líquido en tubo de 1,5 ml con minipilón y se resuspende la molienda obtenida en 400 μ l de *buffer* de extracción (1% p/v CTAB; 50 mM Tris-HCl pH 8; 700 mM NaCl; 10 mM EDTA; 0,5% p/v PVP-4000; 0,1 % v/v β -mercaptoetanol). Se agita vigorosamente por 10 segundos. La mezcla obtenida se calienta a 60°C por 1 hora y, posteriormente, se extrae por el agregado de 400 μ l de cloroformo. El DNA de la fase acuosa se precipita agregando 1 volumen de isopropanol e incubando durante 15 minutos a -20°C. Se centrifuga a 14000 xg por 10 minutos a temperatura ambiente y se lava el *pellet* obtenido con etanol 70%, secándolo al aire para eliminar las trazas de alcohol. Se resuspende el DNA agregando 5 μ l de agua bidestilada estéril.

XIV. Métodos utilizados para el análisis de ácidos nucleicos

XIV. A. Tratamiento del RNA total con desoxiribonucleasa I (DNasa I)

Cuando fue necesario, el RNA total extraído de tejido foliar se trató con DNasa I libre de RNAsa a fin de eliminar trazas de DNA que pudieran generar falsos positivos en

reacciones de PCR. Para ello, se mezclan 8 μ l de RNA extraído con TRIZOL, 1U de la enzima DNasa I y 1 μ l del *buffer* de la enzima (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl). Se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente y se detiene la reacción por el agregado de 1 μ l de 25 mM EDTA calentando a 65°C por 10 minutos.

XIV. B. Obtención del cDNA (reacción de transcripción reversa, RT)

Se realiza en 10 μ l de reacción, a partir de 1 μ l de RNA total de tejido foliar o RNA viral. Se agrega el *primer* de interés a una concentración final de 10 μ M, 1 μ l de dNTPs (10 mM de cada uno) y 3 μ l de agua bidestilada libre de RNAsa. Se incuba a 75°C durante 3 minutos y se enfría rápidamente en agua-hielo por 5 minutos. Se agregan 100 U de transcriptasa reversa SuperScriptTMIII (Gibco BRL), 16 U de RNAsin® Inhibidor de Ribonucleasa (Promega), 1 μ l de DTT 0,1 M, y 2 μ l del *buffer* de la enzima. Se incuba a 42°C por 90 minutos. El producto generado en la reacción de RT se utiliza posteriormente como molde en reacciones de PCR.

XIV. C. Reacción de RT-PCR en una etapa

Para realizar las reacciones de RT-PCR en una etapa a 1 μ l de RNA total extraído con TRIZOL se le agregan los *primers* directo y reverso a una concentración final de 10 μ M, y agua bidestilada libre de RNAsa llevando a un volumen final de 10 μ l. Se incuba a 94°C durante 5 minutos y se enfría rápidamente colocando la mezcla en agua-hielo por 5 minutos. Se agregan 0,6 μ l de dNTPs (10 mM de cada uno), 12 U de transcriptasa reversa SuperScriptTMIII (Gibco BRL), 0,25 U de Taq DNA polimerasa, 16 U de RNAsin® Inhibidor de Ribonucleasa (Promega), 1,8 μ l de MgCl₂ 25 mM y de *buffer* de la enzima Taq DNA polimerasa (Promega) (50mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 9.0; 0.1% v/v Tritón X-100). Las condiciones de ciclado, en general, incluyen 30 minutos a 48°C para la reacción de RT, 4 minutos a 94°C para inactivar la transcriptasa reversa y como etapa inicial de desnaturalización, 36 ciclos de 10" a 94°C, 10" a 50°C (esta temperatura varia de acuerdo a los *primers* utilizados, ver Anexo 6) y 50" (este tiempo varia de acuerdo a la extensión del fragmento a amplificar, ver Anexo 6) a 72°C y una etapa de elongación final de 4 minutos a 72°C en un equipo *Gene Amp PCR System 2400 (PERKIN ELMER)*. Los productos de PCR se analizan por electroforesis en gel de agarosa 2%–TAE 1X en presencia de bromuro de etidio.

XIV. D. Reacción de PCR

Las reacciones de PCR se realizaron en un ciclador *Gene Amp PCR System 2400 (PERKIN ELMER)*. Para un volumen de reacción de 10 μ l se agregaron 1 μ l de *buffer* de Taq DNA polimerasa (50mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 9.0; 0,1% v/v Tritón X-100), 0,2 μ l dNTPs (10 mM de cada uno), 1,5 mM MgCl₂, los *primers* directo y reverso a una concentración final 1 μ M y 0,25 U de Taq DNA polimerasa (Promega). Las condiciones de ciclado generalmente son de 4 minutos a 94°C como etapa inicial de desnaturalización, 36 ciclos de 10" a 94°C, 10" a 50°C (esta temperatura varia de acuerdo a los *primers* utilizados, ver Anexo 6) y 50" (este tiempo varia de acuerdo a la extensión del fragmento

a amplificar, ver Anexo 6) a 72°C y una etapa de elongación final de 4 minutos a 72°C. Los productos de PCR se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa 2%–TAE 1X en presencia de bromuro de etidio.

XIV. E. Obtención de sonda de DNA marcada mediante PCR

Las condiciones de reacción y los reactivos que se usan son iguales a los de una reacción de PCR convencional, con la excepción de la concentración de los dNTPs.

XIV. E. 1) Marcada con DIG-11-dUTP

La obtención de la sonda se realiz mediante PCR de acuerdo a las especificaciones de fabricante (ROCHE applied Science). Para ello, se utiliza una mezcla donde la concentración de dTTP es 171,4 μM final y se agrega DIG-11-dUTP a una concentración final de 28,6 μM , con lo cual se establece una relación dTTP: DIG-UTP de 6:1. Los demás nucleótidos se agregan a una concentración final de 200 μM . La integridad y el tamaño de las mismas se verifican por electroforesis en gel de agarosa 2%–TAE 1X en presencia de bromuro de etidio. La concentración del producto amplificado es analizada mediante *dot-blot* a fin de determinar la dilución óptima de la sonda a utilizar en el ensayo de *Southern blot*.

XIV. E. 2) Marcada con $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP

Se utiliza una mezcla donde la concentración de dCTP (1 μM final) es cien veces menor que la de los demás nucleótidos y se agregan 40 μCi de $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP (3000 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$) por reacción. Las sondas obtenidas se purifican por pasaje por una columna de cromatografía de exclusión molecular Sephadex G-25 (Micro Bio-Spin Chromation columns, BIORAD) siguiendo las especificaciones del fabricante (Princeton separation Centri-sep columns).

XIV. F. Southern blot

Alícuotas de 20 μg del DNA total extraído de tejido foliar se digieren con las enzimas de restricción adecuadas y los fragmentos resultantes se resuelven en gel de agarosa en *buffer* TAE 1X. Previamente a la transferencia se incuba el gel en 250 mM HCl durante 15 minutos y posteriormente en solución de desnaturalización (500 mM NaOH; 1,5 M NaCl) dos veces durante el mismo período. Luego, se realiza 2 incubaciones de 15 minutos en solución de neutralización (500 mM Tris-HCl pH 7.2; 1,5 M NaCl; 1mM EDTA). El gel se lava con agua destilada estéril, se equilibra en *buffer* de transferencia durante 2 minutos y las muestras se transfieren *overnight* por capilaridad, en presencia de *buffer* SSC 20X (3M NaCl; 300 mM citrato de sodio, pH 7.6) a una membrana de nylon cargada positivamente (ROCHE), equilibrada con SSC 2X. Los ácidos nucleicos se fijan a la membrana por calor incubando 30 minutos a 120°C o durante 2 horas a 80°C. Posteriormente la membrana se hibrida con un fragmento de PCR marcado con DIG-dUTP o marcado con $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP.

La hibridación con la sonda marcada con digoxigenina se realiza en 5X SSC, 2% p/v de reactivo de bloqueo (ROCHE), 0.1% p/v N-lauroylsarcosine, 0.2% p/v SDS y 50 mM fosfato de sodio pH 7 a 65°C *overnight*. Después de 3 lavados en 2X SSC, 0.2X SSC y 0.1X SSC con el agregado de 0.1% p/v SDS a 65°C, la detección se realiza utilizando el sustrato quimioluminiscente de acuerdo a las especificaciones del fabricante (ROCHE applied Science). La membrana fue expuesta por 18 horas a una placa radiográfica.

La hibridación con la sonda marcada con α -³²P-CTP se realiza en 5X SSC, 5X Denhardt, 0.2% p/v SDS y 500 μ g/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado (Invitrogen) a 65°C *overnight*. Después de 3 lavados en 2X SSC, 0.2 X SSC y 0.1 X SSC con el agregado de 0.1% p/v SDS a 65°C la membrana fue expuesta a una placa radiográfica durante 30 días.

XIV. G. Northern blot

Alícuotas de 40 μ g de RNA total se incuban durante 5 minutos a 95°C en presencia de formamida-formaldehído y son fraccionadas por electroforesis en gel desnaturalizante de agarosa 1% conteniendo formaldehído en *buffer* MOPS (0,2M MOPS; 50 mM acetato de sodio; EDTA 10 mM). Los ácidos nucleicos son transferidos a una membrana de nylon cargada positivamente (ROCHE) mediante capilaridad en presencia de *buffer* 20X SSC. La membrana se fija por exposición a UV (320 nm) durante 5 minutos y se incuba con un fragmento de PCR marcado con α -³²P-CTP. La hibridación se realiza en 5X SSC, 2X Denhardt, 0.1% p/v SDS, 300 μ g/ml DNA de esperma de salmón desnaturalizado (Invitrogen) y 3 mg/ml tRNA de levadura desnaturalizado (SIGMA) a 65°C *overnight*. Después de 3 lavados en 2X SSC, 0.2X SSC y 0.1X SSC con el agregado de 0.1% p/v SDS a 65°C, la membrana se expone a una placa radiográfica durante 30 días.

XV. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

XV. A. Expresión de proteínas en células de insecto utilizando el sistema Bac-to-Bac

Los protocolos que se describen a continuación se basan en el manual de instrucciones de GIBCO BRL para el sistema de expresión de Baculovirus Bac-to-Bac

XV. A. 1) Transposición

Se utilizaron 100 μ l de bacterias competentes DH10Bac y 1ng de plásmido recombinante pFastBac-24K. El período de incubación a 37°C luego de la transformación se extendió a 4 horas, para lograr la transposición entre el plásmido pFast-Bac-24K y el báculo con un sitio blanco mini-attTn7 que contienen las bacterias DH10Bac. Estas poseen además un plásmido *helper* que provee en *trans* las enzimas necesarias para la transposición. Las bacterias se siembran en placas de LB conteniendo 50 μ g/ml de kanamicina, 7 μ g/ml de gentamicina, 10 μ g/ml de tetraciclina, 100 μ g/ml de X-gal y 40 μ g/ml de IPTG.

XV. A. 2) Aislamiento del DNA del Bócmido recombinante

Las colonias blancas obtenidas fueron analizadas mediante *colony-PCR* utilizando los *primers* M13dir y M13rev para confirmar la presencia del bócmido recombinante. Dado que las secuencias complementarias a dichos *primers* se encuentran a los lados de la región conteniendo el sitio mini-*attTn7*, en la región de complementación *lacZ- α* del bócmido, si la transposición ocurre, el producto de PCR utilizando dichos *primers* tendrá el tamaño del inserto más 2,43 kb (ver Anexo 7).

Luego de confirmada la presencia del inserto en el bócmido AcNPV-24K, se realizó la extracción de DNA del bócmido. Se crece la colonia bacteriana en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes. Se centrifugan 1,5 ml de cultivo a 14000 xg durante 1 minuto. Se descarta el sobrenadante y se resuspende en 0,3 ml de Solución I (15 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM EDTA; 100 μ g/ml RNAsa A). Se agrega 0,3 ml de Solución II (0,2 N NaOH; 1% SDS) y se mezcla suavemente. Se incuba a temperatura ambiente por 5 minutos. Lentamente se agrega 0,3 ml de 3M acetato de potasio pH 5.5, mezclando lentamente. Se coloca en hielo por 5-10 minutos. Se centrifuga a 14000 xg por 10 minutos. Se traspasa el sobrenadante a un tubo conteniendo 0,8 ml de isopropanol, mezclando e incubando en hielo por 5-10 min. Se centrifuga a 14000 xg por 15 minutos. Se descarta el sobrenadante y se lava el pellet con etanol al 70% y se deja secar a temperatura ambiente para eliminar las trazas de alcohol. El DNA contenido en el *pellet* se disuelve en 40 μ l de TE (10 mM Tris-HCl pH 8; 1mM EDTA). Se realiza el análisis de la integridad del DNA del bócmido AcNPV-24K mediante electroforesis de 5 μ l de la muestra obtenida en un gel de agarosa 0,5%–TAE 1X en presencia de bromuro de etidio. La presencia del bócmido se puede distinguir por la aparición de una banda que migra mas lentamente que el fragmento 23,1 kb del marcador de peso molecular DNA λ HindIII (ver Figura 3 del Capítulo 1).

XV. A. 3) Transfección de células *Spodoptera frugiperda* (Sf9) con el DNA del bócmido recombinante

Una vez purificado el DNA del bócmido AcNPV-24K, este se utiliza para la infección de células de insecto con el objetivo de producir la proteína recombinante 24K.

Se sembraron 9×10^5 células Sf9 en una placa de 35 mm de diámetro (10 cm²) con 2 ml de medio libre de suero (SFM por *serum free medium*) conteniendo 50 U/ml de penicilina y 50 μ g/ml de estreptomina. Se permitió que las células se adhieran incubando la placa a 27°C por al menos 1 hora. Antes de proceder a la transfección se prepararon las siguientes soluciones: A) 5 μ l del DNA del bócmido AcNPV-24K en 100 μ l de SFM sin antibióticos y B) 6 μ l del reactivo CellFECTIN (suspensión lipídica que favorece la introducción del DNA del bócmido en la célula de insecto) en 100 μ l de SFM sin antibióticos. Se combinaron las dos soluciones, mezclando bien e incubando por 15 a 45 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las células con 2 ml de SFM sin antibióticos. Se agregó 0,8 ml de SFM a los complejos DNA-lípidos y se mezcló lentamente. Se retiró el medio de lavado de la placa conteniendo las células y se agregó 1 ml de los complejos DNA-lípidos diluidos. Las células se incubaron por 5 horas a 27°C.

Se descartó la mezcla de transfección y se agregaron 2 ml de SFM conteniendo los antibióticos adecuados incubando las células a 27°C por 48 horas. Se colectó el sobrenadante conteniendo los virus recombinantes en un tubo estéril, clarificándolo por centrifugación a 500 xg durante 5 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo preservándolo a 4°C protegido de la luz.

XV. A. 4) *Infección de células Sf9 para generar stocks virales*

Se realizó la infección de monocapas de células Sf9 a 80% de confluencia, en placas de 35 mm de diámetro con 200 µl del sobrenadante de infección obtenido previamente. Se incubó 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se agregaron 2 ml de medio SFM con los antibióticos correspondientes. Las células se incubaron a 27°C colectando el sobrenadante a las 24, 48 y 72 horas post-infección obteniendo así los *stocks* virales.

XV. A. 5) *Ensayo de plaqueo viral para determinar el título de los stocks virales*

La determinación del potencial infeccioso de un stock viral puede ser analizada por la formación de placas en un cultivo inmovilizado de células crecidas en monocapa. Para ello, se infectaron placas de 35mm de diámetro conteniendo células Sf9 al 80% de confluencia con 500 µl de diluciones (1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶, 1:10⁷ y 1:10⁸) de cada *stock* viral. Se incubó durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Se retiraron los 500 µl de cada dilución y se agregaron 2 ml de agarosa 3% de bajo punto de fusión diluida al medio con SFM a una temperatura de 40°C. Se dejó 20 minutos hasta que la agarosa solidificó y se agregaron 2 ml de SFM incubándose a 27°C por 6 días.

Para realizar la coloración de las placas virales desarrolladas se retiraron los 2 ml de SFM y se fijaron las células agregando 2 ml de una solución de formaldehído al 4% en *buffer* PBS (140 mM NaCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 8mM Na₂HPO₄; 2,7mM KCl pH7.4) incubando durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se retiró cuidadosamente la agarosa de las placas de 35 mm agregando 0,5 ml de solución colorante (0,8% p/v azul de metileno, 48% v/v etanol, 0,005 % p/v KOH) e incubando por 15 segundos. Se lavó con agua y se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez finalizada la tinción se realizó el conteo de placas y se determinó el título del *stock* viral utilizando la siguiente fórmula:

Título del *stock* viral (PFU x ml⁻¹) = Factor de dilución x Nro de placas x 1/ml de *stock* viral usado para infectar

Siendo PFU las unidades formadoras de placa

XV. A. 6) *Amplificación de stocks virales*

Para la amplificación de los *stocks* virales se infectan células de insecto utilizando una multiplicidad de infección (MOI por *Multiplicity of infection*) de entre 0, 01 y 0,1 teniendo en cuenta la siguiente relación:

$$\text{Inóculo requerido (ml)} = \frac{\text{MOI deseada (PFU x ml}^{-1}\text{)} \times \text{número de células totales}}{\text{Título del stock viral (PFU x ml}^{-1}\text{)}}$$

Por ello, una vez establecidas la MOI de los diferentes stocks virales mediante el ensayo en placa, se realizó la infección de una monocapa de células Sf9 al 80% de confluencia utilizando un volumen del stock viral que permitió una MOI de 0,05 incubando 1 hora a temperatura ambiente. Se agregaron 2 ml de SFM con los antibióticos correspondientes y se incubó a 27°C colectando el sobrenadante de infección a las 72 horas.

XV. A. 7) *Infección de células para la producción de la proteína recombinante*

Para la producción de proteína recombinante se realiza la infección de células de insecto Sf9 y *High five*, Hi5 (*Trichoplusia ni*) variando la MOI utilizada (0.5, 2 y 5) y el tiempo de infección (24, 48, y 72 horas) a fin de determinar las condiciones óptimas de infección para un mayor rendimiento de la proteína deseada.

Para ello, se infectó la monocapa de células al 80% de confluencia crecida en placa de 35 mm con 200 µl de la dilución apropiada del stock viral en SFM. Se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Se agregaron 1,8 ml de SFM y se incubó a 27°C durante el tiempo determinado previamente. Se colectó la monocapa en el medio de cultivo centrifugándose durante 3 minutos a 500 xg. El *pellet* obtenido, conteniendo las células infectadas, se lavó con *buffer* PBS y se resuspendió en 50 µl de SB 1X (*Sample buffer*, ver *western blot*). La producción de proteína recombinante se analizó mediante SDS-PAGE resolviendo una alícuota del extracto de células infectadas en las diferentes condiciones.

XV. A. 8) *Purificación de la proteína 24K mediante columna de afinidad*

Establecidas las condiciones de máxima producción de proteína (células Hi5, MOI 2, 72 horas de infección) se realizó la purificación mediante cromatografía de afinidad. Para ello, una vez colectada la monocapa de células infectada se lavó con PBS y se resuspendió en *buffer* de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.9; 100 mM NaCl; 1 mM PMSF y 0,5% v/v Tritón X100). Se invirtió varias veces durante 1 minuto y luego, la muestra se pasó por una jeringa con aguja (26G½) a fin de romper el DNA celular y permitir que la solución pierda su viscosidad. Se centrifugó a 14000 xg durante 10 minutos y el sobrenadante resultante se incubó con resina de unión a histidina (Ni-NTA His•Bind® Resin, Novagen), la cual fue previamente activada, incubándola con NiSO₄ 50 mM y equilibrándola en *buffer binding* (200 mM Tris-HCl pH 7.9; 50 mM NaCl) según las especificaciones del fabricante. Se mantuvo en agitación durante 1 hora y se realizaron 3 lavados durante 10 minutos cada uno utilizando el *buffer* de lavado (10 mM Tris-HCl pH 6.3; 0,1M NaH₂PO₄). Para eluir la proteína unida a la resina se incubó durante 10 minutos en *buffer* de elusión (10 mM Tris-HCl pH 4.5; 0,1M NaH₂PO₄). En paralelo se analizó la purificación en condiciones desnaturizantes por el agregado de 8M urea a los *buffer* utilizados. A alícuotas de cada paso del proceso se les agregó un volumen igual de SB 2X y se analizó la presencia de la proteína recombinante mediante SDS-PAGE.

Cuando se aplicaron condiciones aún más estrictas de desnaturización, se realizó la lisis de las células en presencia 6M cloruro de guanidinio en el *buffer* de lisis realizando el resto del proceso de purificación de la proteína recombinante en 8M urea.

XV. B. Expresión de proteína recombinante en *E. coli* utilizando el sistema pET

En los siguientes apartados se describen los protocolos utilizados para la expresión y purificación de las proteínas 48K y 54K en células bacterianas.

XV. B. 1) *Inducción de proteína recombinante en células bacterianas*

Se cultivó la cepa de *E. coli* conteniendo el plásmido recombinante en medio LB con los antibióticos adecuados, *overnight* a 37°C con agitación (200 xg). Posteriormente, se realizó una dilución 1:100 del cultivo en el mismo medio y las bacterias se cultivaron entre 2 y 3 horas, hasta alcanzar la fase logarítmica (DO_{600nm} de 0,5) en las mismas condiciones de temperatura y agitación. Se agregó el inductor no metabolizable IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubó a 37°C con agitación. Se tomaron alícuotas de 1 ml a diferentes tiempos post-inducción y se centrifugaron durante 1 minuto a 14000 xg. El *pellet* conteniendo las bacterias inducidas fue resuspendido en SB 1X, calentando la solución obtenida a 100°C durante 5 minutos para permitir la lisis bacteriana y desnaturalización proteica. Dichas muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE a fin de corroborar la inducción de la expresión de la proteína recombinante. En paralelo se realizó el control del cultivo bacteriano crecido en las mismas condiciones pero sin el agregado de la molécula inductora.

XV. B. 2) *Preparación de fracción periplásmica de células bacterianas*

Para la preparación de la fracción periplásmica del cultivo bacteriano se siguió el protocolo de *shock* osmótico descrito por Ausubel et al., 1989. Para ello, un cultivo de BL21(DE3)-CodonPlus-RIL conteniendo el plásmido de expresión recombinante se indujo con IPTG a una concentración final de 1 mM durante 3 horas en las condiciones descritas anteriormente. Una alícuota de 15 ml se centrifugó a 5000 xg durante 10 minutos a 4°C. El *pellet* obtenido se resuspendió en igual volumen de *buffer* 100 mM Tris-HCl pH 8, 20 % p/v sacarosa y posteriormente se le agregó 30 μ l de EDTA 0,5 M. Se agitó lentamente durante 10 minutos a temperatura ambiente y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. El *pellet* obtenido se resuspendió lentamente por el agregado de 15 ml de $MgSO_4$ 5 mM agitando suavemente durante 10 minutos en hielo. Se centrifugó a 5000 xg durante 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante conteniendo la fracción periplásmica. Para analizar la presencia de la proteína recombinante, previamente, las proteínas presentes en una alícuota de dicho sobrenadante se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) como se describe a continuación. El *pellet* resultante contendrá la fracción citoplasmática insoluble consistente en los restos celulares y las proteínas agregadas en forma de cuerpos de inclusión.

XV. B. 3) *Precipitación de proteínas mediante TCA*

Las proteínas contenidas en una muestra pueden ser concentradas mediante su precipitación utilizando TCA. Para ello al volumen de muestra se le agregó 0,1 volúmenes

de una solución de TCA al 100% p/v y se mezcló mediante *vortex* durante 15 segundos. Se incubó en hielo durante 15 minutos como mínimo y luego se centrifugó a 14000 xg por 10 minutos a 4°C. El *pellet* obtenido se lavó dos veces con acetona 100% y se secó a temperatura ambiente. Luego se resuspendió en un volumen adecuado de SB 1X.

XV. B. 4) Purificación de cuerpos de inclusión (CI)

Los cuerpos de inclusión pueden ser recuperados de la fracción citoplasmática insoluble mediante etapas de lavado y centrifugaciones. Para ello, por cada gramo de cultivo de BL21(DE3)-CodonPlus-RIL conteniendo el plásmido de expresión recombinante inducido con 1mM IPTG durante 3 horas se resuspendió en 3 ml de *buffer* de lisis (100 mM Tris-HCl pH8; 1 mM EDTA, 100 mM NaCl; 200 uM PMSF). Se sonicó la muestra para producir la lisis de las bacterias mediante cuatro pulsos de 15W por 30 segundos en hielo. Se agregó lisozima a una concentración final de 1 mg/ml y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 4 mg de ácido deoxicólico por ml de solución agitando y se incubó a 37°C durante 10 minutos. Se centrifugó a 14000 xg durante 15 minutos a 4°C y el *pellet* se resuspendió en 9 volúmenes de *buffer* de lisis con el agregado de 0,5% v/v de Tritón-X100. Se incubó entre 5 y 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó en las condiciones anteriormente descritas. El *pellet* conteniendo la fracción insoluble enriquecida en los CI fue resuspendido en *buffer* PBS.

XV. B. 5) Purificación de proteína 54K mediante columna de afinidad

Se realizó la purificación de la proteína recombinante expresada en BL21(DE3)-CodonPlus-RIL a partir de un cultivo bacteriano inducido durante 3 horas por el agregado de IPTG a una concentración final de 1mM. El protocolo es similar al utilizado para la purificación de proteínas recombinantes expresadas en células de insecto con algunas modificaciones. El *pellet* bacteriano se resuspendió en *buffer* de lisis (200 mM Tris-HCl pH 7.9; 50 mM NaCl). Se invirtió varias veces y la muestra se pasó por una jeringa con aguja (26G½) a fin de romper el DNA bacteriano y permitir que la solución pierda su viscosidad. Se centrifugó a 3000 xg durante 15 minutos y el sobrenadante resultante se incubó durante 30 minutos con resina de unión a histidina previamente activada y equilibrada en *buffer binding*. Luego de la incubación, se realizó el lavado de la columna y el eluido usando las condiciones descritas anteriormente. Del mismo modo se realizó la purificación en condiciones desnaturizantes en presencia de 8M urea y 6M cloruro de guanidinio en el *buffer* de lisis. Las alícuotas de cada paso del proceso se analizaron mediante SDS-PAGE a fin de determinar la presencia de la proteína recombinante.

XV. C. Diálisis de las proteínas purificadas por cromatografía de afinidad

Con el objetivo de eliminar la urea presente en las muestras eluidas de la columna de afinidad se procedió a la diálisis de la solución, con *buffer* PBS, 4M urea durante 1 hora y posteriormente en *buffer* PBS, 2M urea por el mismo tiempo. Luego se realizó la diálisis *overnight* en *buffer* PBS, realizando a continuación un último cambio de *buffer* PBS

durante 2 horas. La muestra dializada se centrifugó durante 20 minutos a 14000 xg a fin de eliminar agregados proteicos no disueltos. Las proteínas presentes en el sobrenadante obtenido se cuantificaron por medida de absorbancia a 280nm.

XVI. Obtención de antisueros policlonales

XVI. A. Esquema de inmunización

Para la inoculación de los conejos y ratones se procedió como se detalla en los esquemas de inmunización (Tablas 1 a 3). Los ratones utilizados fueron hembras BALB/c y los conejos hembras de criadero de 6 meses de edad. En todos los casos, se realiza la mezcla del inmunógeno (proteínas 24K, 48K o 54K recombinantes) con el adyuvante adecuado hasta que se forma una emulsión. La extracción de sangre en los conejos inoculados se realiza a partir de la arteria auricular mientras que en los ratones inoculados se realiza a partir de la arteria caudal. La sangría a blanco de los conejos inoculados se efectuó mediante punción cardíaca, recogiénola en un frasco conteniendo 2 ml de citrato de sodio al 15% por cada 100 ml de sangre obtenida.

XVI. B. Obtención del suero

Una vez extraída la sangre de los animales inoculados se dejó coagular incubándola 8 horas a temperatura ambiente. El paquete globular se centrifugó durante 10 minutos a 1000 xg con el objetivo de separar el suero. Una posterior etapa de incubación de los restos celulares a 4°C *overnight* y centrifugación permite obtener suero adicional aunque, generalmente, presenta mayor hemólisis.

XVII. Análisis de las proteínas recombinantes y proteínas expresadas en tejido foliar

XVII. A. Extracción de proteínas totales de tejido foliar para ser analizadas mediante *Western blot*

Inmediatamente después de colectar las hojas, 100 mg de tejido foliar fueron disgregados en mortero con nitrógeno líquido e rápidamente resuspendidos en 200 µl de *buffer* de extracción (0,2% p/v PVP 40000; 50 mM Tris-HCl pH 6.8; 1% v/v β-mercaptoetanol). Se incubó a 4°C con agitación durante 30 minutos. Se centrifugó a 14000 xg por 10 minutos y al sobrenadante se le agregó un volumen igual de SB 2X (62,5 mM Tris-HCl pH 6.8; 2% p/v SDS; 10 % v/v glicerol; 5% v/v β-mercaptoetanol; 0,001% p/v azul de bromofenol). Las muestras se hirvieron por 5 minutos y se centrifugaron durante 5 minutos a 14000 xg para eliminar agregados. Una alícuota del sobrenadante se resolvió mediante SDS-PAGE a fin de analizar su composición y concentración proteica.

TABLA 1. Esquema de inmunización de conejos utilizando como inmunógeno CI de proteínas 48K o 54K expresadas en *E. coli*.

Día	Inoculación	Dosis de inmunógeno
1	Intradérmica (1 sitio) Intramuscular (4 sitios)	<ul style="list-style-type: none"> • 700 µg de proteína 54K (CI) resuspendidos en 500 µl de PBS + 500 µl de Adyuvante de Freud completo • 840 µg de proteína 48K (CI) resuspendidos en 500 µl de PBS + 500 µl de Adyuvante de Freud completo
22 1er <i>Booster</i>	Intradérmica (1 sitio)	<ul style="list-style-type: none"> • 350 µg de proteína 54K (CI) resuspendidos en 500 µl de PBS + 500 µl de Adyuvante de Freud incompleto • 300 µg de proteína 48K (CI) resuspendidos en 500 µl de PBS + 500 µl de Adyuvante de Freud incompleto
34	Extracción de sangre	
46 2do <i>Booster</i>	Intradérmica (1 sitio)	<ul style="list-style-type: none"> • 350 µg de proteína 54K (CI) resuspendidos en 500 µl de PBS + 500 µl de Adyuvante de Freud incompleto • 300 µg de proteína 48K (CI) resuspendidos en 500 µl de PBS + 500 µl de Adyuvante de Freud incompleto
59	Extracción de sangre	
66 3ro <i>Booster</i>	Intradérmica (1 sitio)	<ul style="list-style-type: none"> • 350 µg de proteína 54K (CI) resuspendidos en 500 µl de PBS + 500 µl de Adyuvante de Freud incompleto • 300 µg de proteína 48K (CI) resuspendidos en 500 µl de PBS + 500 µl de Adyuvante de Freud incompleto
80	Extracción de sangre	
93 4to <i>Booster</i>	Intradérmica (1 sitio)	<ul style="list-style-type: none"> • 200 µg de proteína 54K (CI) resuspendidos en 500 µl de PBS + 500 µl de Adyuvante de Freud incompleto • 250 µg de proteína 48K (CI) resuspendidos en 500 µl de PBS + 500 µl de Adyuvante de Freud incompleto
109	Extracción de sangre por punción cardíaca	

TABLA 2 Esquema de inmunización de conejos utilizando las proteínas 24K o 54K expresadas en células de insecto y *E. coli*, respectivamente, purificadas mediante cromatografía de afinidad.

Día	Inoculación	Dosis de inmunógeno
1	Intradérmica (1 sitio) Intramuscular (4 sitios)	<ul style="list-style-type: none"> • 700 µg de proteína 24K resuspendidos en 500 µl de PBS + 500 µl de Adyuvante de Freud completo • 800 µg de proteína 54K resuspendidos en 500 µl de PBS + 500 µl de Adyuvante de Freud completo
21 1er <i>Booster</i>	Intradérmica (1 sitio)	<ul style="list-style-type: none"> • 350 µg de proteína 24K resuspendidos en 500 µl de PBS + 500 µl de Adyuvante de Freud incompleto • 400 µg de proteína 54K resuspendidos en 500 µl de PBS + 500 µl de Adyuvante de Freud incompleto
31 Extracción de sangre		
45 2do <i>Booster</i>	Intradérmica (1 sitio)	<ul style="list-style-type: none"> • 350 µg de proteína 24K resuspendidos en 500 µl de PBS + 500 µl de Adyuvante de Freud incompleto • 400 µg de proteína 54K resuspendidos en 500 µl de PBS + 500 µl de Adyuvante de Freud incompleto
55 Extracción de sangre		
67 3er <i>Booster</i>	Intradérmica (1 sitio)	<ul style="list-style-type: none"> • 350 µg de proteína 24K resuspendidos en 500 µl de PBS + 500 µl de Adyuvante de Freud incompleto • 400 µg de proteína 54K resuspendidos en 500 µl de PBS + 500 µl de Adyuvante de Freud incompleto
77 Extracción de sangre		
90 4to <i>Booster</i>	Intradérmica (1 sitio)	<ul style="list-style-type: none"> • 350 µg de proteína 24K resuspendidos en 500 µl de PBS + 500 µl de Adyuvante de Freud incompleto • 400 µg de proteína 54K resuspendidos en 500 µl de PBS + 500 µl de Adyuvante de Freud incompleto
101 Extracción de sangre por punción cardíaca		

TABLA 3 Esquema de inmunización de ratones utilizando las proteínas 24K o 54K expresadas en células de insecto y *E. coli*, respectivamente, purificadas mediante cromatografía de afinidad.

Día	Inoculación	Dosis de inmunógeno
1	Intraperitoneal (1 sitio)	<ul style="list-style-type: none"> • 20 µg de proteína 24K resuspendidos en 100 µl de PBS + 100 µl de Adyuvante de Freud completo (Titer Max Gold Adjuvant, SIGMA) • 20 µg de proteína 54K resuspendidos en 100 µl de PBS + 100 µl de Adyuvante de Freud completo (Titer Max Gold Adjuvant, SIGMA)
29 1er <i>Booster</i>	Intraperitoneal (1 sitio)	<ul style="list-style-type: none"> • 10 µg de proteína 24K resuspendidos en 100 µl de PBS + 100 µl de Adyuvante de Freud incompleto • 10 µg de proteína 54K resuspendidos en 100 µl de PBS + 100 µl de Adyuvante de Freud incompleto
40 2do <i>Booster</i>	Intraperitoneal (1 sitio)	<ul style="list-style-type: none"> • 10 µg de proteína 24K resuspendidos en 100 µl de PBS + 100 µl de Adyuvante de Freud incompleto • 10 µg de proteína 54K resuspendidos en 100 µl de PBS + 100 µl de Adyuvante de Freud incompleto
50	Extracción de sangre	
61 3ro <i>Booster</i>	Intraperitoneal (1 sitio)	<ul style="list-style-type: none"> • 10 µg de proteína 24K resuspendidos en 100 µl de PBS + 100 µl de Adyuvante de Freud incompleto • 10 µg de proteína 54K resuspendidos en 100 µl de PBS + 100 µl de Adyuvante de Freud incompleto
72	Extracción de sangre	
91 4to <i>Booster</i>	Intraperitoneal (1 sitio)	<ul style="list-style-type: none"> • 10 µg de proteína 24K resuspendidos en 100 µl de PBS + 100 µl de Adyuvante de Freud incompleto • 10 µg de proteína 54K resuspendidos en 100 µl de PBS + 100 µl de Adyuvante de Freud incompleto
101	Extracción de sangre	
118 5to <i>Booster</i>	Intraperitoneal (1 sitio)	<ul style="list-style-type: none"> • 10 µg de proteína 24K resuspendidos en 100 µl de PBS + 100 µl de Adyuvante de Freud incompleto • 10 µg de proteína 54K resuspendidos en 100 µl de PBS + 100 µl de Adyuvante de Freud incompleto
127	Extracción de sangre	

XVII. B. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE)

El análisis electroforético de las muestras proteicas se efectúa utilizando el equipo Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell Biorad, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la preparación del gel de poliacrilamida se siguió el protocolo descrito por Laemmli (1970) con modificaciones como se describen en *Mini-protean II Electrophoresis Cell Manual, Bio-Rad, California, EEUU*. El porcentaje de poliacrilamida de los geles realizados se seleccionó de acuerdo al tamaño de la proteína recombinante expresada. En general, para la proteína 48K y 54K, y sus fusiones a GFP y DsRed se seleccionaron geles de poliacrilamida 10% mientras que para el análisis de la proteína 24K se utilizaron geles de poliacrilamida 14%.

XVII. C. Western blot

Para la transferencia de las proteínas separadas mediante SDS-PAGE a membrana de PVDF (Polifluoruro de vinilideno) (Hybond-P, Amersham Pharmacia, Biotech) se utilizó el sistema Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell de Bio-Rad (BioRad Laboratorios, California, EEUU) y se procedió de acuerdo a las especificaciones del fabricante descritas en el manual de instrucciones.

Una vez finalizada la transferencia, la membrana se bloquea con 5% p/v de leche descremada en TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5; 500 mM NaCl) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realiza un lavado en TBS durante 5 minutos en agitación. Se incuba la membrana durante 75 minutos a temperatura ambiente con la dilución adecuada del anticuerpo primario diluido en TBS-T (TBS con el agregado de 0,05% v/v de Tween 20) con 3% p/v de leche descremada. Se realizan 3 lavados con TBS-T durante 5 minutos en agitación. Se incuba durante 75 minutos a temperatura ambiente con la dilución adecuada del anticuerpo secundario (anti-conejo-IgG o anti-ratón-IgG conjugado a HRP, *Horseradish Peroxidase* o AP, *Alkaline Phosphatase*) diluido en TBS-T con 3% p/v de leche descremada. Se realizan 3 lavados con TBS-T durante 5 minutos en agitación y un último lavado en TBS para eliminar las trazas de detergente. El sustrato usado para el revelado de la membrana depende del anticuerpo secundario utilizado:

- 1) En el caso del anticuerpo conjugado a HRP se revela usando un sustrato quimiolumincente. Para ello se preparan las siguientes soluciones: 1) 33 μ l 1,5M Tris-HCl pH 8.8; 2,2 μ l de ácido paracumárico, 5 μ l luminol; 460 μ l de agua bidestilada estéril y 2) 33 μ l 1,5 M Tris-HCl pH 8.8; 0,31 μ l de H₂O₂ 30 vol.; 470 μ l de agua bidestilada estéril. Las dos soluciones se mezclan e inmediatamente se incuba la membrana con la solución resultante por 5 segundos. Se retiran los restos del sustrato secando la membrana con papel de filtro y se expone a una placa radiográfica por 15 minutos.

- 2) En el caso del anticuerpo conjugado a AP se revela utilizando un sustrato cromogénico. Para ello se disuelven 5 μ l de NBT (nitro blue tetrazolium) y 4 μ l de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-phosphate) por ml de *buffer* sustrato (100 mM Tris-HCl pH 9.5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂). Se incuba la membrana en la solución resultante hasta aparición de las bandas de interés. Se detiene la reacción lavando la membrana con agua bidestilada.

XVII. D. Dot blot

Para la determinación del título de los sueros obtenidos contra el antígeno puro cuantificado se realizaron ensayos *dot blots* siguiendo las instrucciones descritas en el manual de instrucciones *Hybond-P: PVDF Membrane, optimized for protein transfer* para el protocolo de *dot blotting manual*. Una vez aplicadas las muestras en la membrana Hybond-P, PVDF se procede a la incubación con los anticuerpos adecuados y al revelado de la membrana como se describió previamente para el *western blot*.

XVII. E. ELISA indirecto

Para el desarrollo del ELISA indirecto se tapiza el pocillo de la microplaca con 50 μ l (3 μ g/ml) de proteína pura resuspendida en *buffer coating* (100 mM carbonato de sodio-bicarbonato de sodio pH 9.6) incubando *overnight* a 4°C. Se utiliza esta concentración de antígeno dado que se considera que la concentración óptima para la sensibilización de placas de ELISA esta comprendida entre 1 y 10 μ g/ml para antígenos puros (Zwirner, 1996). Luego se realizan 3 lavados con PBS-T (PBS con el agregado de 0,05 % Tween 20). Se realiza el bloqueo de los pocillo usando 100 μ l de 3% p/v de leche descremada en *buffer* PBS (*buffer* de bloqueo) durante 1 hora a 37°C. Se realiza el lavado como se describe anteriormente y se incuba 1 hora a 37°C con 50 μ l de la dilución adecuada del suero primario en *buffer* de bloqueo. Se realizan 4 lavados con PBS-T y se incuba con 50 μ l de la dilución del anticuerpo secundario correspondiente (anti-ratón-IgG o anti-conejo-IgG conjugado a HRP) en *buffer* de bloqueo. Se efectúan 4 lavados con PBS-T y se revela por el agregado del sustrato (1 μ l/ml de H₂O₂ 30 vol. y 1 mg/ml de OPD diluido en *buffer* 7,6 mM ácido cítrico; 10 mM Na₂HPO₄ pH 5) por 15 minutos. Se detiene la reacción con el agregado de 50 μ l de una solución 2M H₂SO₄ y se realiza la lectura de absorbancia a 492 nm en un lector de ELISA Tecan Spectra (Austria).

Las diluciones de los diferentes sueros fueron determinadas realizando experimentos de dilución seriada como se describe en el Capítulo 2.

XVII. F. Extracción de proteínas totales de tejido foliar para ser utilizadas en el ELISA competitivo secuencial

Las proteínas totales se extraen a partir de 200 mg de tejido foliar molido en mortero con nitrógeno líquido. El tejido molido inmediatamente se resuspende en 500 μ l de *buffer* de extracción (*buffer* PBS, 10 mM β -mercaptoetanol). Se incuba a 4°C con agitación durante 20 minutos. Se centrifuga a 14000 xg por 10 minutos y una alícuota del sobrenadante se utiliza para la determinación de la concentración de proteínas totales presentes en la muestra mediante el método Bradford.

XVII. G. Cuantificación de proteínas mediante el método Bradford

Previo al análisis de muestras mediante el ELISA competitivo secuencial se realizó la determinación de proteínas totales de dichas muestras utilizando el ensayo Bradford, (1976). Como proteína estándar para realizar la curva de calibración se utilizó BSA

(*Bovine Serum Albumin*). El procedimiento se realizó como se describe en el manual de instrucciones *Bio-Rad Protein Assay*. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

XVII. H. ELISA competitivo secuencial

Una vez determinadas las condiciones mediante los ensayos de ELISA indirecto descritos en el Capítulo 2 se estableció el siguiente protocolo para el ensayo de ELISA competitivo secuencial:

Se sensibiliza la microplaca de ELISA utilizando 50 μ l (3 μ g/ml) de proteína pura resuspendida en *buffer coating* incubando *overnight* a 4°C. Se realizan 2 lavados con PBS-T. Se realiza el bloqueo de los pocillos usando 100 μ l de *buffer* de bloqueo e incubando durante 3 horas a 37°C. En paralelo se realiza la competición de las muestras mezclando el extracto proteico (500 μ g/ml concentración final) con el suero anti-24K (dilución 1:8000) o suero anti-54K (dilución 1:9000) diluido en *buffer* de bloqueo 2X durante 1 hora a 37°C. Los pocillos son lavados 2 veces con PBS-T y posteriormente se incuban con 50 μ l de la solución de competición durante 1 hora a 37°C. Cada muestra fue testeada por triplicado. Se efectúan 4 lavados con PBS-T y se incuba cada pocillo con 50 μ l de suero anti-conejo-IgG conjugado a HRP, diluido 1:3000 en *buffer* de bloqueo durante 1 hora a 37°C. Se realizan 4 lavados con PBS-T y se revela por el agregado del sustrato OPD durante 30 minutos. Se detiene la reacción con el agregado de 50 μ l de una solución 2M H₂SO₄ y se realiza la lectura de absorbancia a 492 nm.

XVII. I. TAS-ELISA

Para los métodos inmunológicos se usaron dos antisueros policlonales: 1) el antisuero policlonal A322 descrito por García et al. (1997) y usado en el TAS-ELISA desarrollado por Alioto et al. (1999), obtenido por inyección de conejos con virus purificado parcialmente y 2) el antisuero policlonal A376 obtenido por el Dr. Piero Roggero (Istituto di Virologia Vegetale, Torino, Italia) por inyección de conejos con una mezcla de virus parcialmente purificados y proteína 48K recombinante expresada en *E. coli* (Dra. Susana Martín, IVIA, Valencia, España). Este antisuero fue gentilmente provisto por el Dr. Pedro Moreno (IVIA, Valencia, España).

En todos los ensayos de TAS-ELISA se utiliza el anticuerpo monoclonal MAbs 13C5 (IgG) (Alioto et al., 1999) gentilmente cedido por el Dr. Robert Milne (Istituto di Virologia Vegetale, Torino, Italia).

XVII. I. 1) TAS-ELISA-AP

El inmunoensayo triple sandwich (TAS-ELISA-AP) fue realizado como lo describe Alioto et al. (1999), con algunas modificaciones. Las proteínas totales se extraen de 200 mg de tejido foliar por molienda en mortero con nitrógeno líquido y el tejido molido se resuspende en 10 volúmenes de *buffer* PBS conteniendo 0.1 % v/v de Tween 20, 2 % p/v PVP-40000 y 2.5 % p/v de leche en polvo descremada. Los pocillos se tapizan con el antisuero policlonal A376 con una dilución 1:2500 y la microplaca es incubada por 4

horas a 37°C. Después de 3 lavados con PBS-T, alícuotas de las preparaciones de proteínas totales se agregan y se incuban a 4 °C *overnight*. Cada muestra se determina por triplicado. Luego de 5 lavados con PBS-T, los pocillos son incubados por 90 minutos a 37°C con una dilución 1:32000 del MAb 13C5 y luego de otros 5 lavados con el Antisuero Anti-ratón-IgG (H+L) conjugado a Fosfatasa alcalina (AP) por el mismo período. Se agrega el sustrato de la enzima, 1 mg/ml de p-nitrofenilfosfato concentración final diluido en *buffer* sustrato (970 µl de dietanolamina en 10 ml de agua bidestilada estéril, pH 9.8). Se realiza la lectura de DO a 405 nm después de 2 y 24 horas de incubación con el sustrato a temperatura ambiente. El tiempo total de ejecución del procedimiento es de 24 a 48 horas.

XVII. I. 2) TAS-ELISA-HRP

El procedimiento es similar al utilizado para el TAS-ELISA-AP con modificaciones. Se utiliza la misma dilución del anticuerpo policlonal A376 pero se utiliza una dilución 1:3000 del anticuerpo secundario anti-ratón-IgG (H+L) conjugado a la enzima peroxidasa (HRP). Se revela por el agregado del sustrato OPD durante 30 minutos a temperatura ambiente y la reacción se detiene agregando 50 µl de una solución 2M H₂SO₄. Posteriormente se realiza la lectura de DO a 492 nm. El tiempo total de ejecución del procedimiento es de 22 horas.

XVII. J. Análisis estadístico de los datos de lectura de DO

Los valores de densidad óptica obtenidos del análisis por TAS-ELISA-HRP para las líneas transgénicas 48K fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) según el programa STATISTICA (data analysis software system), versión 6. StatSoft, Inc. (2003). La comparación estadística entre medias fue realizada mediante el método de comparación múltiple de Fisher (LSD), utilizando el programa STATISTICA, versión 6.

XVIII. Transformación y regeneración de cítricos

XVIII. A. Procedimiento

Para la transformación de cítricos se siguió el protocolo reportado por Peña et al., 1995b.

Preparación de los explantos

Se utilizan brotes de plantines de naranjo dulce Pineapple de 6 a 12 meses, crecidos en el invernáculo. Una vez cortadas sus hojas y púas, se lavan con una solución de 0,1% v/v de Tween 20 y se desinfectan superficialmente durante 10 minutos en 2% v/v de hipoclorito de sodio conteniendo 0,1% v/v de Tween 20. Se enjuagan 3 veces con agua estéril en flujo laminar. Se cortan transversalmente segmentos internodales de aproximadamente 1 cm de longitud y se reservan en una placa húmeda estéril.

Inoculación

Se inoculan los explantos durante 15 minutos con *A. tumefaciens* EHA 105 conteniendo el vector binario recombinante a una concentración de 10^7 células/ml en medio MS (sales de Murashige y Skoog (1962) suplementadas con 100µg/ml *myo*-inositol; 0,2 µg/ml tiamina-HCl; 1 µg/ml piridoxina-HCl; 1 µg/ml ácido nicotínico; pH 5.7) suplementado con 3 % p/v sacarosa. Posteriormente, los explantos se secan en papel de filtro estéril a fin de retirar el exceso de cultivo bacteriano.

Cocultivo

Posteriormente se cultivan los explantos en placas con medio de cocultivo (medio MS suplementado con 3% p/v sacarosa, 2 µg/ml AIA (ácido indol acético), 2 µg/ml 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), 1 µg/ml 2iP (2-isopentenil adenina) que permite la formación del callo a partir de las células del cambium y se incuban en semioscuridad ($10 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) durante 3 días a 26 ± 2 °C, con un fotoperíodo de 16 horas.

Regeneración

Luego del cocultivo los explantos se transfieren a placas frescas conteniendo medio de regeneración (MS suplementado con 3 % p/v sacarosa y 3 µg/ml BAP (6-bencilaminopurina) a fin de inducir el desarrollo de brotes a partir de las células transformadas. Las concentraciones de los bacteriostáticos utilizadas en el medio de regeneración fueron de 250 µg/ml tanto para Cefotaxima como Vancomicina, además de la presencia de Kanamicina a una concentración final de 100µg/ml como presión de selección para permitir el crecimiento de los brotes transformantes y la inhibición de los brotes no transformados. Las placas conteniendo los explantos se incuban en oscuridad a 26 ± 2 °C durante 2 a 4 semanas para inducir la formación de callo y luego se transfieren a una cámara de cultivo con un fotoperíodo de 16 horas ($45 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) a 26 ± 2 °C a fin de inducir el crecimiento de los brotes presuntamente transgénicos. Los explantos son subcultivados en el mismo medio cada 3 a 4 semanas.

XVIII. B. Dificultades encontradas durante el procedimiento de transformación

Durante el procedimiento de transformación, en algunos de los experimentos surgieron contaminaciones con levaduras presentes en el material de partida utilizado (endógenas). La presencia de dichas contaminaciones repercutió en la eficiencia de transformación obtenida en los experimentos afectados, dado que el crecimiento de dichos microorganismos provocaba senescencia y pudrición de los explantos inoculados luego de unas semanas de iniciada la transformación. Así, muy pocos brotes se desarrollaban a partir del callo generado de las células del cambium de los explantos, haciendo que el análisis y recuperación de algún evento transgénico fuera improbable. La presencia de levaduras contaminantes se hizo más notoria en los experimentos realizados durante el verano. Solo la utilización de un excelente material vegetal de invernáculo (sanidad y estado fisiológico) permitió llevar adelante los experimentos de transformación con eficiencias cercanas a las reportadas por el grupo de investigación del Dr. Leandro Peña. Dicho material fue suministrado por la Ing. Agr. Norma Costa de la Estación Experimental INTA-Concordia, Entre Ríos.

XVIII. C. Ensayos de genes marcadores

Una vez desarrollados los brotes a partir de las células del cambium de los explantos de naranjo dulce, lo cual demanda entre 3 a 5 semanas después del cocultivo, se realiza la selección de los brotes por reacción histoquímica para GUS o detección de fluorescencia por iluminación UV (GFP) a fin de determinar la expresión de los genes marcadores *uidA* o *sgfp*, respectivamente, según el plásmido binario utilizado en la transformación.

XVIII. C. 1) Reacción histoquímica para GUS

El material utilizado para este ensayo es un disco cortado de la parte basal de los brotes regenerados de los segmentos internodales. Dichos discos se ensayaron para la expresión del gen *uidA* (GUS) incubando *overnight* a 37°C en una solución del reactivo colorante (100 mM Tris-ClH pH 7, 2mM X-Gluc (5-Bromo-4cloro-3-indolil-β-D-glucuronic acid cycloheximide salt), 0,01% v/v Tritón-X100, 50 mM NaCl) (Cervera *et al*, 2005). Cuando el material a ensayar fue una porción de hoja, luego de la incubación con la solución del reactivo colorante se procedió al lavado del tejido con 100 mM Tris-ClH pH 7 durante 5 minutos. Este procedimiento se repite 2 veces. Posteriormente se fijó el tejido incubándolo con 1% v/v glutaraldehído en 100 mM Tris-ClH pH 7 durante 3 horas a 10°C. Se realizaron 3 lavados con 100 mM Tris-ClH pH 7 durante 5 minutos. Se decoloró el tejido de la clorofila presente incubándolo durante 5 minutos con una serie creciente de soluciones conteniendo etanol: 30 % v/v, 50 % v/v, 70 % v/v, 90 % v/v y 100 % v/v. Se rehidrató el tejido invirtiendo los lavados de la serie de etanol, manteniendo la muestra en 100 mM Tris-ClH pH 7.

XVIII. C. 2) Visualización de fluorescencia por iluminación UV (GFP)

Los brotes regenerados a partir de los segmentos internodales transformados con el plásmido pBin19sgfp-24K se visualizan bajo una lupa Leica MZ8 equipada con un módulo de Fluorescencia GFP Plus que comprende un filtro de excitación de 480/40 nm, un filtro dicroico LP (*Long Pass*) 505 nm de emisión y filtro de bloqueo LP 510 nm. La autofluorescencia roja de la clorofila no fue bloqueada con ningún filtro de interferencia. Las fotografías se tomaron con una cámara Wild MP5 51S, LEICA usando un film Kodak Ektachrome 400. El tiempo de exposición óptimo fue de 5 a 10 minutos.

XVIII. D. Desarrollo de la plántula transgénica

XVIII. D. 1) Injerto *in vitro*

Para poder continuar con el desarrollo de la plántula transgénica, la parte apical de los brotes que resultaron positivos para la expresión del gen marcador fueron injertados *in vitro* sobre un pie etiolado de Citrange Troyer (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) decapitado permitiendo el contacto mutuo con los anillos vasculares. Las plántulas se

cultivaron en medio líquido (medio MS suplementado con 7,5 % p/v sacarosa) en cámara de cultivo a 26 ± 2 °C con un fotoperíodo de 16 horas ($45 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$).

XVIII. D. 2) PCR aplicada al análisis de las plántulas transgénicas

Luego de 3 a 4 semanas después de realizar el injerto, cuando las plántulas desarrollaron sus primeras hojas, se aplicó la técnica de PCR a fin de confirmar la presencia de los ORFs 24K, 48K y 54K. Como molde se utilizó una alícuota de DNA del material foliar de las plántulas a analizar extraído como se describe previamente (ver inciso XIII. D. 2).

XVIII. D. 3) Injerto sobre un pie vigoroso en invernáculo

Después de 6 a 8 semanas, las plántulas transgénicas positivas por PCR son injertadas en plantines de Limón rugoso (*Citrus jambhiri* Lush.) de 6 meses de edad y crecidas en invernáculo mantenido a 24-26°C con un fotoperíodo de 16 horas. Este trabajo fue realizado por la Ing. Agr. Norma Costa y la Biol. María Inés Plata en la Estación Experimental Agropecuaria INTA-Concordia, Entre Ríos.

XIX. Propagación de líneas transgénicas e inoculación mediante injerto

Para la propagación de las líneas transgénicas se utilizaron como pie plantines de limón rugoso de 6 a 8 meses de edad.

El injerto se realiza cortando una yema transgénica rodeada de un trozo de corteza. El corte abarca todo el espesor de la corteza y una finísima capa de lámina o de albura. Luego la yema seleccionada se coloca bajo la corteza de la planta a injertar. Para ello, se realiza una pequeña herida en forma de T invertida, a una altura de 10 cm del suelo, en el tronco de la planta que servirá como pie, la corteza de la planta debe desprenderse con facilidad. Una vez que las cortezas del injerto y del pie entran en contacto, el injerto se fija utilizando una cinta plástica tipo *Saran Wrap*. La parte apical de la planta receptora se flexiona atándola a la base para favorecer el desarrollo del injerto. A las dos semanas de realizado el injerto se inspecciona para asegurar que prendió, retirando la atadura del mismo. Una vez que la yema brotó, y cuando haya alcanzado unos 10 cm de crecimiento, se corta la copa del pie (limón Rugoso) a unos 10-20 cm por encima del injerto. Después de 10 a 12 meses de crecimiento, las propagaciones de la línea transgénica están en condiciones de ser desafiadas, realizándose mediante inoculación por injerto en forma de T-invertida con uno o dos trozos de corteza proveniente de un plantín infectado con el aislamiento CPV-4.

XX. Agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana*

Los experimentos de agroinfiltración se efectuaron de acuerdo al protocolo reportado por Llave et al., 2000. Para ello, se cultivó un clon de *A. tumefaciens* conteniendo el

plásmido binario correspondiente en medio LB con los antibióticos adecuados a 28 °C por 20 horas. Se realizó una dilución 1:10 en medio fresco LB mas el agregado de 20 µM de acetosiringona y 10 mM MES pH 5.7 con los antibióticos adecuados. Se incubó durante 16 a 20 horas a 28 °C. Se diluyó el cultivo en medio MES (10 mM MgCl₂, 10 mM MES pH 5.7) con el agregado de 150 mM acetosiringona a una DO_{600nm} de 0,5. Se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente. Se infiltró el envés de las hojas de *N. benthamiana* utilizando una jeringa de plástico sin aguja. Las plantas se mantuvieron durante 24 horas a 22°C bajo luz fluorescente y luego en cámara de cultivo con fotoperíodo de 16 horas a 22°C. El material extraído a distintos tiempos de las hojas agroinfiltradas se analizó mediante SDS-PAGE, *Northern blot*, RT-PCR y/o microscopía confocal.

Cuando se realizaron experimentos de co-agroinfiltración, luego de la incubación por 3 horas a temperatura ambiente y previo a la infiltración de las hojas de *N. benthamiana*, se mezclaron los cultivos de *A. tumefaciens* correspondientes en partes iguales.

XXI. Microscopía confocal

Después de 48 a 96 horas de infiltración con *A. tumefaciens* se retiró la capa de células epiteliales de las hojas de *N. benthamiana* para su observación. Se visualizó la fluorescencia GFP mediante el microscopio confocal de escaneo laser (Nikon C1) utilizando una lente Plan Apo, aumento del objetivo 40x con una apertura numérica de 0.95, perteneciente al Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET).

XXII. Diagnóstico de la psorosis de los cítricos (Métodos biológicos)

XXII. A. Muestras de campo

Las muestras de 21 árboles de campo de naranja dulce Valencia y Westin (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) y mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. Ex Tan) presumiblemente infectados con psorosis fueron colectadas de varios huertos ubicados en las provincias de Salta y Tucumán (Argentina) por la Ing. Arg. Beatriz Stein (Estación Experimental Agronómica Obispo Columbres, Tucumán). También fueron colectadas y examinadas 5 muestras provenientes de algunos de los árboles asintomáticos vecinos a las plantas sintomáticas y muestras provenientes del invernáculo, producidas durante el *indexing biológico*.

XXII. B. *Indexing* biológico utilizando plantas indicadoras

El *indexing* en plantas indicadoras usando plantines de naranjo dulce Pineapple se desarrolló de acuerdo al protocolo reportado por Roistacher (1991). Para ello, 4 plantines de 15 meses de edad se injertaron con 3 trozos de corteza tomadas de cada muestra presumiblemente infectada con psorosis. La aparición de síntomas, manchas y flecos cloróticos y reacción de *shock* en los brotes jóvenes en observaciones periódicas durante

las primeras 3 a 5 brotaciones post-inoculación se consideraron como positivo para el diagnóstico.

XXII. C. Protección cruzada

Dado que los síntomas característicos expresados en las plantas indicadoras también pueden ser manifestados por otras enfermedades, un ensayo de protección cruzada, más específico, se aplica a fin de determinar la infección con psorosis A (Roistacher y Calavan, 1965; Roistacher, 1991). Para este ensayo se utilizó la Ps 189-32, aislamiento de psorosis B, para desafiar los plantines previamente inoculados con el tejido presumiblemente infectado con psorosis A. Bajo condiciones de temperatura apropiadas (23-24°C), en los plantines controles no inoculados previamente se desarrollarán síntomas de psorosis B, goma en las ramas jóvenes y puntos cloróticos en hojas maduras que se correlacionan con pústulas presentes en el envés de la hoja. Las lesiones generalmente se inician cerca del sitio de inoculación entre las 6 a 8 semanas del inicio del ensayo. Si las lesiones no aparecen en los plantines indicadores previamente inoculados con la muestra a ensayar, existe protección contra el aislamiento de psorosis B y la planta de la cual proviene la muestra muy probablemente estará infectada con psorosis A.

CAPÍTULO 1. Obtención de plásmidos recombinantes utilizados durante el desarrollo de la tesis

- I. Construcciones para la generación de las plantas transgénicas que contengan marcos de lectura abiertos de CPsV.
- II. Construcciones para la expresión de proteínas de CPsV en sistemas heterólogos (*Escherichia coli* y células de insecto).
- III. Construcciones para la expresión de proteínas de CPsV fusionadas a proteínas reporteras para estudios de localización subcelular.

INTRODUCCION

En el transcurso de este Capítulo se detallarán los pasos que se siguieron para la generación de plásmidos recombinantes conteniendo los marcos de lectura abiertos (ORF, *open reading frame*) 24K, 48K y 54K de CPsV utilizados posteriormente en los experimentos que se desarrollaron y/o optimizaron en los subsiguientes capítulos de la tesis. Para ello, se aplicaron técnicas frecuentemente utilizadas en Ingeniería genética, las cuales se describen con detalle en Materiales y Métodos.

I. Construcciones de plásmidos binarios para la generación de las plantas transgénicas que contengan marcos de lectura abiertos de CPsV

En los siguientes apartados se explican las estrategias de clonado aplicadas para obtener plásmidos binarios que contengan ORF de CPsV para su expresión en cítricos. Estos plásmidos fueron introducidos en *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación de explantos de naranjo dulce Pineapple.

Inicialmente se construyeron plásmidos recombinantes a partir del plásmido pMOG180 (Mogen Internacional), el cual posee los elementos necesarios para la expresión de un ORF y sitios de restricción que permiten su clonado. El plásmido posee el promotor doble 35S de CaMV (*Cauliflower mosaic virus*), la secuencia líder del RNA4 de AIMV (*Alfalfa mosaic virus*) y *downstream* la secuencia terminadora del gen *nopaline synthase* (t-nos). Una vez obtenido el *cassette* de expresión se introduce entre los bordes derecho (BD) e izquierdo (BI) del T-DNA del plásmido binario seleccionado. Durante el presente trabajo se utilizaron los plásmidos binarios p35SGUSINT (Vancanneyt *et al.*, 1990) y pBIN19sgfp (Chiu *et al.* 1996), los cuales poseen, entre el BD y el BI, un gen de resistencia al antibiótico kanamicina (*neomycin phosphotransferase*, *nptII*) bajo el control del promotor 35S, además del *cassette* de expresión para genes marcadores (*uidA* y *sgfp*, respectivamente).

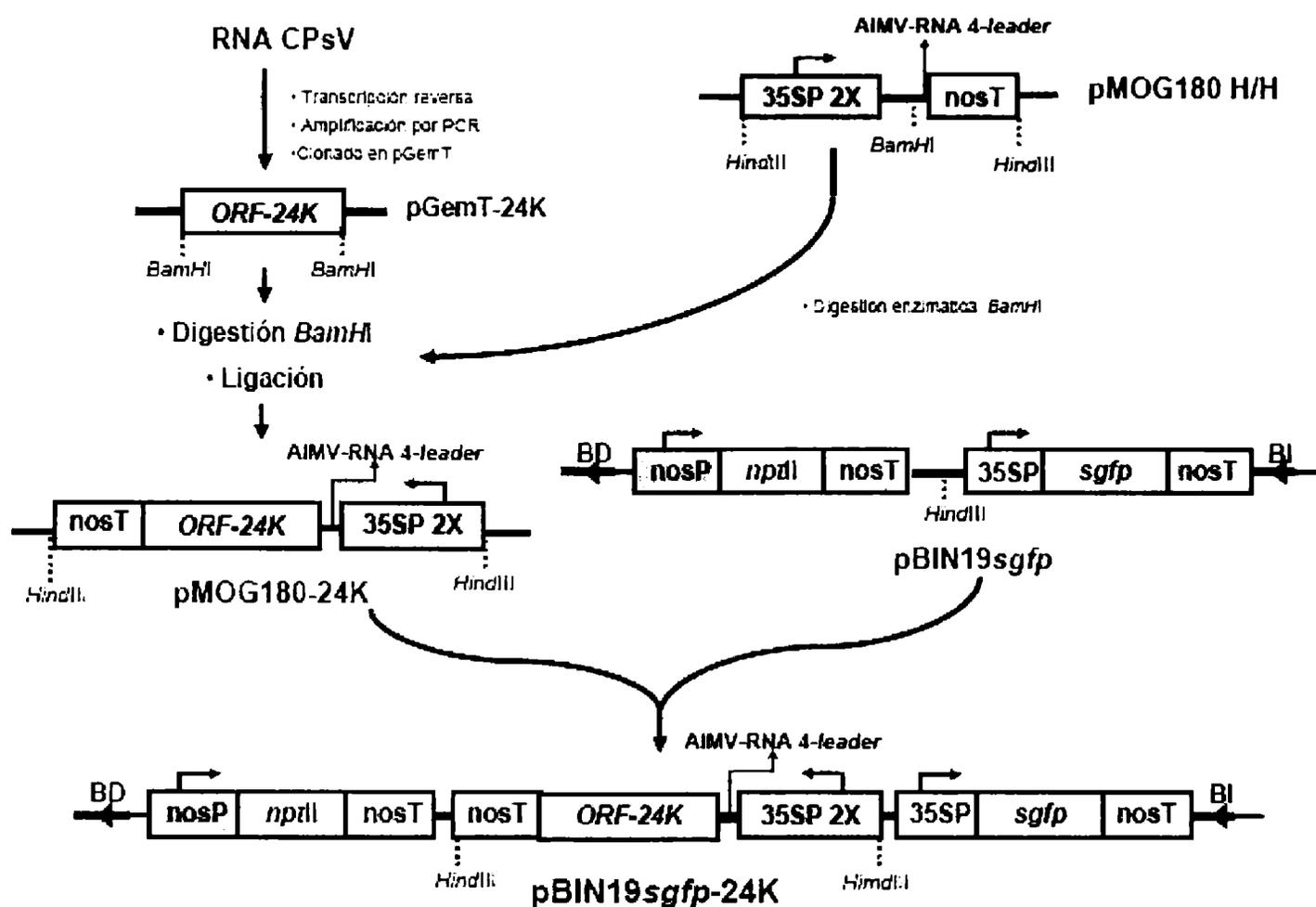
I. A. Plásmidos que contienen el ORF 24K (RNA 1)

La estrategia de clonado utilizada para la obtención del plásmido recombinante que exprese el ORF 24K se muestra en el Esquema 1.

I. A. 1) Obtención del plásmido pGemT-24K

Se diseñaron *primers* específicos (24kdir y 24krev) a partir de la secuencia del RNA 1 de CPsV del aislamiento de Florida (CPV4) publicada (Naum-Onganía *et al.*, 2003), modificando algunos nucleótidos en los extremos del fragmento, de modo de generar sitios de corte para diferentes enzimas (*Bam*HI y *Nco*I), que facilitarían la posterior estrategia de clonado del ORF.

A partir de una purificación parcial de virus obtenida de material infectado con CPsV (lesiones locales de *Chenopodium quinoa*) se extrajo el RNA viral y posteriormente, se



Esquema 1. Estrategia de clonado utilizada para la obtención del plásmido recombinante pBIN19sgfp-24K

generó cDNA del gen 24k utilizando el *primer* 24kdir mediante reacción de retrotranscripción (RT). Luego, se realizó PCR con los *primers* 24k que permitieron amplificar el ORF 24K completo y se clonó en el plásmido pGemT. Una alícuota de la ligación fue introducida en *E. coli* DH5 α F' mediante electroporación. Los clones positivos fueron seleccionados mediante *colony*-PCR (Ver Materiales y Métodos) utilizando *primers* específicos para el plásmido (SP6 y T7prom).

Se realizó la secuenciación del plásmido pGemT-24K utilizando *primers* específicos para el gen 24k (Ver Materiales y Métodos). Además se utilizaron los *primers* SP6 y T7prom que hibridan con secuencias contenidas en el plásmido pGemT. El análisis de la secuencia obtenida se corresponde con la esperada para el ORF 24K y solo se produjeron dos cambios en la secuencia nucleotídica que no provocaron modificaciones en la secuencia aminoacídica.

1. A. 2) Obtención del plásmido pMOG180-24K

El ORF 24K fue liberado del plásmido pGemT-24K mediante digestión con la enzima *Bam*HI. Este fragmento fue ligado al plásmido pMOG180 (H/H) linealizado con *Bam*HI. Este plásmido deriva del pMOG180, el cual ha sido modificado por la Dra. Magdalena Cervera (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), España) en los extremos flanqueantes al *cassette* de expresión de manera de poder liberarlo por medio de digestión con la enzima *Hind*III. Una alícuota de la ligación fue clonada en *E. coli* DH5 α F' y las colonias positivas fueron identificadas por *colony*-PCR utilizando los *primers* 24kdir y

24krev. Por medio de digestión enzimática se verificó la dirección de inserción del ORF 24K seleccionando los clones donde el fragmento 24K estuviera ubicado *downstream* del promotor 35S de CaMV.

Para constatar que no hubieran rearrreglos o modificaciones en los extremos del fragmento 24K luego del clonado en pMOG180 (H/H) se secuenciaron dichos extremos utilizando *primers* específicos para el ORF 24K que flanquearan dicha región (ver Materiales y Métodos).

I. A. 3) Obtención del vector binario pBIN19sGFP-24K

El *cassette* de expresión 24K fue liberado del plásmido pMOG180-24K mediante digestión con la enzima *HindIII* y recuperado del gel de agarosa por *gene clean* (ver Materiales y Métodos). Por otro lado, el plásmido pBIN19sgfp fue linealizado con *HindIII* y desfosforilado. Los dos fragmentos obtenidos fueron ligados y clonados en *E. coli DH5 α F'*. Los clones positivos fueron seleccionados mediante *colony-PCR* utilizando *primers* específicos (24kdir y 24krev). Además, se constató el clonado y la dirección de inserción por digestión enzimática.

El vector binario pBIN19sgfp-24K fue introducido en la cepa de *A. tumefaciens* EHA105 (Hood *et al.*, 1993) y las colonias positivas fueron seleccionadas por resistencia a antibiótico y *colony-PCR* utilizando *primers* específicos (24kdir y 24krev). De esta manera, se obtuvo el plásmido binario conteniendo el *cassette* de expresión para el ORF 24K (ver en el Esquema 1, clon pBIN19sgfp-24K).

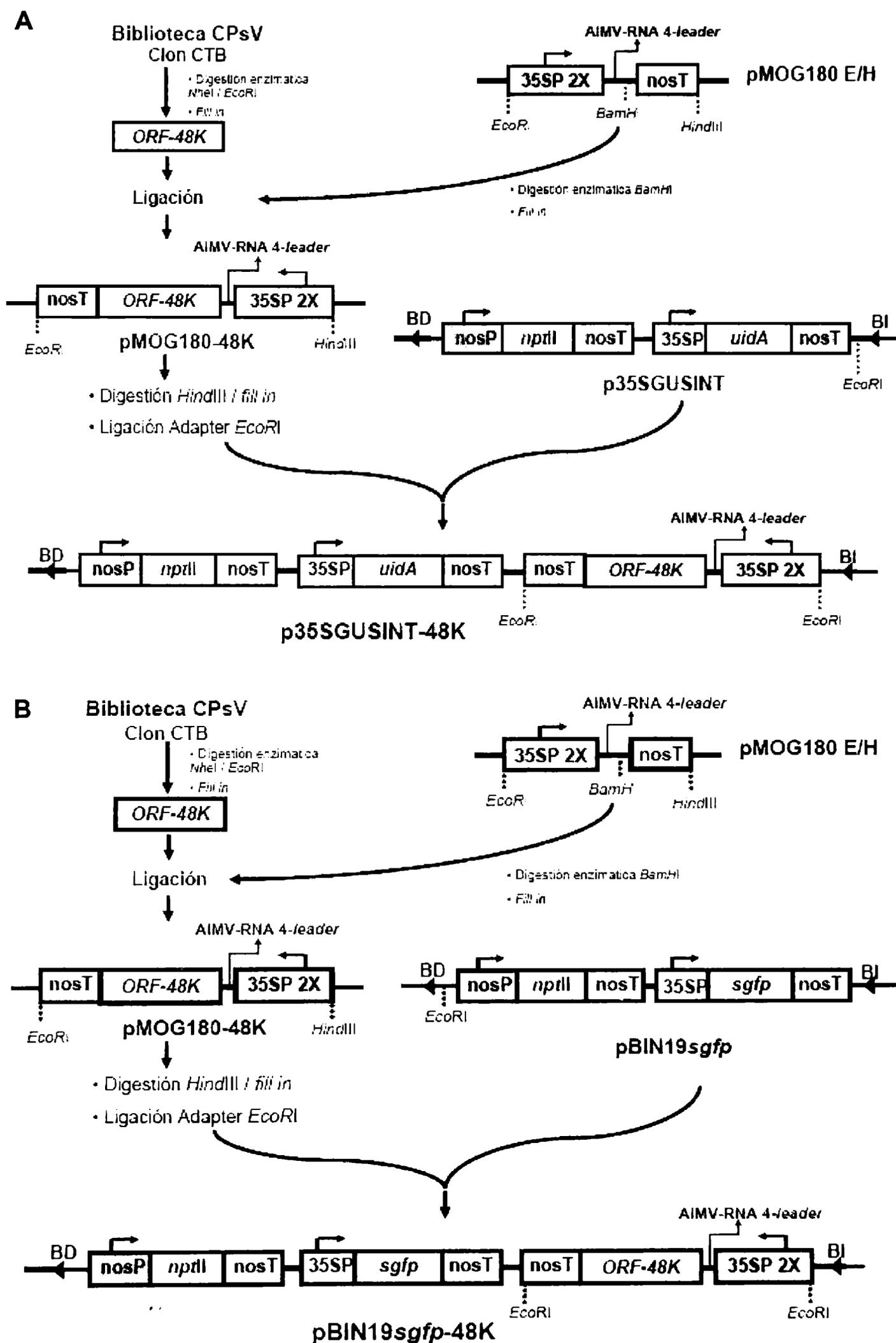
I. B. Plásmidos que contienen el ORF 48K (RNA 3)

La estrategia de clonado utilizada para la obtención de los plásmidos recombinantes que expresen el ORF 48K se muestra en los Esquemas 2A y 2B.

I. B. 1) Obtención del plásmido pMOG180-48K

A partir del clon CTb, obtenido por el Lic. Gonzalo Legarreta en el IBBM, el cual contiene el ORF 48K completo, se inició la construcción del *cassette* de expresión de dicho gen a fin de introducirlo en los plásmidos binarios p35SGUSINT y pBIN19sgfp. Por secuenciación mediante *primers* específicos se constató que no había cambios en la secuencia de nucleótidos del clon CTb que afectaran la traducción del ORF 48K.

Para liberar el fragmento de interés, a partir del DNA plasmídico del clon CTb, se realizó una digestión doble *EcoRI* / *NheI* y la banda de DNA del tamaño esperado fue recuperada de gel de agarosa. En paralelo, DNA del plásmido pMOG180 fue digerido con la enzima *BamHI* y purificado. En un mismo tubo de reacción, conteniendo el fragmento 48K y el plásmido pMOG180 linealizado, se rellenaron sus extremos mediante reacción *fill-in* (ver Materiales y Métodos). Se llevó a cabo la ligación de los fragmentos y el clonado posterior en *E. coli DH5 α F'*. La selección de clones positivos fue realizada por



Esquema 2. Estrategia de clonado utilizada para la obtención de los plásmidos recombinantes que expresan el ORF 48K. **A.** Plásmido binario p35SGUSINT-48K. **B.** Plásmido binario pBIN19sgfp-48K.

colony-PCR utilizando *primers* específicos (CPV1 y CPV2). Además se constató el clonado y la dirección de inserción mediante digestión enzimática.

Se verificó que no se produjeron rearrreglos ni modificaciones en los extremos del fragmento del ORF 48K mediante su secuenciación usando *primers* internos al fragmento 48K.

I. B. 2) Obtención de los vectores binarios *pBIN19sgfp-48K* y *p35SGUSINT-48K*

Se realizó el sub-clonado del *cassette* de expresión 48K proveniente del pMOG180-48K en los vectores binarios *pBIN19sgfp* y *p35SGUSINT*. Para ello, fue necesario introducir un nuevo sitio de corte *EcoRI* flanqueante al *cassette* 48K, por lo cual, se realizó una primera digestión del clon pMOG180-48K con la enzima de restricción *HindIII*, seguida de reacción *fill-in* para generar extremos romos y posterior ligación de *linkers* *EcoRI*. Luego, se efectuó digestión con la enzima *EcoRI* permitiendo la liberación del *cassette* 48K con sus extremos *EcoRI* cohesivos. Este fragmento fue purificado y ligado a los vectores binarios *p35SGUSINT* (Esquema 2A) y *pBIN19sgfp* (Esquema 2B) linealizados con *EcoRI* y desfosforilados. El clonado de la ligación se hizo en *E. coli* *DH5 α F'*. La selección de clones positivos fue realizada por *colony-PCR* utilizando *primers* específicos (CPV1 y CPV2). Realizando una digestión enzimática se constató el clonado y la dirección de inserción.

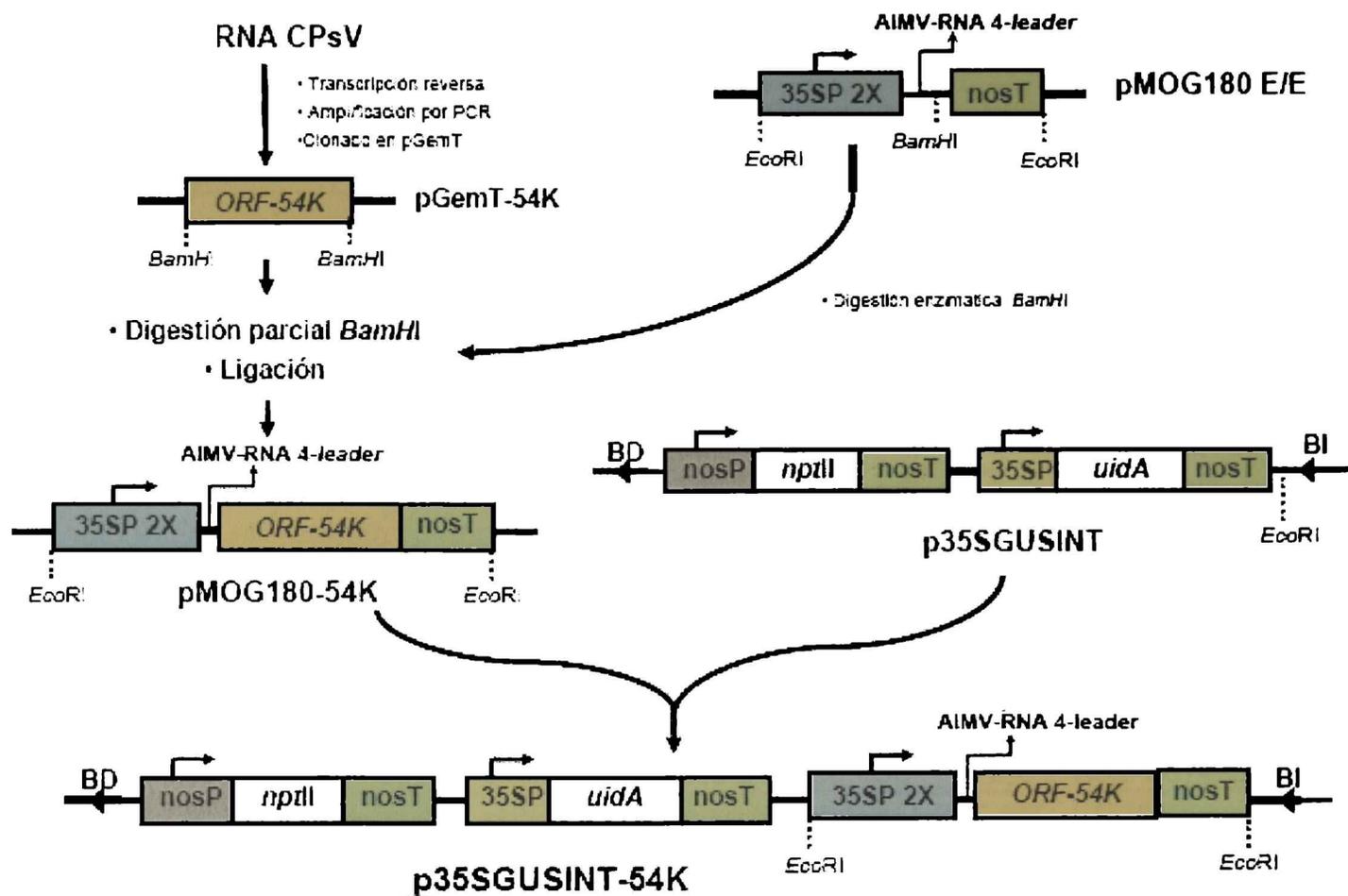
Mediante electroporación, los vectores binarios *pBIN19sgfp-48K* y *p35SGUSINT-48K* obtenidos, fueron introducidos en *A. tumefaciens* EHA105 y las colonias positivas fueron seleccionadas por resistencia a Kanamicina (Kn) y mediante *colony-PCR* utilizando *primers* específicos (CPV1 y CPV2).

I. C Plásmidos que contienen el ORF 54K (RNA 2)

La estrategia de clonado utilizada para la obtención del plásmido recombinante que exprese el ORF 54K se muestra en el Esquema 3. Previamente fue necesario generar el plásmido pMOG180 (E/E). En los siguientes apartados se detallan las estrategias efectuadas para tal fin.

I. C. 1) Obtención del plásmido *pMOG180 (E/E)*

Para abordar el clonado del ORF 54K en el plásmido pMOG180 (E/H) fue necesario modificar este último debido a que el fragmento que comprende el ORF 54K posee 3 sitios de reconocimiento para la enzima *HindIII*, por lo que esta enzima no podía ser utilizada. Por ello, se introdujo un nuevo sitio de corte para la enzima *EcoRI* dentro del plásmido pMOG180 (E/H), lo cual permitiría liberar el *cassette* de expresión utilizando esta única enzima. En la Figura 1 se muestra la estrategia de clonado aplicada para la obtención de este plásmido. El plásmido pMOG180 (E/H) fue digerido con la enzima *HindIII*, luego sometido a reacción *fill-in* y desfosforilación. Posteriormente, se realizó una ligación de *linkers* *EcoRI* al plásmido pMOG180 linealizado, la cual fue clonada en *E.coli*



Esquema 3. Estrategia de clonado utilizada para la obtención del plásmido recombinante p35SGUSINT-54K.

DH5 α F' y las colonias positivas fueron identificadas mediante digestión enzimática con *EcoRI*. En la Figura 1 se muestra el mapa de digestión del nuevo plásmido pMOG180 (E/E), obteniéndose el patrón de bandas correspondientes a las digestiones de las enzimas utilizadas, constatando que no se produjeron rearrreglos durante del proceso de clonado.

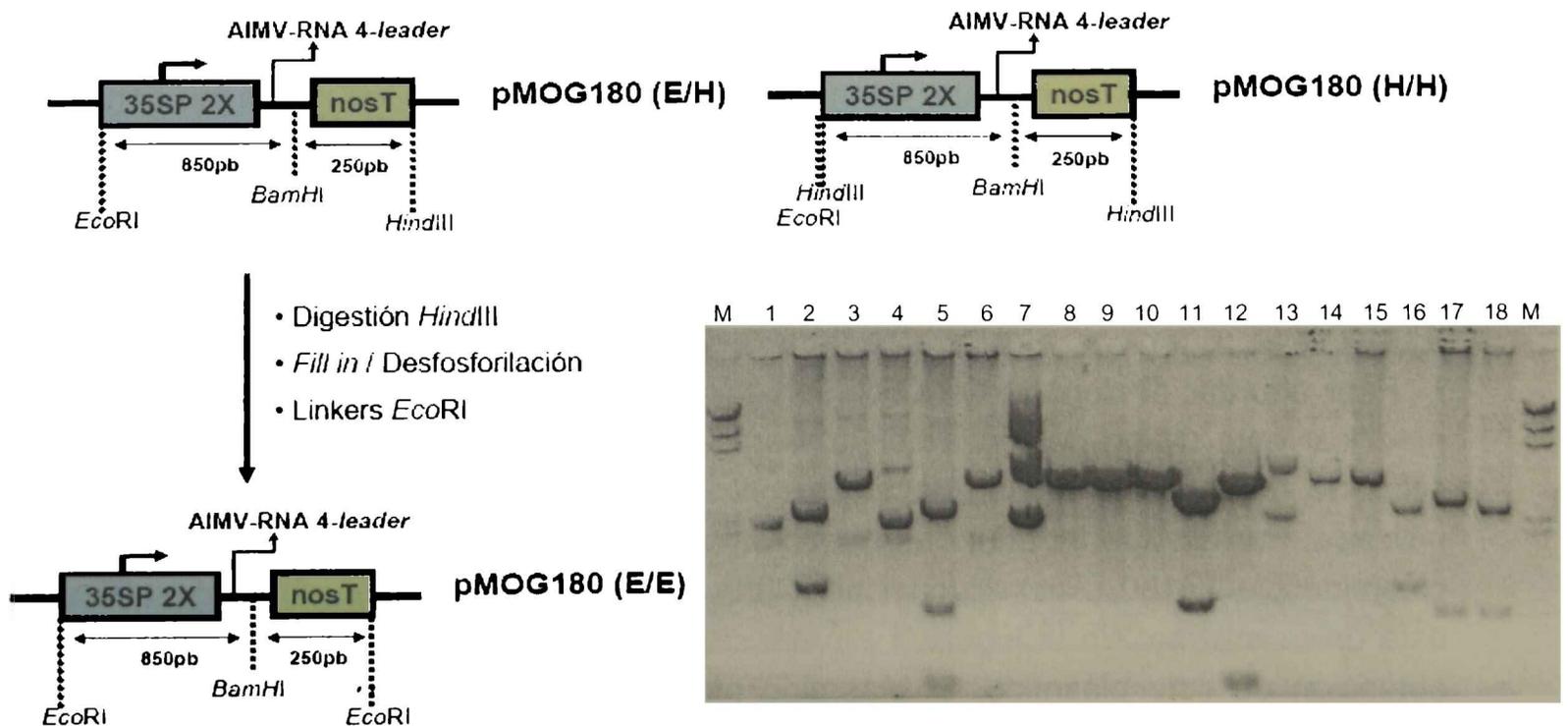


Figura 1. Mapas de digestión de los plásmidos pMOG180 (E/E), pMOG180 (E/H) y pMOG180 (H/H). Calles 1-6, pMOG180 E/E. Calles 7-12, pMOG180 E/H. Calles 13-18, pMOG180 H/H. En las calles 1, 7 y 13 el plásmido sin digerir, en 2, 8 y 14 digerido con *EcoRI*, en 3, 9 y 15 digerido con *BamHI*, en 4, 10 y 16 digerido con *HindIII*, en 5, 11 y 17 digerido con *BamHI* y *EcoRI*, y en 6, 12 y 18 digerido con *BamHI* y *HindIII*. M: Marcador de peso molecular Lambda/*HindIII* (23, 9, 6, 4, 2.3, 2 kb).

I. C. 2) Obtención del plásmido pGemT-54K

Se diseñaron *primers* degenerados (54k9011dir y 54k9011rev) a partir de la secuencia del RNA 2 de CPsV del aislamiento de Florida (CPV4) (Sánchez de la Torre *et al.*, 2002) y de la secuencia del aislamiento argentino 90-1-1 de CPsV obtenida por el Lic. Jones en el IBBM, modificando la secuencia de sus extremos de modo de generar sitios de corte para las enzimas *Bam*HI y *Nco*I, que facilitarían la posterior estrategia de clonado.

Utilizando purificaciones parciales del virus a partir de *C. quinoa* infectada con el aislamiento CPV4 se realizó una reacción de RT con el *primer* 54k9011dir para obtener cDNA del ORF 54K. Posteriormente, utilizando como molde una alícuota de la reacción de RT, se realizó PCR con los *primers* 54k9011dir y 54k9011rev que permitieron amplificar el ORF 54K completo. El producto de PCR se ligó en el plásmido pGemT, y una alícuota de la ligación fue introducida en *E. coli* DH5 α F' mediante electroporación. Los clones positivos fueron seleccionados por *colony-PCR* utilizando *primers* específicos para el plásmido (SP6 y T7prom) y para el fragmento introducido (54k9011dir y 54k9011rev). Se corroboró la secuencia clonada mediante secuenciación. Se produjeron 2 cambios de nucleóticos respecto a la secuencia CPV4 que generaron mutaciones silenciosas dentro del ORF 54K.

I. C. 3) Obtención del plásmido pMOG180-54K

Para clonar el ORF 54K completo en el sitio *Bam*HI del plásmido pMOG180 (E/E) fue necesario realizar una digestión parcial del plásmido pGemT-54K con dicha enzima para liberar el ORF debido a que dentro del fragmento 54K existe un sitio de corte para *Bam*HI (Figura 2). Este fragmento fue recuperado del gel de agarosa y ligado al plásmido pMOG180 (E/E) linealizado con *Bam*HI. El clonado de la ligación fue realizado en *E. coli* DH5 α F' y las colonias positivas fueron identificadas por *colony-PCR* utilizando los *primers* 54k9011dir y 54k9011rev. Por digestión enzimática se verificó la dirección de inserción del ORF 54K seleccionando los clones donde el fragmento 54K estuviera *downstream* del promotor 35S de CaMV (Esquema 3, clon pMOG180-54K).

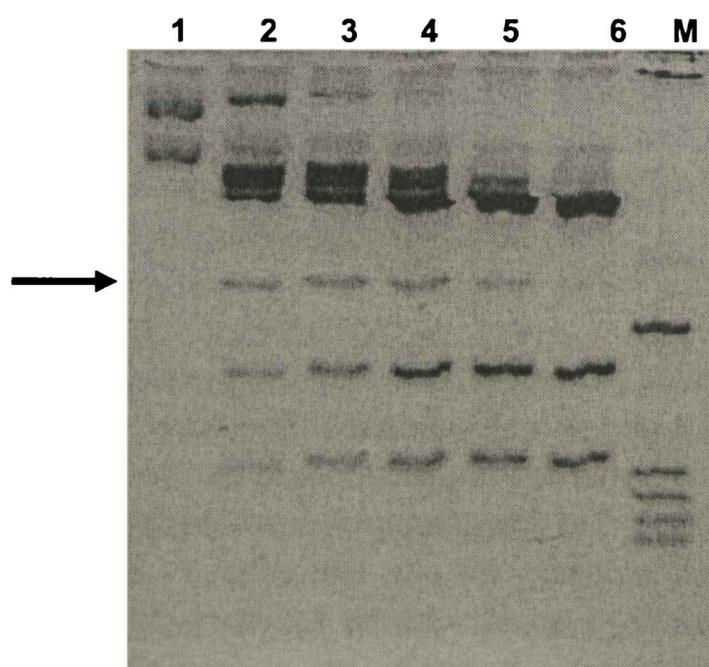


Figura 2. Digestión parcial de pGemT-54K. Calle 1: plásmido pGemT-54K sin digerir. Calle 2 a 6: Digerido con 1U de *Bam*HI por μ g de DNA plasmídico, incubando durante 10, 20, 30, 45 y 60 minutos, respectivamente. M: marcador de peso molecular (1129, 517, 453, 396, 356 pb). La flecha indica el fragmento conteniendo el ORF 54K completo.

Para constatar que no hubiera rearrreglos o modificaciones en los extremos del fragmento 54K luego del clonado en pMOG180 (E/E) se secuenciaron dichos extremos utilizando *primers* específicos para el ORF 54K.

I. C. 4) Obtención del vector binario p35SGUSINT-54K

El *cassette* de expresión 54K fue liberado del plásmido pMOG180-54K mediante digestión con la enzima *EcoRI* y purificado. Por otro lado, el plásmido p35SGUSINT fue linealizado con *EcoRI* y desfosforilado. Los dos fragmentos obtenidos fueron ligados y clonados en *E. coli DH5 α F'* (ver Esquema 3). Los clones positivos fueron seleccionados por *colony*-PCR utilizando *primers* específicos (54k 9011dir y 54k9011rev). Se constató el clonado y la dirección de inserción mediante digestión enzimática.

El vector binario p35SGUSINT-54K fue introducido en la cepa EHA105 de *A. tumefaciens* mediante electroporación. Las colonias positivas fueron seleccionadas por resistencia a Kn y *colony*-PCR utilizando *primers* específicos (54k9011dir y 54k9011rev).

II. Construcciones para la expresión de proteínas de CPsV en sistemas heterólogos (*Escherichia coli* y células de insecto)

La expresión de proteínas heterólogas en huéspedes bacterianos ha sido ampliamente utilizada y ha permitido la purificación de proteínas de interés utilizando diferentes estrategias. Un sistema de expresión muy usado es aquel que permite generar proteínas recombinantes en *E. coli*, y esta basado en el sistema dirigido por el promotor T7 originalmente desarrollado por Studier y Moffatt, en 1986. El sistema modificado (pET System, Novagen) ha sido utilizado en la presente tesis a fin de expresar las proteínas 24K y 54K de CPsV. Un diagrama detallado de las características del sistema se presenta en el Esquema 4.

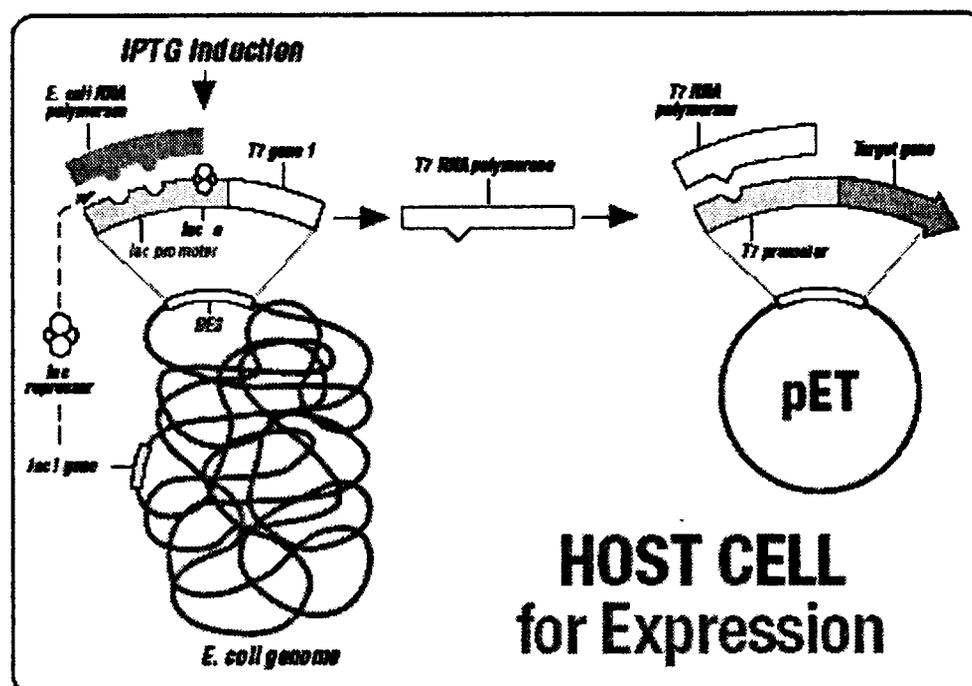
Para la producción de la proteína foránea, el plásmido recombinante portando el gen de interés (pET-ORF-CPsV) es transferido a colonias de *E. coli* conteniendo una copia cromosomal del gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el promotor *lacUV5* inducible por IPTG.

II. A. Plásmidos que contienen el ORF 24K (RNA 1)

II. A. 1) Obtención del plásmido pET22b-24K

A partir de una mini preparación del plásmido pGemT-24K, se realizó digestión doble con las enzimas *NcoI* y *BamHI*. El material digerido se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa y la banda de DNA del tamaño esperado fue recuperada por *gene clean*. En paralelo, DNA del plásmido pET22b (Anexo 1) fue digerido con las mismas enzimas *NcoI* y *BamHI* y el producto de digestión desfosforilado en sus extremos 5'. El fragmento conteniendo el ORF 24K y el plásmido pET22b linealizado, se ligaron y clonaron en *E. coli DH5 α F'*. La selección de clones positivos fue realizada por *colony*-PCR utilizando

primers específicos (24kdir y 24krev). Por último, se constató el clonado y la dirección de inserción mediante digestión enzimática y secuenciación de los extremos de la construcción.



Esquema 4. Características del sistema de expresión bacteriano pET System, Novagen.

El plásmido generado fue introducido en las cepas BL21(DE3) o BL21(DE3)-CodonPlus-RIL de *E. coli* mediante electroporación. Las colonias positivas fueron seleccionadas por resistencia a antibiótico y mediante *colony-PCR* utilizando *primers* específicos (24kdir y 24krev).

II. B. Plásmidos que contienen el ORF 54K (RNA 2)

II. B. 1) Obtención del plásmido pET22b-54K

Aplicando la misma estrategia descrita en el inciso anterior, el clon obtenido en pGemT para el ORF 54K se digirió con *NcoI* y *EcoRI* al igual que el plásmido de expresión pET22b. Los productos obtenidos fueron ligados y, clonados en *E. coli DH5 α F'*. Los clones positivos fueron seleccionados mediante PCR (*primers* A y B específicos del ORF 54K) y digestiones enzimáticas a fin de confirmar el clonado.

La construcción obtenida, pET22b-54K, fue introducida en las cepas BL21(DE3) o BL21(DE3)CodonPlus-RIL de *E. coli* mediante electroporación. Las colonias positivas fueron seleccionadas por resistencia a antibiótico y, utilizando *primers* específicos (54k9011dir y 54k9011rev) mediante *colony-PCR*.

II. B. 2) Obtención del plásmido pET30a-54K

La producción de proteínas de fusión a sido utilizada frecuentemente para la producción y purificación de proteínas heterólogas en *E. coli*. En general, dicha fusión se

realiza a un péptido capaz de interactuar o reaccionar con un ligando unido a la matriz de una columna cromatográfica. Dentro de los sistemas conocidos se pueden citar GST (*glutathion-S-transferase*), MBP (*Maltose binding protein*), His-tag (péptido compuesto de 6 a 8 histidinas), Trx-tag (*Thioredoxin*), etc.

A fin de purificar la proteína mediante cromatografía de afinidad, se realizó el clonado del ORF 54K en el plásmido pET30a (Anexo 2), seleccionando los sitios de restricción adecuados para generar la fusión del amino terminal de la proteína 54K a una secuencia nucleotídica que codifica para seis histidinas (6X His-tag). Para ello, se efectuó digestión del DNA plásmidico pGemT-54K y el plásmido pET30a con las enzimas *NcoI* y *EcoRI*. Los productos obtenidos se ligaron y clonaron en *E. coli DH5 α F'*. Los clones positivos fueron seleccionados por resistencia a antibiótico y mediante *colony-PCR* utilizando los *primers* 54K9011dir y 54K9011rev. La orientación del fragmento clonado fue constatada por digestiones enzimáticas y PCR utilizando el *primer* T7prom, específico para el plásmido pET30a y el *primer* B para el fragmento introducido. Por último, se efectuó la secuenciación de los extremos de la construcción obtenida (utilizando los *primers* T7term y T7prom) confirmando que no se produjeron rearrreglos durante el procedimiento de clonado.

El plásmido obtenido, pET30a-54K, fue introducido, mediante electroporación, en la cepa BL21(DE3)CodonPlus-RIL de *E. coli*. Las colonias positivas fueron seleccionadas por resistencia a antibiótico y mediante *colony-PCR* utilizando los *primers* 54k9011dir y 54k9011rev.

II. C. Plásmidos que contienen el ORF 48K (RNA 3)

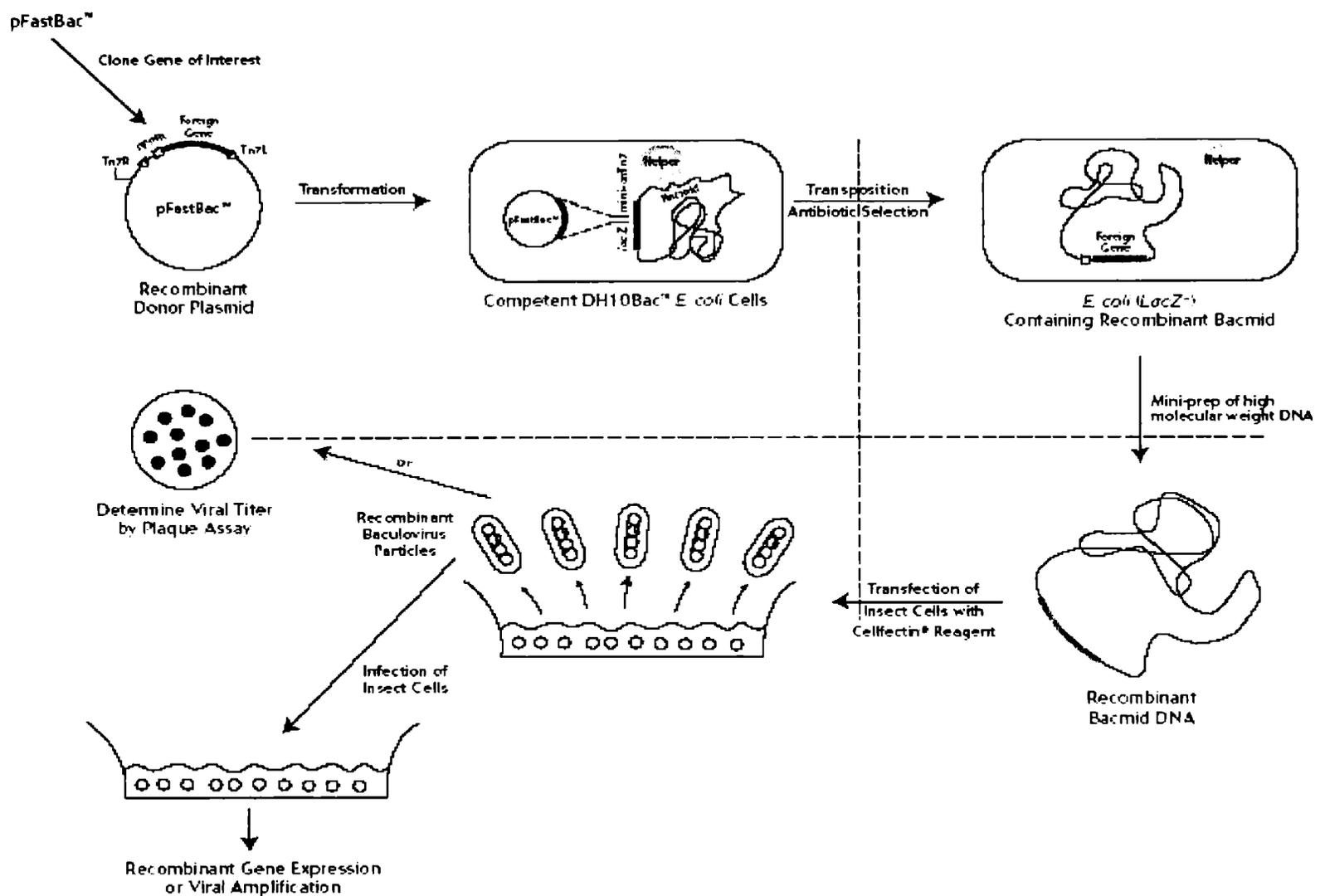
En trabajos previos en el IBBM, Sommer (2000) había clonado en el plásmido pET19b (Anexo 3) el ORF 48K de CPsV generando el plásmido recombinante pET19b-48K. Utilizando esta construcción obtuvo moderada expresión de la proteína de cubierta (48K) en *E. coli* BL21(DE3). Durante el desarrollo de la tesis, usando este plásmido y con el objetivo de producir mayores cantidades de la proteína 48K, ésta fue expresada en la cepa BL21(DE3)CodonPlus-RIL. Los clones positivos fueron seleccionados por resistencia a antibiótico y por *colony-PCR* utilizando *primers* específicos (CPV1 y CPV2).

II. D. Obtención de construcciones en vectores que permitan expresar la proteína 24K mediante el sistema Bac-to-Bac

La expresión de proteínas eucariotas en células bacterianas, a veces, resulta en baja expresión proteica e incluso ausencia de la misma. A menudo, la expresión se ve dificultada porque la proteína heteróloga resulta tóxica para la bacteria. Por otro lado, pueden existir codones en la secuencia nucleotídica sub-representados por los tRNA presentes en la bacteria, provocando la terminación temprana de la traducción. Otras veces, el producto proteico presenta un plegamiento incorrecto, lo que lleva a una degradación prematura o formación de cuerpos de inclusión, etc.

Como alternativa a la expresión en sistemas bacterianos, es usual el uso de sistemas eucarióticos de expresión, entre los que se encuentra el sistema de expresión de

baculovirus Bac-to-Bac™. Para su implementación, se utilizan vectores baculovirus recombinantes capaces de expresar genes heterólogos en cultivos de células de insecto. En el Esquema 5 se detalla la estrategia de clonado y expresión del sistema Bac-to-Bac™. En los siguientes apartados se describen los pasos que se siguieron para obtener el plásmido donador pFastBacHTb-24k, el cual codifica para el ORF 24K de CPsV bajo el control transcripcional del promotor de polyhedrina del virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) y para la obtención del baculovirus recombinante AcNPV-24K.



Esquema 5. Características del sistema de expresión de baculovirus Bac-to-Bac™ System

II. D. 1) *Obtención de pFastBacHtb-24K*

A partir de una mini preparación del plásmido pGemT-24K, se realizó una digestión con las enzimas *NcoI* y *BamHI*. El material digerido se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa y la banda de DNA del tamaño esperado fue recuperada. En paralelo, una mini preparación de DNA del plásmido pFastBacHtb fue sujeta a digestión doble con *NcoI/BamHI*.

Con los productos obtenidos se realizó una reacción de ligación y se clonó en *E. coli DH5αF'*. Las colonias positivas fueron seleccionadas por *colony-PCR* usando los *primers* 24kdir y 24krev y mediante digestión enzimática. El plásmido resultante, pFastBacHtb-24K, produce un marco de lectura abierto de 534 aminoácidos. Los primeros 44 aminoácidos pertenecen al pFastBacHtb y codifican para un polipéptido conteniendo una

secuencia de seis histidinas seguida por una región espaciadora de siete aminoácidos y la secuencia de reconocimiento para el corte por la proteasa rTEV.

II. D. 2) Obtención de AcNPV-24K

Se realizó la transformación química de bacterias competentes DH10Bac de *E. coli*, las cuales contienen un b́acmido parental con una fusión lacZ-miniattTn7, con una aĺcuota de la ligaci3n realizada anteriormente (II. D. 1). Se efectu3 la selecci3n de recombinantes por medio de resistencia a antibi3ticos (Kn, Tc y Gm) adeḿs de utilizar X-gal e IPTG. Las colonias positivas adquieren las resistencias y presentan un fenotipo Lac⁻.

Se confirm3 la presencia del fragmento 24K por *colony-PCR* usando *primers* espećficos (24Kdir y 24Krev) y *primers* flanqueando los sitios de clonado (M13dir y M13rev) (Donahue, 1996).

Se realiz3 la purificaci3n del b́acmido recombinante obtenido (AcNPV-24K) siguiendo las especificaciones del manual de instrucciones Bac-to-Bac (Bac-to-Bac *Baculovirus Expresi3n Systems*). La preparaci3n de DNA fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa confirmando la presencia de DNA de alto peso molecular (Figura 3).

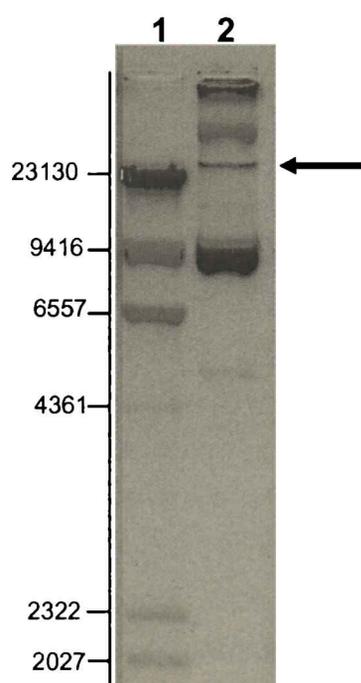


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa 0,5% de la purificaci3n del b́acmido AcNPV-24K. Calle 1: Marcador de peso molecular λ /HindIII, en pb. Calle 2: DNA purificado de *E.coli* DH10Bac transformadas con el plásmido pFastBacHtb-24K. La flecha indica el DNA del b́acmido recombinante AcNPV-24K.

III. Construcciones para la expresi3n de protéinas de CPsV fusionadas a protéinas reporteras para estudios de localizaci3n subcelular.

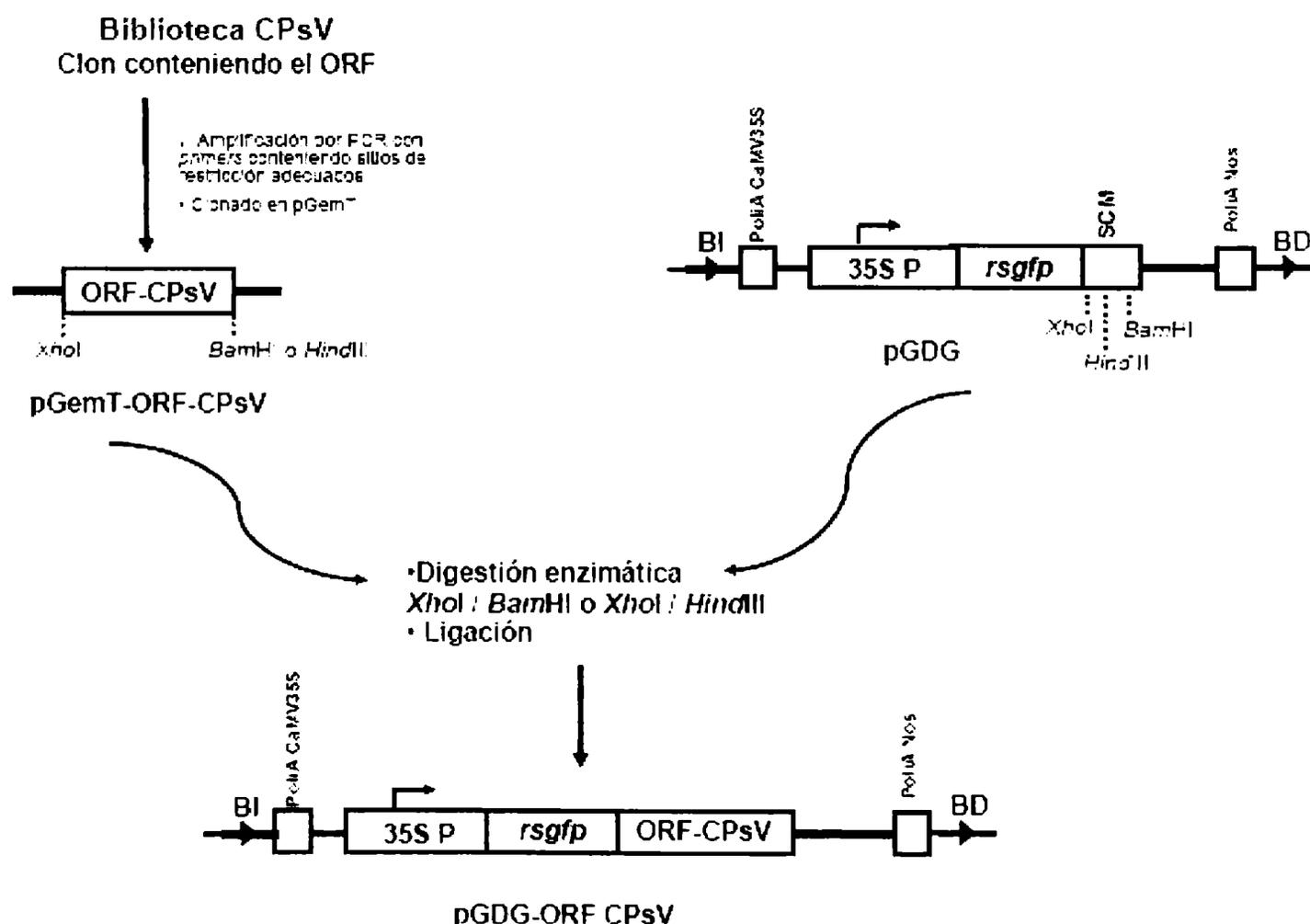
La protéina GFP (*Green Fluorescent Protein*) aislada de la medusa *Aequorea victoria* ha sido utilizada como protéina marcadora en numerosos experimentos en plantas. Dicha protéina emite luz verde cuando se la ilumina con luz ultravioleta, sin necesidad de otras protéinas ni cofactores. Se han desarrollado variantes derivadas de GFP capaces de absorber y emitir a otras longitudes de onda, permitiendo ser utilizadas conjuntamente en experimentos de co-localizaci3n (von Armin *et al.*, 1998, Reis Figueira *et al.* 2002). La utilidad de estas protéinas fluorescentes es variada, usándose como protéinas

marcadoras tanto en la transformación de plantas como en ensayos de expresión transitorios, fusionada a péptidos, a secuencias de direccionamiento, etc., a fin de determinar su re-localización en la célula vegetal e inferir la función de la secuencia fusionada.

Otra proteína fluorescente, DsRed, originalmente aislada del coral *Discosoma sp.* también ha sido usada junto con los mutantes derivados de GFP en diferentes ensayos (Matz *et al.*, 1999) y en experimentos de co-localización de proteínas virales de *Sonchus yellow net virus* (SYNV) (Goodin *et al.*, 2001, 2002).

A fin de determinar la localización sub-celular de las proteínas 24K, 48K y 54K de CPsV en ensayos de expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*, se abordó la obtención de plásmidos binarios conteniendo dichas proteínas fusionadas a proteínas marcadoras (GFP y DsRed). Para ello, se desarrollaron construcciones utilizando los vectores binarios pGD, pGDG y pGDR (Goodin *et al.*, 2002) a las que se introdujeron los ORF 24K, 48K y 54K generando fusiones a *rsgfp* (pGDG), a *dsred2* (pGDR) o con las proteínas virales sin fusionar a la proteína marcadora (pGD). Dichas construcciones, posteriormente, fueron introducidas en *A. tumefaciens* LBA4404 mediante electroporación.

El procedimiento general utilizado para generar la serie pGDG se detalla en el Esquema 6, siendo similar al utilizado para generar la serie pGDR y la serie pGD.

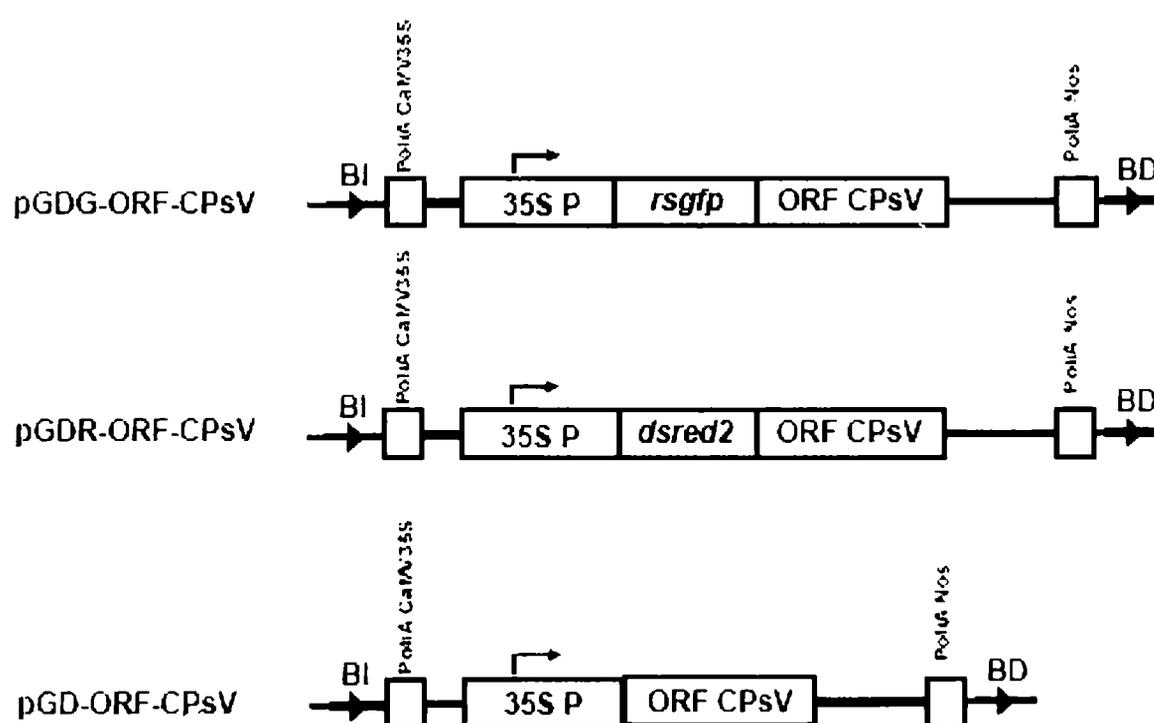


Esquema 6. Estrategia para generar la serie de plásmidos recombinantes pGDG portando los ORFs virales de CPsV

III. A. Obtención de plásmidos binarios conteniendo proteínas virales fusionadas a GFP (pGDG) y DsRed (pGDR)

Se diseñaron *primers* específicos para los genes *24k*, *48k* y *54k* que permitieran amplificar los ORF completos de dichos genes (Ver Materiales y Métodos). Estos *primers* poseen modificaciones en sus extremos a fin de generar sitios de restricción para diferentes enzimas que posibilitan un clonado sencillo en la serie de plásmidos pGDs. Una vez obtenidos, los *primers* fueron utilizados en reacciones de PCR a fin de amplificar los ORF de interés. Posteriormente, los fragmentos de tamaño esperado fueron purificados y ligados al plásmido pGemT. Los clones positivos fueron seleccionados por color (X-gal e IPTG) y resistencia a ampicilina. Posteriormente, mediante *colony*-PCR usando *primers* específicos para el plásmido pGemT (SP6 y T7prom), se constató la presencia del ORF.

A partir del DNA plasmídico de los clones obtenidos se realizaron dobles digestiones enzimáticas con las enzimas adecuadas (*Xho*I / *Bam*HI para los clones 24K y 54K, *Xho*I / *Hind*III para el clon 48K) con el objetivo de liberar el ORF de cada gen. En el caso del ORF 54K, se realizó primero digestión total con *Xho*I y luego, digestión parcial con *Bam*HI debido a que en el ORF 54K existe un sitio de corte para dicha enzima. Por otro lado, los plásmidos pGD, pGDG y pGDR fueron digeridos con los mismos pares de enzimas y posteriormente se ligaron los fragmentos a los plásmidos linealizados. Se clonaron las 9 ligaciones en *E. coli DH5 α F'*. Los clones positivos fueron seleccionados por resistencia a antibiótico y mediante *colony*-PCR utilizando *primers* específicos para cada ORF clonado (24kdir y 24krev para el ORF 24K; CPV1 y CPV2 para el ORF 48K; A y B para el ORF 54K). Los clones positivos fueron sujetos a digestiones enzimáticas a fin de constatar el



Esquema 7. T-DNA de los plásmidos recombinantes conteniendo los ORFs de CPsV generados a partir de la serie pGD, pGDG y pGDR.

clonado del fragmento introducido. Posteriormente, se realizó la secuenciación de los extremos de las construcciones obtenidas confirmando que no se produjeron rearrreglos durante el procedimiento de clonado. Los plásmidos así generados fueron: pGD-24K, pGD-48K, pGD-54K, pGDG-24K, pGDG-48K, pGDG-54, pGDR-24k, pGDR-48K y pGDR-54K (Esquema 7). Dichas construcciones se introdujeron en *A. tumefaciens* (LBA4404) mediante electroporación, confirmándose la presencia del plásmido, por resistencia a antibiótico y mediante *colony*-PCR utilizando *primers* adecuados para cada plásmido.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron los plásmidos recombinantes que permiten movilizar los transgenes a la planta (pBIN19sgfp-24K, p35SGUSINT-48K, pBIN19sgfp-48K y p35SGUSINT-54K) para su utilización en la generación de plantas de naranjo dulce transgénicas. El plásmido pMOG180 (E/H) fue modificado obteniéndose el pMOG180 (E/E), cuyo uso facilita la estrategia de clonado del *cassette* de expresión en los plásmidos binarios utilizados.

Se obtuvieron vectores capaces de expresar las proteínas 24K y 54K en *Escherichia coli* (plásmidos pET22b-24K, pET22b-54K y pET30a-54K).

Se obtuvo el plásmido *pFastBacHtb-24K* y el baculovirus recombinante *AcNPV-24K*, el cual permite expresar la proteína 24K en células de insecto.

Se generaron 9 plásmidos binarios conteniendo las proteínas virales 24K, 48K y 54K fusionadas a GFP (pGDG-24K, pGDG-48K, pGDG-54K), fusionadas a DsRed (pGDR-24K, pGDR-48K, pGDR-54K) y sin fusionar (pGD-24K, pGD-48K, pGD-54K) para su utilización en ensayos de expresión transitoria mediante agroinfiltración.

CAPÍTULO 2. Desarrollo de herramientas y metodologías para la detección de las proteínas 24K, 48K y 54K de CPsV

- I. Producción de las proteínas heterólogas 24K, 48K y 54K en *Escherichia coli* y células de insecto.
- II. Obtención de antisueros 24K, 48K y 54K y su titulación mediante inmunoensayos.
- III. Desarrollo de un método de detección para las proteínas 24K y 54K aplicando la técnica de ELISA competitivo secuencial.
- IV. Modificación del método TAS-ELISA (HRP) para la detección de la proteína de cubierta viral (48K).

INTRODUCCIÓN

Los métodos serológicos han sido ampliamente utilizados para el análisis, la detección y el diagnóstico de virus de plantas (Matthews, 1991). La producción de antisueros contra virus enteros o proteínas virales en diferentes animales es una metodología habitualmente utilizada para su posterior aplicación en ensayos inmunológicos. El uso de conejos posee ventajas dado que responden bien a los antígenos de planta, son fáciles de manipular y se obtienen volúmenes convenientes de suero. Aunque los ratones producen menos cantidad de suero, muchas veces son elegidos como sistema de experimentación, ya que su uso otorga ventajas cuando se dispone de limitadas cantidades de antígeno viral (Dunbar y Schwoebel, 1990). Además, pueden ser utilizados en la producción de anticuerpos monoclonales (MAb, por *Monoclonal antibody*).

Una variada cantidad de procedimientos utilizando anticuerpos han sido desarrollados para la detección de virus, discriminación entre aislamientos, medida cuantitativa de antígenos virales, etc.; desde métodos de precipitación, radioinmuno ensayos hasta, los mas ampliamente usados, ensayos de ELISA (por *enzyme-linked immunosorbent assay*), dot-ELISA e ISEM (por *immunosorbent electron microscopy*) (Matthews, 1991). Además de su uso en la detección viral, los anticuerpos pueden ser aplicados, mediante microscopía electrónica, al análisis de la presencia de las proteínas virales como parte componente de la partícula viral o para determinar la localización subcelular de la proteína en cortes histoquímicos de células infectadas; etc. También, los antisueros, resultan herramientas útiles para el análisis de la expresión del antígeno durante el tiempo de desarrollo de la infección en tejidos del huésped y, suelen ser utilizados en ensayos de *western blot* y/o ELISA, para confirmar la presencia de las proteínas virales expresadas en plantas transgénicas.

En el presente Capítulo se detallan los resultados logrados en la obtención de las proteínas 24K, 48K y 54K de CPsV utilizando diferentes sistemas de expresión (*E. coli* y células de insecto); la generación de sueros policlonales contra dichas proteínas en conejos y ratones; su utilización en ensayos inmunológicos y el desarrollo y optimización de ELISAs en búsqueda de herramientas moleculares adecuadas para la detección de dichas proteínas en plantas infectadas con CPsV, en expresiones transitorias en plantas herbáceas y en cítricos transgénicos.

I. Producción de las proteínas heterólogas 24K, 48K y 54K en *E. coli* y células de insecto.

Dentro de los sistemas de expresión para la producción de proteínas recombinantes, se pueden enumerar: las bacterias, las levaduras, los baculovirus recombinantes (sistemas virales para la expresión de proteínas en células de insecto) o la expresión en células de mamífero, entre otros. La elección del sistema de expresión depende principalmente de la aplicación que posteriormente tendrá la proteína purificada.

Las bacterias han sido ampliamente utilizadas como recipientes para la producción de proteínas heterólogas y suelen ser los sistemas de elección cuando se requiere alta concentración de una proteína recombinante. El uso de sistemas de expresión en *E. coli*

suelen ser versátiles y sencillos de manipular. Desde el desarrollo del sistema de expresión basado en la utilización de la RNA polimerasa del bacteriófago T7 en 1986 por Studier y Moffatt, el sistema pET (por *plasmid for Expression by T7 RNA polymerase*), ha sufrido innumerables mejoras que posibilitan la expresión de la proteína de interés en grandes cantidades, llegando a representar más del 30% de las proteínas totales de la bacteria. Existen más de 40 plásmidos desarrollados para facilitar el clonado del ORF deseado, optimizando la cantidad y la purificación de la proteína recombinante obtenida (Sorensen y Mortensen, 2005).

El uso de células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes puede resultar un sistema complejo y costoso respecto a los sistemas de expresión bacterianos, pero es la elección cuando la proteína a expresar requiere de modificaciones post-traduccionales para que sea funcional. En la mayoría de los casos, las proteínas recombinantes, expresadas en el cultivo celular, son procesadas, modificadas y dirigidas adecuadamente hacia su localización intracelular, siendo funcionalmente similares a las proteínas silvestres (Possee *et al.* 1997, Ailor *et al.*, 1999, Kim *et al.*, 2003). Estos sistemas de expresión se basan en la generación de baculovirus recombinantes en los cuales los genes virales, activos durante las últimas fases de la infección, pero no esenciales para la replicación en el cultivo celular, son reemplazados por las secuencias de DNA de interés. También, como en el caso de los sistemas de expresión bacterianos, han sido modificados considerablemente desde su desarrollo, existiendo diferentes estrategias para el clonado del gen a expresar y para la obtención de los baculovirus recombinantes. En particular, se ha desarrollado el sistema Bac-to-Bac[®], basado en la transposición sitio específica del *cassette* de expresión en un *bácmido* vector, pudiendo, este último, ser manipulado en un sistema bacteriano durante las etapas de clonado (Ciccarone *et al.*, 1997; Luckow *et al.*, 1993).

En los siguientes apartados se detallan los resultados obtenidos en la aplicación de estos sistemas para la expresión de las proteínas 24K, 48K y 54K de CPsV, a fin de utilizarlas como antígenos para la obtención de anticuerpos específicos en ratones y conejos.

I. A. Obtención de la proteína 24K

I. A.1) Análisis de expresión de la proteína 24K en células de E. coli

Una vez obtenido el clon de *E. coli* BL21 que porta el plásmido pET22b-24K (ver inciso II. A. 1, Capítulo 1) se analizó la expresión de la proteína 24K en cultivos de la cepa transformada crecidos en presencia de IPTG, molécula inductora del sistema de expresión pET (ver esquema 1, Capítulo 1).

Inicialmente se realizó la incubación del cultivo a 37° C utilizando una concentración 1 mM final de IPTG. En la Figura 1 se muestra el análisis del extracto proteico del cultivo a distintos tiempos (3 y 5 horas) post-inducción obtenido por lisis de las bacterias y mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE). No se observaron diferencias en el patrón proteico respecto al obtenido para el cultivo de las bacterias sin inducir aún en incubaciones de 24hs (datos no mostrados).

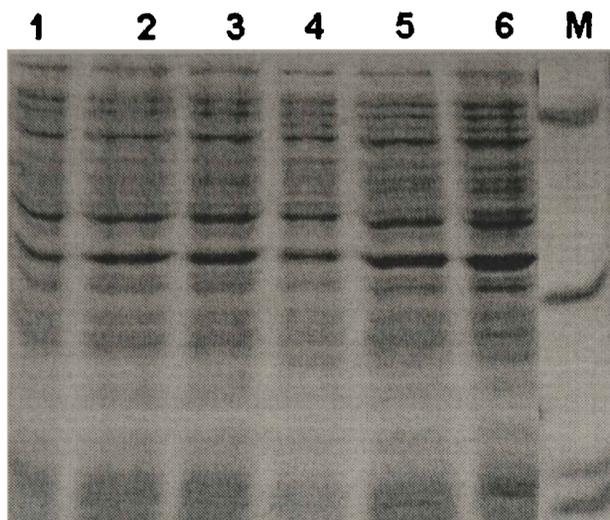


Figura 1. Análisis del extracto proteico del clon pET22b-24K BL21(DE3) y del control BL21(DE3) mediante SDS-PAGE. Calles 1 a 3: BL21(DE3) sin inducir, 3 y 5 horas luego del agregado de IPTG 1mM, respectivamente. Calles 4 a 6: pET22b-24K BL21(DE3) sin inducir, 3 y 5 horas luego del agregado de IPTG 1mM, respectivamente. M: Marcador de peso molecular (66, 45, 14, 12 kDa)

Una de las causas para la ausencia de expresión de la proteína 24K en *E. coli* utilizando el sistema pET podría deberse a modificaciones nucleotídicas en el ORF que llevaran a la aparición de codones *stop*, con la consiguiente terminación temprana de la traducción. Sin embargo, el análisis de la secuencia nucleotídica del pET22b-24K obtenida se corresponde con la esperada para el ORF 24K y solo se produjeron dos cambios a nivel nucleotídico que generaron mutaciones silenciosas, descartando dicha hipótesis.

A menudo, en estos sistemas de expresión bacterianos, el bajo o nulo nivel de expresión de las proteínas recombinantes puede atribuirse a la formación de estructura secundaria del transcripto producido durante la inducción que puede afectar la iniciación de la traducción (AUG) y/o interferir con el sitio de unión al ribosoma (Looman *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 1987). Análisis de la estructura secundaria más probable generada por medio del programa MFold (a 37°C) no reveló cambios en la estructura secundaria de la región del sitio de unión al ribosoma que pudiera sugerir la formación de estructura por la interacción de la secuencia inserto con dicho sitio.

También el uso de codones en el gen puede ser una de las causas para el bajo nivel de expresión de proteínas heterólogas en sistemas bacterianos (Sorensen *et al.*, 1989, Sorensen y Mortensen, 2005). Se ha reportado que la presencia de codones poco representados en *E. coli* en construcciones recombinantes puede alterar la expresión de dichas proteínas e influir en su nivel de expresión (Fuglsang *et al.*, 2003; Gustafsson *et al.*, 2004, Olivares-Trejo *et al.*, 2003). La baja o inexistente síntesis proteica, terminación temprana e incorporación errónea de aminoácidos en la proteína heteróloga son síntomas comunes de preferencia codónica (*codon bias*). Las frecuencias de más de 15 codones raros por cada 1000 codones son consideradas posibles preferencias codónicas, cuya presencia puede resultar problemática para la expresión en altos niveles de la proteína recombinante en *E. coli* (Novy *et. al.*, 2001).

Cuando se comparan las fracciones para los codones Leucina (Leu), Arginina (Arg) e Isoleucina (Ile) utilizadas por CPsV y *E. coli* (Tabla 1A), se observan diferencias importantes respecto a los codones más utilizados para estos dos organismos. Por ejemplo, para el codón AGA, en *E. coli*, su aparición en las secuencias analizadas respecto a los otros codones que codifican para Arg es de 8%; sin embargo, en CPsV este codón es muy frecuente, presentando un 57% de aparición respecto a los restantes codones. Lo mismo sucede para AUA (Ile) con un 58% para CPsV respecto a un 14%

para *E. coli*. Para el aminoácido Leucina, el codón más representado en la secuencia del virus es el UUA (30%) siendo este codón el segundo en proporción presente en *E. coli* (CUG 45%, UUA 15%).

Para confirmar que la baja expresión de la proteína 24K podría deberse al uso de codones poco frecuentes en *E. coli* se analizó y comparó el porcentaje de codones de la secuencia del gen 24k respecto al reportado para *E. coli* (Tabla 1B) mostrando que existe preferencia codónica para los aminoácidos Arg, Iso y Leu. En particular, existe muy alta frecuencia de aparición del codón AUA para Isoleucina, utilizando 82 codones por cada 1000 codones respecto a los 4 a 5 codones que utiliza *E. coli* por cada 1000 codones presentes en su genoma.

TABLA 1. Uso de codones de *E.coli* y CPsV

A	AGG / AGA / CGU CGC / CGA / CGG*	AUA / AUU / AUC	CUA / CUG / UUA UUG / CUU / CUC
	Arg (R)	Ile (I)	Leu (L)
CPsV	0.35 / 0.57 / 0.02 0.02 / 0.03 / 0.01	0.58 / 0.26 / 0.17	0.12 / 0.15 / 0.30 0.27 / 0.09 / 0.06
<i>E.coli</i>	0.05 / 0.08 / 0.34 0.33 / 0.07 / 0.12	0.14 / 0.49 / 0.37	0.05 / 0.45 / 0.15 0.13 / 0.13 / 0.10

*fracción respecto del total de codones que codifican para dicho aminoácido

B	AGG/AGA*	AUA	CUA
	Arg (R)	Ile (I)	Leu (L)
24K	29	82.1	19.3
48K	29.6	25	9.1
54K	54.6	23.1	6.3
CPsV	40.7	54.9	11.3
<i>E.coli</i>	3.4	4.4	3.9

* Frecuencia de uso del codón por cada 1000 codones. En negrita se señalan las frecuencias mayores a 15 codones raros /1000 codones

Los valores de la tabla fueron obtenidos de <http://www.kazusa.or.jp/codon/>

Como se comentó anteriormente, el análisis del patrón de expresión proteico del plásmido pET22b-24K en la cepa BL21 de *E. coli* inducida no presentó diferencias con la cepa sin inducir. Si la ausencia de expresión fuera consecuencia del uso de codones de

CPsV respecto del usado por *E. coli*, la utilización de una cepa bacteriana capaz de sobre-expresar tRNA frecuentes en eucariotas y rara vez usados en *E. coli* podría permitir la expresión de la proteína 24K. Por ello, se planteó el uso de la cepa BL21 (DE3)-CodonPlus-RIL (Carstens y Waesche, 1999) para la expresión del plásmido pET22b-24K. Dicha cepa contiene copias extras de los genes *argU*, *ileY* y *leuW* para los tRNA que reconocen los codones AGA/AGG (arginina), AUA (isoleucina), y CUA (leucina), respectivamente. Su utilización para la expresión de proteínas heterólogas en *E. coli*, en muchos casos, ha sido utilizada con éxito, permitiendo aumentar el nivel de expresión de la proteína (Kleber-Janke y Becker, 2000, Yan *et al.* 2004, Maliandi *et al.* 2006)

Cuando se realizaron las inducciones de la cepa BL21(DE3)-CodonPlus-RIL conteniendo el plásmido recombinante no se observó expresión de la proteína 24K (Figura 2). Durante la inducción de la cepa BL21(DE3)-CodonPlus-RIL se sobre-expresa la proteína cloramfenicol acetil transferasa (25,6 KDa) debido a la presencia de los plásmidos que codifican para las copias extras de genes *argU*, *ileY* y *leuW*. Esta proteína posee un peso molecular muy similar al esperado para la proteína 24K clonada en el pET22b dado que el ORF del gen 24k fue clonado en marco con la secuencia *pelb*, que codifica un péptido señal para direccionamiento al espacio periplásmico. La proteína de fusión resultante posee un tamaño de aproximadamente 25KDa.

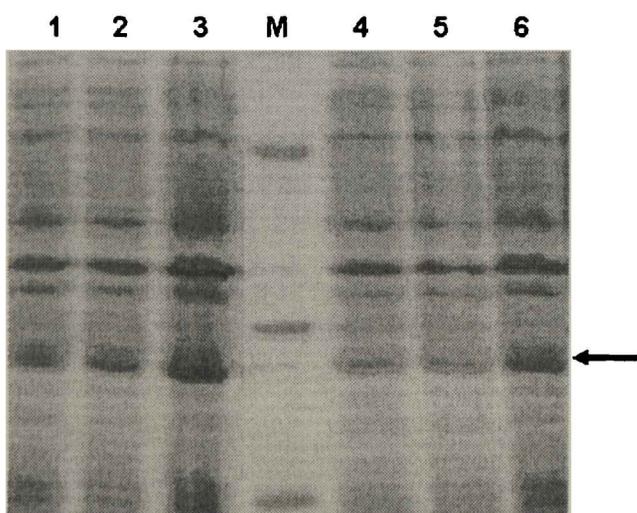


Figura 2. Análisis del extracto proteico del clon pET22b-24K BL21(DE3)-CodonPlus-RIL y del control BL21(DE3)-CodonPlus-RIL mediante SDS-PAGE. Calles 1 a 3: BL21(DE3) sin inducir, 3 y 5 horas luego del agregado de IPTG 1mM, respectivamente. Calles 4 a 6: pET22b-24K BL21(DE3) sin inducir, 3 y 5 horas luego del agregado de IPTG 1mM, respectivamente. M: Marcador de peso molecular (66, 45, 14kDa). La flecha indica la presencia de la proteína Cloramfenicol acetil transferasa.

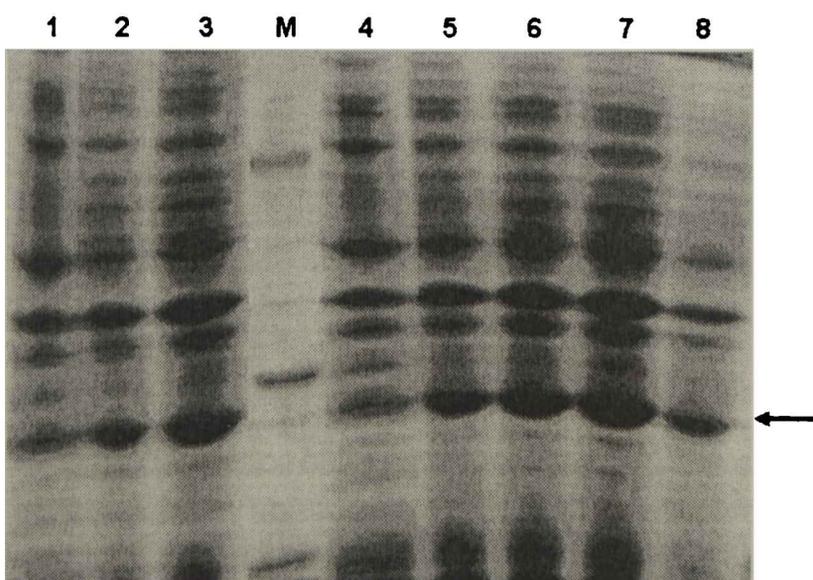


Figura 3. Análisis del extracto proteico del clon pET22b-24K BL21(DE3)-CodonPlus-RIL y del control BL21(DE3)-CodonPlus-RIL mediante SDS-PAGE. Calles 1 a 3: BL21(DE3)-CodonPlus-RIL sin inducir, 5 y 7 horas luego del agregado de IPTG 1mM, respectivamente. Calles 4 a 8: pET22b-24K BL21(DE3) CodonPlus-RIL sin inducir, 5, 6, 7 y 24 horas luego del agregado de IPTG 1mM, respectivamente. M: Marcador de peso molecular (66, 45, 14kDa). La flecha indica la presencia de la proteína Cloramfenicol acetil transferasa.

Comparando inducciones a diferentes tiempos de cultivos bacterianos de BL21(DE3)CodonPlus-RIL con y sin el plásmido de expresión, los patrones proteicos resultan muy similares, con aparición de la banda proteica de 25kDa al mismo tiempo en los dos cultivos (a partir de las 5 hs de inducción) (Figura 2 y 3). Este resultado parece indicar que la proteína 24K probablemente no se expresa en este sistema, y que otra causa, diferente a las enunciadas previamente, podría impedir la expresión de dicha proteína en *E. coli*, como la inestabilidad de la proteína o del RNA mensajero sintetizado. Por lo tanto, se recurrió a otro sistema de expresión (Bac-to-Bac) para lograr la producción de la proteína recombinante como se detalla en el siguiente inciso. Posteriormente, cuando se analizaron los extractos proteicos de dichas inducciones mediante *western blot* usando el anticuerpo policlonal anti-24K desarrollado (ver mas adelante, inciso II. B.) se pudo constatar que la proteína 24K si se expresa en este sistema cuando se utiliza la cepa BL21(DE3)-CodonPlus-RIL como se muestra en la Figura 4. Aunque esas preparaciones no fueron utilizadas para la obtención de antisueros, siendo este un sistema de expresión simple, puede ser aplicado en el futuro con otros fines.

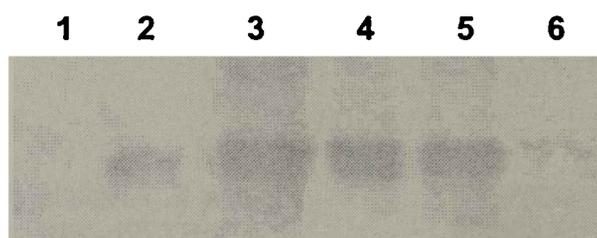


Figura 4. Análisis del extracto proteico del clon pET22b-24K BL21(DE3)-CodonPlus-RIL y del control BL21(DE3)-CodonPlus-RIL mediante SDS-PAGE. Calle 1: extracto de células Hi5. Calle 2: extracto de células Hi5 infectadas con *AcNPV-24K*. Calles 3 a 5: pET22b-24K BL21(DE3)-CodonPlus-RIL 3, 5 y 24 horas luego del agregado de IPTG 1mM, respectivamente. Calle 6: pET22b-24K BL21(DE3)-CodonPlus-RIL sin inducir.

I. A. 2) Obtención de la proteína 24K mediante su expresión en células de insecto utilizando el sistema Bac-to-Bac

Debido a las dificultades para expresar e identificar la proteína 24K en *E. coli*, se decidió expresar esta proteína en un sistema eucariota, por lo cual se eligió el sistema de expresión de baculovirus Bac-to-Bac®. Mediante esta metodología se utilizan como vectores baculovirus recombinantes capaces de expresar genes heterólogos en cultivos de células de insecto. Para esto, el ORF 24K fue clonado en el sitio de clonado múltiple del plásmido donador pFastBacHTb, bajo el control transcripcional del promotor de poliédrica del virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (*AcNPV*). Las características del sistema Bac-to-Bac, así como un esquema del mismo se describen en el Capítulo 1 (Esquema 5).

En los siguientes apartados se detalla el procedimiento para la obtención de la proteína 24K, a partir del bácmido recombinante *AcNPV-24K*, expresada en células de insecto. La construcción fue diseñada para lograr la fusión de la proteína 24K a una secuencia que codifica 6 histidinas, lo cual facilitaría su posterior purificación por medio de una columna de afinidad.

I. A. 2) 1. Transfección de AcNPV-24K en cultivo de células de insecto

Se realizó la purificación del báculo recombinante obtenido AcNPV-24K (ver inciso II. D. 2 del Capítulo 1). Usando una alícuota del DNA del báculo se realizó la transfección de células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) utilizando CellFECTIN (Ver Materiales y Métodos). A las 48 horas se colectó el sobrenadante de las células infectadas y se realizó la re-infección en monocapa de células Sf9 a fin de aumentar el título viral recolectándose el sobrenadante obtenido a las 48, 72 y 96 horas post-infección (*stocks* virales).

I. A. 2) 2. Optimización de las condiciones de infección de las células de insecto

Dado que las condiciones óptimas de infección para las células de insecto pueden variar para cada proteína a expresar, es conveniente realizar algunos experimentos previos a fin de optimizar dichas condiciones, como la cantidad de partículas de baculovirus recombinantes a utilizar y el tiempo de infección de las células de insecto. Por lo tanto, primero se determinó la multiplicidad de infección (MOI por *Multiplicity Of Infection*) de los *stocks* virales obtenidos (Ver Materiales y Métodos). Para ello, se realizó un ensayo de plaqueo viral (*Viral Plaque Assay*). Una vez determinada la MOI, se realizó re-infección de células Sf9 usando una MOI 0,05 del stock seleccionado (48 horas post-infección), a fin de amplificar el mismo (ver Materiales y Métodos). Se colectó el sobrenadante de infección a las 72 horas, y éste fue utilizado para expresar la proteína recombinante realizando infecciones de dos tipos de células (Sf9 y *High five*, Hi5 (*Trichoplusia ni*)) y a diferentes MOI (0.5, 2 y 5). Las células infectadas se colectaron a 24, 48 y 72 horas post-infección. En la Figura 5 se muestra el SDS-PAGE realizado utilizando el material obtenido a fin de determinar la presencia de la proteína heteróloga, presentando un máximo de expresión de la proteína 24K fusionada a His-tag para la infección de células Hi5 utilizando una MOI 2 (72 horas) o MOI 5 (48 horas).

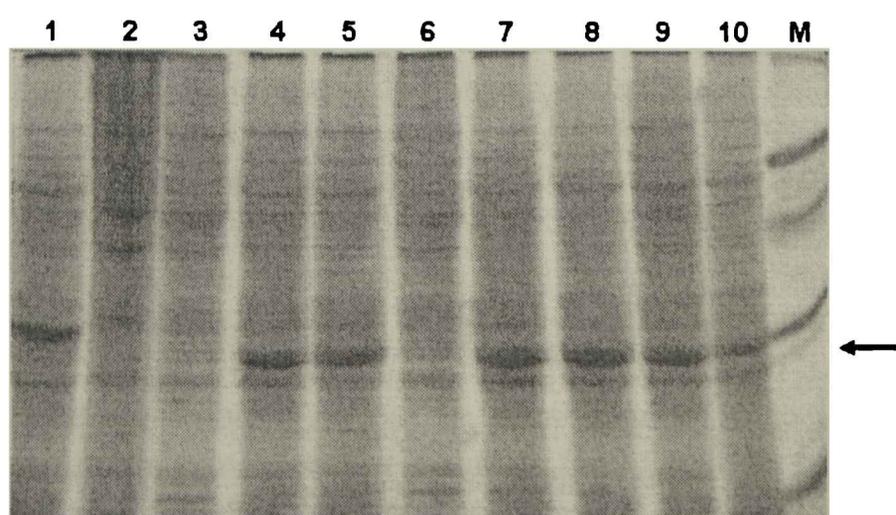


Figura 5. Análisis del extracto proteico de células de insecto Hi5 con el báculo AcNPV-24K mediante SDS-PAGE. Calle 1: báculo salvaje expresando la proteína poliedrina (29kDa). Calle 2: células sin infectar. Calles 3 a 5: células infectadas utilizando una MOI 0,5 colectadas a las 24, 48 y 72 horas post-infección, respectivamente. Calles 6 a 8: células infectadas utilizando MOI 2 colectadas a las 24, 48 y 72 horas post-infección, respectivamente. Calles 9 y 10: células infectadas utilizando MOI 5 colectadas a las 48 y 72 horas post-infección, respectivamente. M: Marcador de peso molecular (66, 45, 29, 14 kDa). La flecha indica la proteína 24K.

Las posteriores infecciones se realizaron utilizando células Hi5 (MOI 2, 72 horas post inoculación) con el objetivo de obtener cantidad de proteína 24K para su purificación mediante columna de afinidad. Las células fueron resuspendidas en *buffer* de lisis con y sin el agregado de Urea 6M a fin de comparar la purificación de la proteína en condiciones desnaturizantes o nativas, respectivamente. Luego se incubó resina Ni-NTA con la muestra procesada en *buffer* de lisis, se realizó el lavado de la columna y el eluido como se detalla en Materiales y Métodos. El análisis por SDS-PAGE de las alícuotas recolectadas mostró que en ninguna de las condiciones utilizadas se logró purificar la proteína de fusión. Por lo tanto, se procedió a la purificación de la proteína 24K en condiciones de desnaturización más estrictas, utilizando cloruro de guanidinio 6M en el *buffer* de lisis. Como se muestra en la Figura 6 esta condición resultó suficiente para la solubilización y purificación de dicha proteína. Posteriormente se eliminó el cloruro de guanidinio mediante diálisis exhaustiva de la muestra obtenida en *buffer* PBS (ver Materiales y Métodos). Para eliminar agregados proteicos no disueltos se centrifugó a baja velocidad y se cuantificó por medida de absorbancia a 280 nm. En general, se han logrado purificar hasta 10 ng de proteína 24K por cada 10^5 células infectadas.

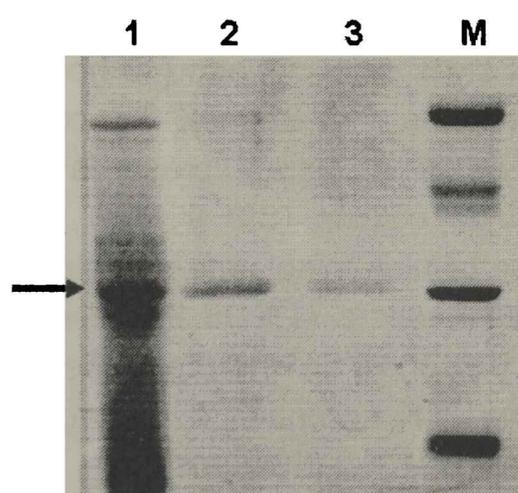


Figura 6. Análisis mediante SDS-PAGE del contenido proteico de la purificación de la proteína 24K usando una columna de afinidad en condiciones desnaturizantes. Calle 1: células Hi5 infectadas con el báculo *AcNPV-24K* utilizando una MOI 2, 72 horas post-infección. Calles 2 y 3: primer y segundo eluido de la columna de afinidad. M: Marcador de peso molecular (66, 45, 29 y 14 kDa). La flecha indica la proteína 24K.

I. B. Obtención de la proteína 54K

I. B. 1) *Expresión y purificación de la proteína 54K utilizando el plásmido pET22b-54K*

El plásmido de expresión pET22b-54K fue introducido por transformación química en la cepa BL21(DE3) de *E. coli* a fin de expresar la proteína 54K (ver inciso II.B. 1, Capítulo 1). Una vez obtenida la cepa recombinante, se realizó la inducción del cultivo utilizando una concentración 1 mM de IPTG final. Cuando se analizaron las muestras de extracto proteico mediante SDS-PAGE no se obtuvieron niveles detectables de expresión de la proteína 54K.

La secuencia del plásmido recombinante no presenta modificaciones nucleotídicas en el marco de lectura que pudieran ser causa de la falta de expresión de la proteína 54K. Como se discutió anteriormente, al utilizar un sistema heterólogo, esta falta de expresión podía deberse al uso de codones utilizados por *E. coli*, el cual difiere del que presenta el genoma de CPsV. Como se muestra en la tabla 1B, existe una alta frecuencia de aparición de codones para los aminoácidos Ile y Arg en el gen 54k, comparada con la

encontrada para *E. coli*. En particular, posee una muy alta frecuencia de aparición de codones AGG y AGA para arginina cuando se compara con la frecuencia encontrada en los genes de *E. coli*. Estos últimos utilizan solamente 3 a 4 codones AGG/AGA por cada 1000 codones mientras que el gen 54k contiene entre 54 a 55 codones AGG/AGA por cada 1000. Esto podría justificar la baja de expresión de la proteína 54K cuando se utiliza este microorganismo como sistema de expresión. Por tanto, se decidió utilizar la cepa bacteriana BL21(DE3)-CodonPlus-RIL. La inducción del cultivo bacteriano obtenido utilizando una concentración 1 mM de IPTG final resultó en alta expresión de un polipéptido del tamaño esperado como se muestra en la Figura 7.

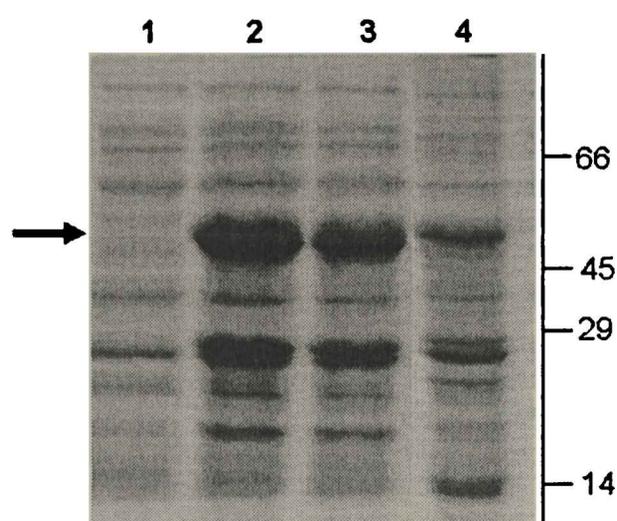


Figura 7. Análisis del extracto proteico del clon pET22b-54K BL21(DE3)-Codon Plus-RIL mediante SDS-PAGE. Calles 1 a 4: muestras sin inducir, 3, 5 y 24 horas luego del agregado de IPTG 1mM, respectivamente. Las bandas de los marcadores de peso molecular se indican en la figura en kDa. La flecha indica la proteína 54K.

La estrategia de clonado utilizada para obtener el plásmido pET22-54K, permitió generar una proteína 54K fusionada a la señal de localización periplásmica pelb. En búsqueda de mayor rendimiento de la proteína 54K expresada en *E. coli*, se analizó el cultivo incubado bajo inducciones prolongadas (ON) y diferentes temperaturas (28°C y 37°C) ya que estas condiciones favorecen la exportación de la proteína de fusión al medio de cultivo, aumentando la proporción de proteína soluble (Schein *et al.*, 1988). Se realizó la separación de la fracción periplásmica (P) y la fracción insoluble (I) de los diferentes cultivos. No se encontraron diferencias en la incubación a las dos temperaturas (datos no mostrados), manteniéndose, la mayoría de la proteína, en la fracción correspondiente al precipitado (Figura 8). La proteína 54K queda retenida en la fracción insoluble debido, posiblemente, a que la gran cantidad de proteína obtenida en las inducciones de los cultivos forma cuerpos de inclusión (CI), los cuales son insolubles en las condiciones de purificación utilizadas. Los CI presentan algunas ventajas ya que son fáciles de aislar por medio de centrifugación, dan un rendimiento alto y relativamente puro de la proteína requerida y, muchas veces, la formación de estas estructuras protege a la proteína de un ataque proteolítico. Una vez aislados pueden ser disgregados por medio de algún agente caotrópico. Considerando todo esto, se abordó la purificación de la proteína 54K a partir de dichas estructuras (Ver Materiales y Métodos).

Los resultados de la purificación de la fracción soluble y los CI se muestran en la Figura 9. La proteína 54K queda retenida en los CI, mientras que parte de las proteínas bacterianas son eliminadas en la fracción soluble.

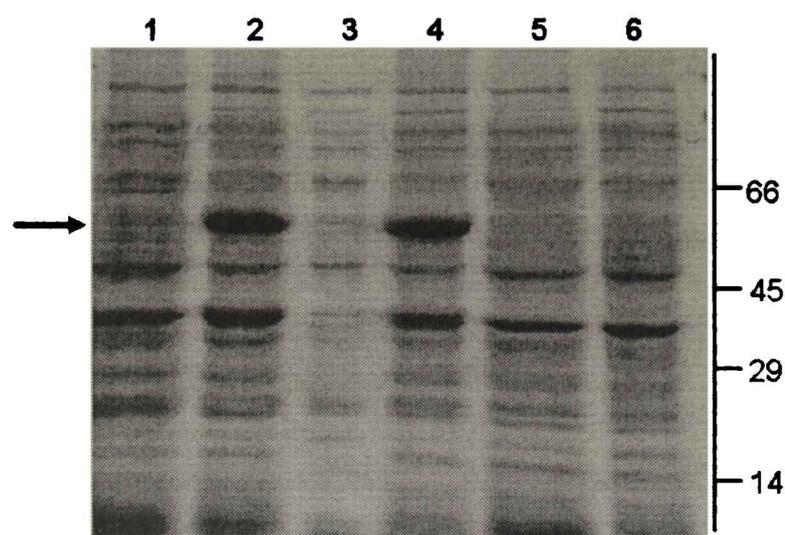


Figura 8. Análisis del extracto proteico del clon pET22b-54K BL21(DE3)-CodonPlus-RIL y pET22b-54K BL21(DE3) mediante SDS-PAGE. Calles 1 a 4: clon pET22b-54K BL21(DE3) sin inducir, inducido por 3 horas, fracción periplásmica y fracción precipitada, respectivamente. Calles 5 y 6: muestras del clon pET22b-54K BL21(DE3) sin inducir e inducido 3 horas después del agregado de IPTG 1mM, respectivamente. Las bandas de los marcadores de peso molecular se indican en la figura en kDa. La flecha indica la proteína 54K.

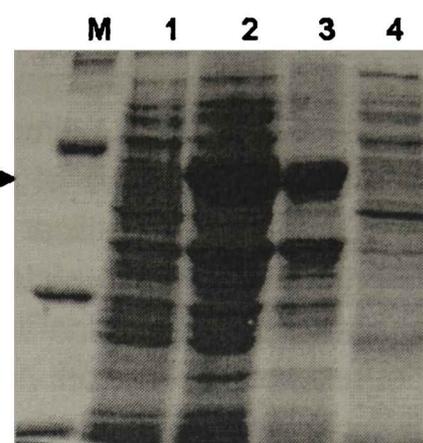


Figura 9. Análisis mediante SDS-PAGE del extracto proteico de Cuerpos de Inclusión (CI) del clon pET22b-54K BL21(DE3)-CodonPlus-RIL. Calle 1: clon sin inducir. Calle 2: clon inducido. Calle 3: CI. Calle 4: sobrenadante de los CI. M: Marcador de peso molecular (66, 45, 14 kDa). La flecha indica la proteína 54K.

I. B. 2) *Purificación de 54K a partir de su expresión utilizando el plásmido pET30a-54K*

En general, cuando se purifican CI, existe contaminación con proteínas bacterianas en mayor o menor grado. A fin de obtener la proteína 54K con un grado de pureza aún mayor que el obtenido de la purificación de CI se abordó la construcción del plásmido pET30a-54K (ver inciso II. B. 2 del Capítulo 1) que se expresó en BL21(DE3)-CodonPlus-RIL. De esta manera se genera un polipéptido cuyo amino terminal consiste en una secuencia que codifica 6 histidinas (poli-His) fusionada al ORF 54K que puede ser purificado por medio de una columna de afinidad.

Se realizó la inducción del cultivo bacteriano agregando IPTG y se analizaron los extractos proteicos a diferentes tiempos post-inducción (2, 3 y 4,5 horas) como se muestra en la Figura 10. Se escogió un tiempo de inducción de 3 horas como condición a utilizar posteriormente.

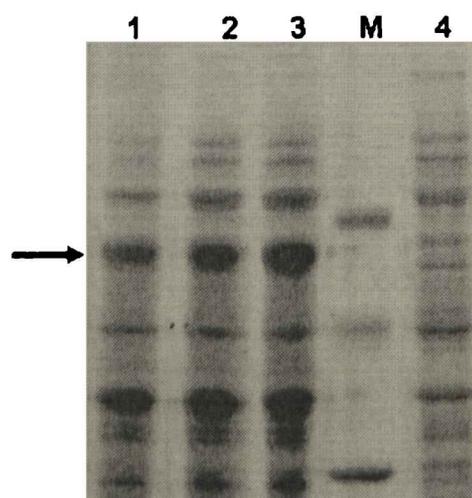
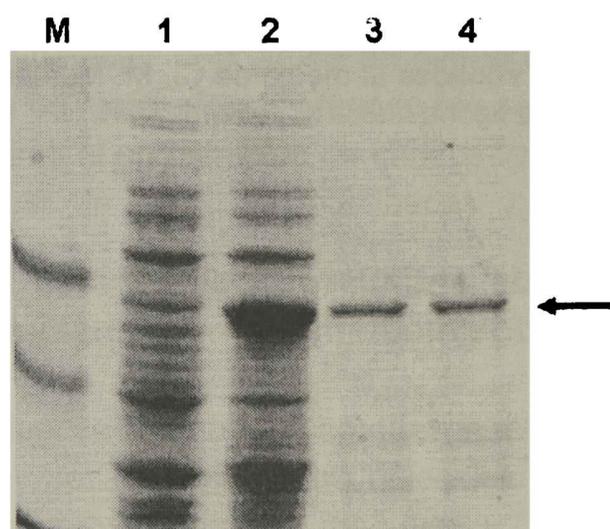


Figura 10. Análisis del extracto proteico del clon pET30-54K BL21(DE3)-CodonPlus-RIL mediante SDS-PAGE. Calles 1 a 4: clon pET30-54K inducido 2, 3 y 4,5 horas utilizando IPTG 1mM y sin inducir, respectivamente. M, Marcador de peso molecular (66, 45, 14 kDa). La flecha indica la proteína 54K.

Para realizar la purificación por columna de afinidad, las células fueron sometidas a lisis en *buffer* con y sin el agregado de Urea 6M (concentración final). El procedimiento para la purificación mediante columna de afinidad se detalla en Materiales y Métodos. Alícuotas de las muestras recolectadas fueron analizadas por SDS-PAGE. En las dos condiciones examinadas no se observó purificación de la proteína deseada, por lo que se efectuó una purificación de la proteína 54K utilizando cloruro de guanidinio 6M en el *buffer* de lisis. Utilizando estas condiciones estrictas de desnaturalización, el polipéptido sobreexpresado pudo ser purificado, como se muestra en la Figura 11. Se efectuó una diálisis exhaustiva de la muestra eluída de la resina contra *buffer* PBS a fin de eliminar el cloruro de guanidinio y posteriormente se cuantificó por medida de absorbancia a 280 nm, obteniéndose 20 mg por ml de cultivo inducido de células BL21(DE3)CodonPlus-RIL conteniendo el plásmido pET30a-54K. Este extracto fue utilizado para la obtención de los antisueros (ver inciso II de este capítulo)

Figura 11. Análisis mediante SDS-PAGE del contenido proteico de la purificación de la proteína 54K usando una columna de afinidad en condiciones desnaturalizantes. Calles 1 y 2: muestras del clon pET30-54K BL21(DE3)-Codon Plus-RIL sin inducir e inducido por 3 horas con IPTG 1mM, respectivamente. Calles 3 y 4: primer y segundo eluído de la columna de afinidad. M: Marcador de peso molecular (66, 45 y 14kDa). La flecha indica la proteína 24K.



I. C. Obtención de la proteína 48K

I. C. 1) *Expresión y purificación de la proteína 48K utilizando el plásmido pET19b-48K*

Como se detalló en el Capítulo 1 (Inciso II. C) la proteína 48K fue expresada del plásmido pET19b-48K en la cepa bacteriana BL21(DE3)-CodonPlus-RIL. Se analizó la inducción del cultivo bacteriano a diferentes tiempos luego de la incubación con IPTG 1mM (1, 2, 3 y 4 horas) por medio de SDS-PAGE observándose expresión de la proteína 48K a partir de las 2 horas del agregado del inductor.

Se efectuó la purificación de la proteína 48K a partir de los CI formados en el cultivo de BL21(DE3)-CodonPlus-RIL inducido durante 3 horas mediante el mismo procedimiento utilizado para purificar la proteína 54K. En la Figura 12 se muestra la purificación parcial de la proteína 48K. Parte de las proteínas bacterianas permanecen en la fracción soluble de la purificación quedando la proteína 48K retenida en los CI.

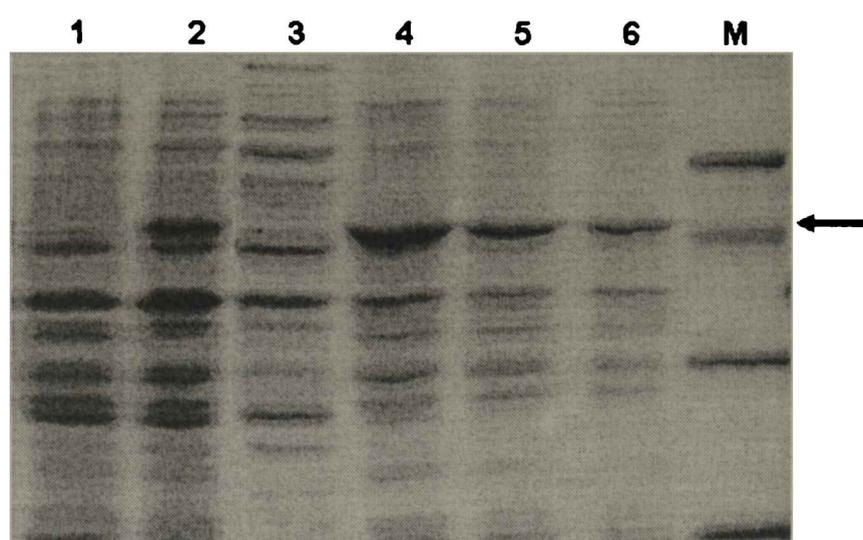


Figura 12. Análisis mediante SDS-PAGE del contenido proteico de la purificación de Cuerpos de Inclusión (CI) del clon pE19b-48K BL21(DE3)-Codon Plus-RIL. Calle 1: muestra del clon sin inducir. Calle 2: muestra del clon inducido por 3 horas con IPTG 1mM. Calle 3: sobrenadante de los CI. Calle 4: CI. Calles 5 y 6: diluciones seriadas al medio de CI. M: Marcador de peso molecular (66, 45, 29 y 14kDa). La flecha indica la proteína 48K.

II. Obtención de antisueros policlonales 24K, 48K y 54K. Titulación de los sueros obtenidos mediante inmunoensayos

A fin de generar antisueros policlonales específicos para las proteínas 24K, 48K y 54K, se realizó la inmunización de conejos y/o ratones. En primera instancia, se obtuvieron sueros anti-48K y anti-54K utilizando como inmunógeno las proteínas purificadas parcialmente (CI), expresadas en *E. coli* e inoculadas en conejos. Como el nivel de sensibilidad de dichos sueros no fue suficiente para detectar las proteínas en extractos de cítricos transgénicos, se realizó una segunda inmunización de conejos y ratones utilizando proteínas 24K y 54K purificadas mediante columna de afinidad.

En los siguientes apartados se detallan las condiciones utilizadas para cada ensayo de inmunización y los resultados obtenidos.

II. A. Obtención de antisueros policlonales 48K y 54K a partir de proteína parcialmente purificada (cuerpos de inclusión)

II. A. 1) Inmunización

Una vez que se optimizaron las condiciones para la obtención de las proteínas virales, éstas fueron cuantificadas mediante diluciones de los CI en *buffer* PBS. Se estimó la concentración del polipéptido a partir de la visualización en SDS-PAGE de la banda de tamaño esperado, por comparación con las bandas del marcador de peso molecular de concentración conocida (ver Figura 12).

A partir de estas determinaciones se realizó la inoculación de conejos utilizando la cantidad de proteína que se detalla en el plan de inmunización (Ver Materiales y Métodos, Tabla 1) resuspendida en PBS para las proteínas 48K y 54K purificadas parcialmente. En

todos los casos, previamente al inicio del plan de inmunización se extrajo sangre de cada uno de los conejos utilizados (suero pre-inmune). Para la obtención de antisueros policlonales se efectuó la inyección de 4 conejos con la proteína 54K y 2 conejos con la proteína 48K.

II. A. 2) Análisis de los sueros desarrollados

Los sueros obtenidos fueron analizados por *western blot* de extractos proteicos de cultivos de la cepa BL21(DE3)-CodonPlus-RIL. Además se analizaron extractos proteicos de plantas sanas e infectadas con el virus (*Chenopodium quinoa* y cítrico), purificaciones parciales de partículas virales (P54) y extractos proteicos de plantas transgénicas 48K o 54K.

En el caso de la proteína 54K, como puede observarse en la Figura 13, el suero detectó la proteína en extractos de *E. coli* usando una dilución de hasta 1/5000 mientras que el suero pre-inmune no reaccionó contra la proteína 54K (dilución 1/500). La sensibilidad no fue suficiente para poder detectar la proteína en planta infectada con el virus aún usando una dilución 1/50 (datos no mostrados). Tampoco fue posible detectar la proteína en purificaciones parciales del virus ni en extractos de cítricos transgénicos 54K. La detección de la proteína 54K a partir de partículas purificadas y otros extractos proteicos será discutida en el Capítulo 3 y 4.

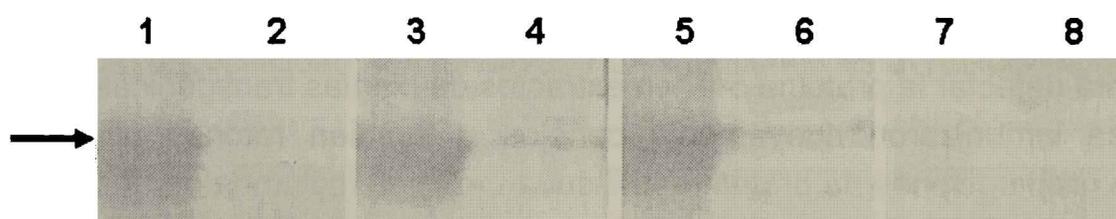


Figura 13. Análisis por *western blot* del suero obtenido utilizando como antígeno la proteína 54K expresada en *E. coli* y parcialmente purificada (CI). Calles 1, 3, 5 y 7: extracto proteico del clon pET22b-54K inducido por 3 horas con IPTG 1mM. Calles 2, 4, 6 y 8: extracto proteico del clon pET22b-54K sin inducir. Se analizaron diferentes diluciones del suero anti-54K, calles 1 y 2: dilución 1:5000; calles 3 y 4: dilución 1:2500; calles 5 y 6: dilución 1:500. En las calles 7 y 8 se muestra el resultado utilizando una dilución 1:500 del suero pre-inmune. La flecha indica la proteína 54K.

Por el contrario, los niveles del suero desarrollado contra la proteína 48K fueron adecuados para detectarla mediante *western blot*, tanto en *E. coli* conteniendo el plásmido pET19-48K como en extractos de planta herbácea infectada con CPsV (Ver Capítulo 4). Sin embargo, no se detectó la proteína de cubierta en extractos cítricos infectados o extractos de plantas transgénicas 48K (Figura 14), debido, posiblemente, a que la concentración de proteína presente en los extractos proteicos es inferior al límite de sensibilidad del método.

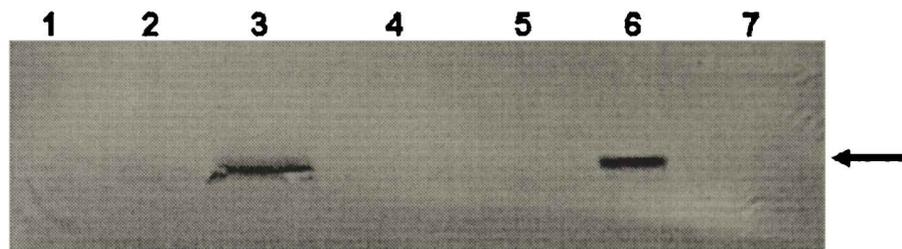


Figura 14. Análisis mediante *western blot* del suero obtenido utilizando como antígeno la proteína 48K expresada en *E. coli* y parcialmente purificada (CI). Calles 1 y 2: extractos de *C. quinoa* sana. Calle 3: extracto de *C. quinoa* infectada con CPsV. Calle 4: extracto de cítrico sano. Calle 5: extracto de cítrico infectado con CPsV. Calle 6: purificación parcial de partículas virales. Calle 7: extracto de cítrico transgénico 48K. La flecha indica la proteína 48K.

II. B. Obtención de antisueros policlonales 24K y 54K a partir de proteína purificada por columna de afinidad

II. B. 1) Inmunización

Una vez expresada la proteína 24K en células de insecto y purificada por columna de afinidad, se inició la obtención de sueros mediante la inoculación en conejos y ratones utilizando preparaciones de la proteína pura.

Por otro lado, como el nivel de detección de los sueros obtenidos anteriormente no fue suficiente para detectar la proteína 54K en extractos de plantas transgénicas ni en plantas enfermas, se inmunizaron nuevamente conejos y también ratones utilizando como inmunógeno preparaciones de proteína purificada mediante columna de afinidad como se detalló anteriormente (inciso I. B. 2).

Se obtuvieron 3 antisueros policlonales de conejos y 2 de ratones mediante un plan de inmunización que se aplicó inyectando las proteínas 24K o 54K purificadas, obtenidas a partir de células de insecto (Hi5) y *E. coli* (BL21(DE3)-CodonPlus-RIL), respectivamente, habiéndose incluido la utilización de un adyuvante de Freud completo recomendado para aumentar el título del suero (Titer Max Gold Adjuvant, SIGMA). Previo al inicio del plan de inmunización, se extrajo sangre a fin de obtener el suero pre-inmune.

Los planes de inmunización se detallan en Materiales y Métodos (Tabla 2 y 3).

II. B. 2) Análisis de los sueros desarrollados

En la Figura 15 se observa el resultado de *western blots* utilizando una dilución 1:500 (segundo *booster*) de los sueros de conejo obtenidos en muestras de *E. coli* inducidas o células Hi5 infectadas y alícuotas de proteína pura utilizada para inocular a los conejos y ratones. Tanto para el suero anti-24K como para el suero anti-54K se observa reacción positiva para los extractos de células infectadas de insecto o inducidas de *E. coli* como para alícuotas de las proteínas purificadas, mostrando que los sueros obtenidos reaccionaron específicamente contra la proteína expresada en estos sistemas.

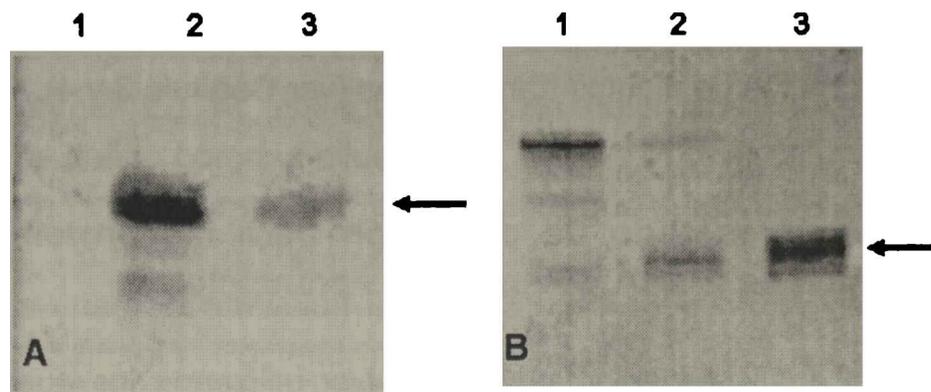
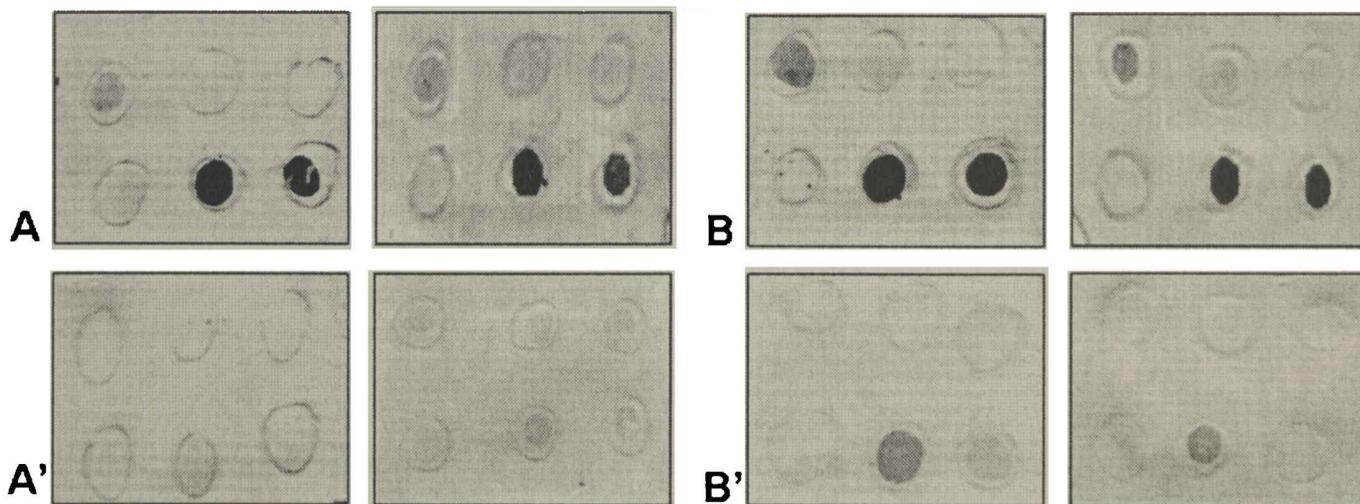


Figura 15. Análisis por *western blot* del suero obtenido utilizando como antígeno las proteínas 24K y 54K expresadas en *E. coli* y purificadas por columna de afinidad. A. Suero anti-24K. Calle 1: células Hi5 sin infectar. Calle 2: células Hi5 infectadas con el baculovirus *AcNPV-24K*. Calle 3: proteína 24K pura. B. Suero anti-54K. Calle 1: extracto del clon pET22b-54K expresado en *E. coli* sin inducir. Calle 2: extracto del clon pET22b-54K expresado en *E. coli* inducido con IPTG 1 mM. Calle 3: proteína 54K pura. Las flechas indican las proteínas 24K y 54K.

El título de estos sueros fue analizado por *dot-blot* mediante preparaciones cuantificadas de las proteínas purificadas. En la Figura 16 se muestra uno de los *dot-blots* realizados utilizando sueros anti-24K y anti-54K obtenidos en conejos (segundo y tercer *booster*), usando una dilución 1/500 detectándose hasta 100 pg de proteína. Además se incluyeron membranas incubadas con los sueros pre-inmunes (dilución 1/500), los cuales presentaron reacción inespecífica solo en altas concentraciones de proteínas (100 ng), demostrando la especificidad del ensayo. Por medio de esta metodología, se pudo



1ng	100pg	10pg
PBS	100ng	10ng

Figura 16. Análisis por *dot-blot* de los sueros obtenidos de conejo utilizando como antígeno las proteínas 24K y 54K purificadas por columna de afinidad. **A y A'**. Suero anti-24K y suero pre-inmune, respectivamente. A la izquierda, dilución 1:500 (2do *booster*). A la derecha, dilución 1:500 (3er *booster*). **B y B'**. Suero anti-54K y suero pre-inmune, respectivamente. A la izquierda, dilución 1:500 (2do *booster*). A la derecha, dilución 1:500 (3er *booster*). En el esquema se indican las concentraciones de proteína pura así como el *buffer* utilizado para la dilución.

detectar hasta 100 pg de proteína pura en diluciones 1:2500 de los sueros obtenidos del quinto y último *booster* (datos no mostrados). Sin embargo, este nivel de sensibilidad no

fue suficiente para detectar las proteínas 24K y 54K por *Western blot* a partir de extractos proteicos de plantas sanas e infectadas con CPsV, de purificaciones parciales del virus CPsV (P54) y de extractos de plantas transgénicas (ver Capítulo 3 y 4).

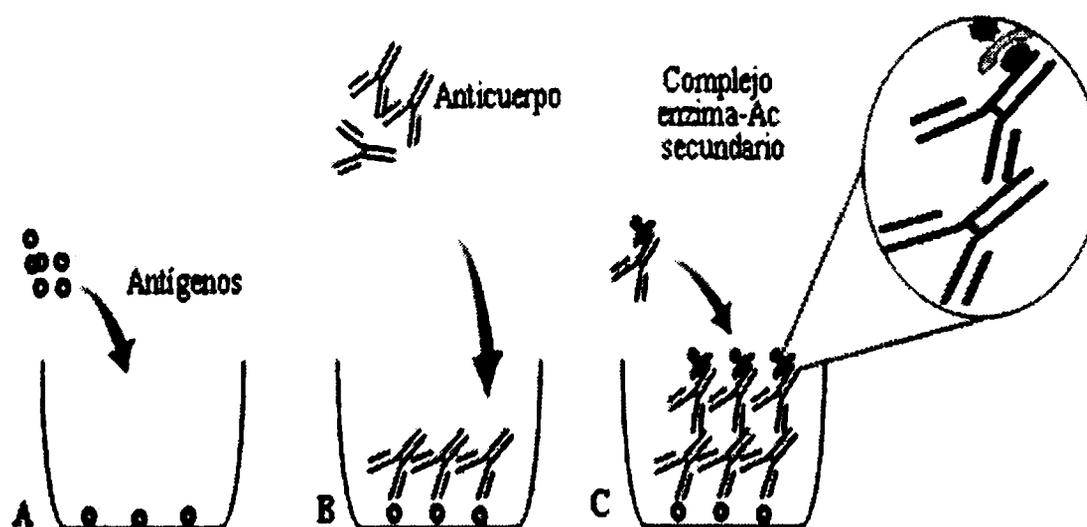
III. Desarrollo de un método de detección para las proteínas 24K y 54K aplicando la técnica de ELISA competitivo secuencial.

Debido a que el análisis mediante *Western blot* utilizando los sueros obtenidos no evidenció la presencia de la proteína en plantas transgénicas 54K o 24K, ni en plantas infectadas con CPsV, se decidió aplicar un ensayo inmunológico más sensible. Por ello, se optimizó el ensayo de ELISA competitivo secuencial, que permite detectar el antígeno de interés a muy bajas concentraciones (Shao *et al.*, 2005).

Para iniciar la optimización de este ensayo es necesario titular los diferentes sueros obtenidos. Para ello se desarrolló un ELISA indirecto a fin de seleccionar entre los sueros obtenidos, el que presentara mejor título, para luego utilizarlo en el ELISA competitivo secuencial.

III. A. Titulación mediante ELISA indirecto

En el presente trabajo se utilizó este ensayo de ELISA con el fin de determinar la dilución del suero primario y del suero secundario conjugado a HRP (*Horseradish Peroxidase*) a utilizar en posteriores ensayos del ELISA competitivo secuencial. Usualmente, en el ELISA indirecto el antígeno o analito es inmovilizado en la superficie del pocillo de la placa y su concentración es medida indirectamente por la cuantificación del anticuerpo específico unido, utilizando un anticuerpo secundario (anti-IgG) conjugado a una enzima (Esquema 1). En nuestro caso, se inmovilizó en el fondo del pocillo una concentración establecida de proteína purificada, para luego incubar con diferentes diluciones seriadas del suero primario o secundario (anti-IgG) a analizar, dejando fija la dilución del otro anticuerpo utilizado. En los siguientes apartados se presentan los resultados obtenidos en estos ensayos.



Esquema 1. ELISA indirecto

III. A. 1) Selección de los sueros anti-24K y anti-54K

Se realizó un primer ELISA indirecto a fin de determinar el título de los sueros obtenidos, el cual se define como la dilución del suero a la cual se obtiene un 50% de la DO máxima. De esta manera, se selecciona el suero que presenta el mejor título frente al antígeno ensayado. Como condición inicial, se inmovilizó la proteína pura resuspendida en *buffer Coating* a una concentración final de 3 ng/ μ l (300 ng de proteína por pocillo), incubando a 4° C *overnight*. Posteriormente se incubó 1 hora a 37°C con diluciones seriadas (100, 400, 1600, 3200, 12800) de los sueros a analizar. La dilución del anticuerpo secundario correspondiente (anti-ratón-IgG o anti-conejo-IgG conjugado a HRP) utilizada fue de 1:5000 (ver Materiales y Métodos). En la Figura 17 A y B se muestran los resultados obtenidos, de donde se seleccionó el suero N°3 y N°6 de conejo que mostraron el mejor título frente al antígeno 24K (1:5000) y al antígeno 54K (1:6300), respectivamente. Dichos sueros fueron los que se utilizaron en los siguientes ensayos.

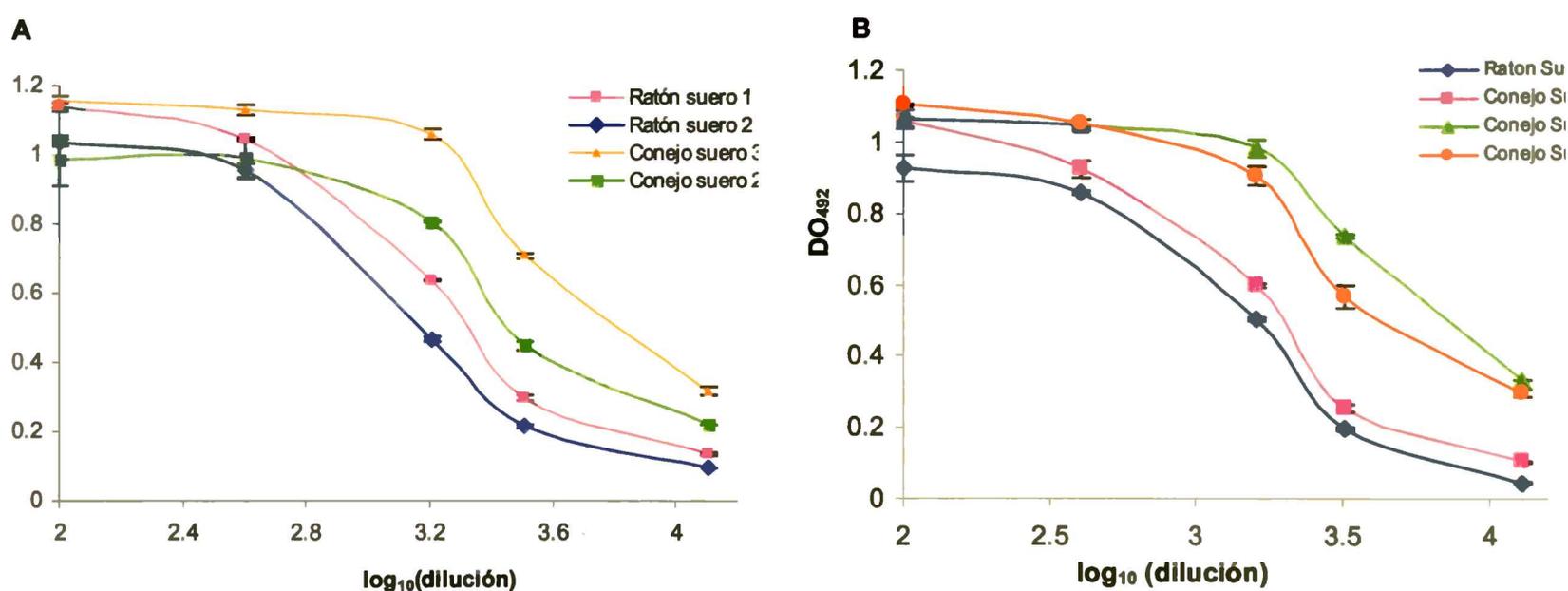


Figura 17. Determinación del título de los sueros obtenidos anti-24k (A) y anti-54K (B) mediante ELISA indirecto. Los valores de DO son el promedio del triplicado de las muestras, las barras indican la desviación estándar.

III. A. 2) Determinación de la dilución de anticuerpo secundario (anti-IgG)

Posteriormente se optimizó la dilución del anticuerpo secundario-conjugado a HRP (anti-conejo-IgG-HRP) a utilizar mediante ELISA indirecto. Para ello, se sensibilizaron los pocillos de la microplaca con una concentración 3 ng/ μ l de antígeno purificado ON a 4° C. De los sueros primarios seleccionados (Suero 3, anti-24K o Suero 6, anti-54K) se utilizó una dilución 1:100 a fin de asegurar saturación de la reacción de reconocimiento antígeno-anticuerpo. Se realizaron diluciones seriadas del antisuero secundario anti-conejo-IgG-HRP, ensayándose diluciones al medio desde 1:100 a 1:102400. La Figura 18 muestra los resultados obtenidos utilizando como anticuerpo primario el suero anti-24K (A) y el suero anti-54K (B). Se seleccionó como dilución a utilizar posteriormente la

máxima dilución con la que se observa mayor absorbancia a 492 nm, es decir 1:3000 para el suero anti-24K y 1:2000 para el suero anti-54K.

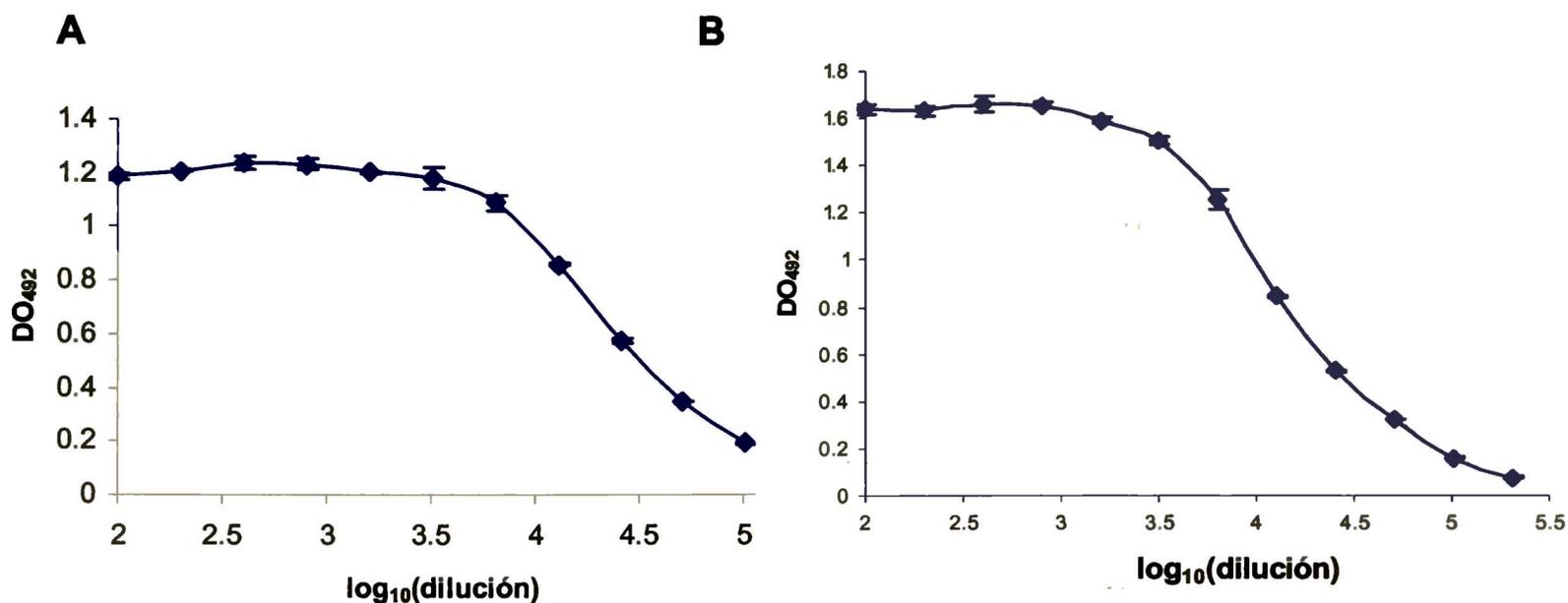


Figura 18. Determinación de la dilución de anticuerpo secundario (anti-IgG) mediante ELISA indirecto. **A.** Titulación del anti-conejo-IgG-HRP usando el suero anti-24K. **B.** Titulación del anti-conejo-IgG-HRP usando el suero anti-54K. Los valores de DO son el promedio del triplicado de las muestras, las barras indican la desviación estándar.

III. A. 3) *Determinación de la dilución del anticuerpo primario*

Mediante ELISA indirecto, se determinó la dilución del suero correspondiente a la zona de mayor sensibilidad, para luego ser utilizada en el ELISA competitivo secuencial. Para ello, se fijó la concentración de antígeno en 3 ng/ul y la dilución del anticuerpo secundario anti-conejo-IgG-HRP en 1:3000 y 1:2000 para el suero anti-24K y anti-54K, respectivamente. Posteriormente, se ensayaron diluciones seriadas al medio de los sueros anti-24K y anti-54K seleccionados, desde una relación 1:50 hasta 1:409600. La Figura 19 muestra los valores de absorbancia a 492 nm obtenidos. Dado que en el ELISA

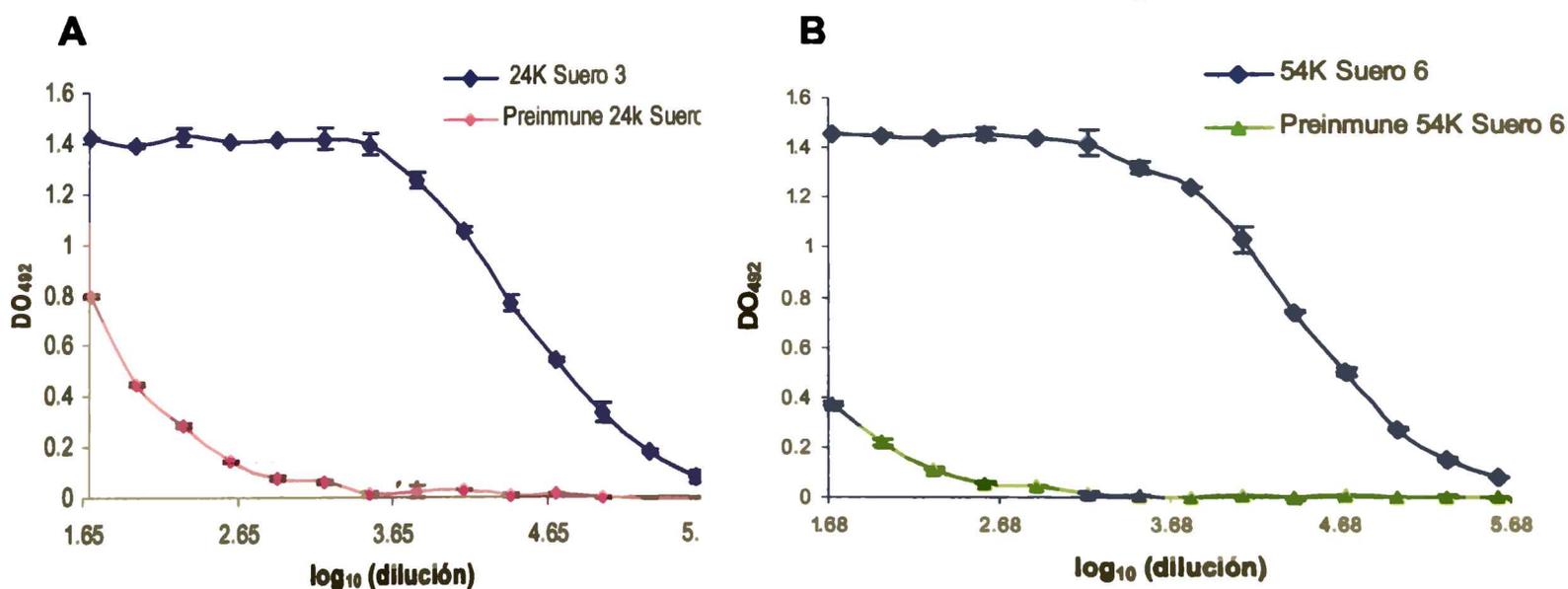
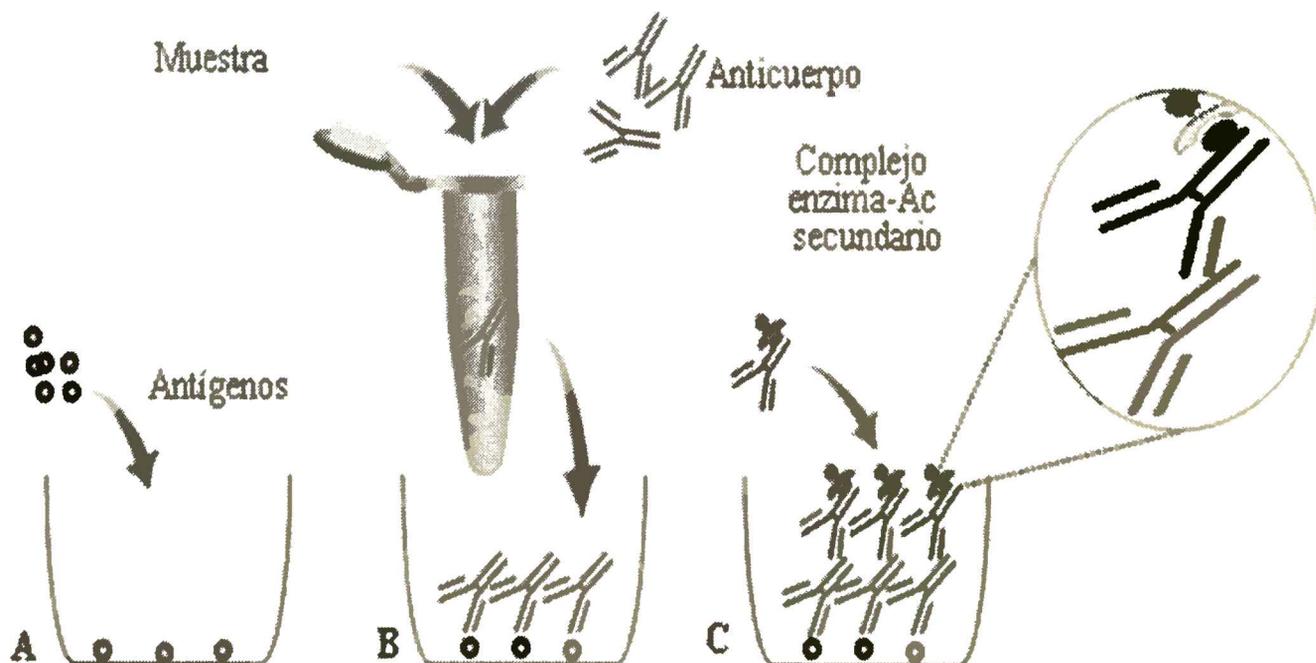


Figura 19. Determinación de la dilución del suero anti-24K (A) y anti-54K (B) mediante ELISA indirecto. Los valores de DO son el promedio del triplicado de las muestras, las barras indican la desviación estándar.

competitivo se requiere que variaciones en la concentración del antígeno presente en la muestra se vean reflejadas en variaciones en la señal obtenida, la dilución de suero a utilizar debería estar comprendida dentro de la zona de mayor sensibilidad de la curva obtenida para el ensayo del ELISA indirecto. En general, se selecciona una dilución cercana a la cual la señal empieza a disminuir. Por lo tanto, a partir del análisis de los valores de observancia obtenidos, se seleccionó como dilución óptima una relación de 1:8000 para el suero anti-24K y 1:9000 para el suero anti-54K a utilizar en el ELISA competitivo secuencial. En la misma placa de ELISA se realizó la determinación de la curva de dilución para el suero pre-inmune confirmando especificidad de los sueros seleccionados.

III. B. ELISA competitivo secuencial

Este tipo de ensayo inmunoenzimático es utilizado, frecuentemente, para detectar un antígeno que se encuentra en muy baja concentración (Shao *et al.*, 2005). El procedimiento para el ensayo de ELISA competitivo secuencial se presenta en el Esquema 2. Consiste en inmovilizar una concentración determinada de antígeno purificado en el pocillo de la microplaca; luego, se agrega una mezcla de anticuerpo específico y extracto proteico conteniendo el analito a cuantificar. En algunos casos, se puede pre-incubar la muestra a cuantificar con el anticuerpo específico. Esta variante del ELISA competitivo (ELISA competitivo secuencial) fue desarrollada en el presente trabajo



Esquema 2. ELISA competitivo secuencial

de tesis. Posteriormente, se incuba el pocillo en presencia de un anticuerpo secundario conjugado a una enzima, capaz de reconocer el anticuerpo primario. En paralelo se

realiza una curva de calibración (curva estándar) utilizando diferentes concentraciones de antígeno puro.

En el ELISA competitivo, existe una relación inversa entre la señal obtenida y la concentración de analito presente en la muestra, debido a la competencia entre el antígeno libre en la muestra y el antígeno inmovilizado al pocillo, por el anticuerpo en solución; es decir, cuanto mayor concentración de antígeno contenga la muestra incógnita menor será la señal obtenida.

En la Figura 20A se muestra una curva estándar modelo para un ELISA competitivo (Sasaki y Mitchell, 2005). Los valores de las intensidades de la señal son recalculados para expresarlos en una escala porcentual de 0 a 100%, donde $B_0=a=100$ y $d=0$.

Si se grafican los datos utilizando una escala semilogarítmica para los valores de concentración (Figura 20B), se observan claramente las dos regiones *plateau*, una correspondiente al límite superior con un valor de señal máximo, a (100% de la señal), y otra correspondiente al límite inferior con un valor de señal mínimo, d (0% de la señal). El punto de inflexión (concentración c donde la señal es el 50% de la señal máxima obtenida) sirve para definir el rango a utilizar a fin de evaluar las muestras incógnitas.

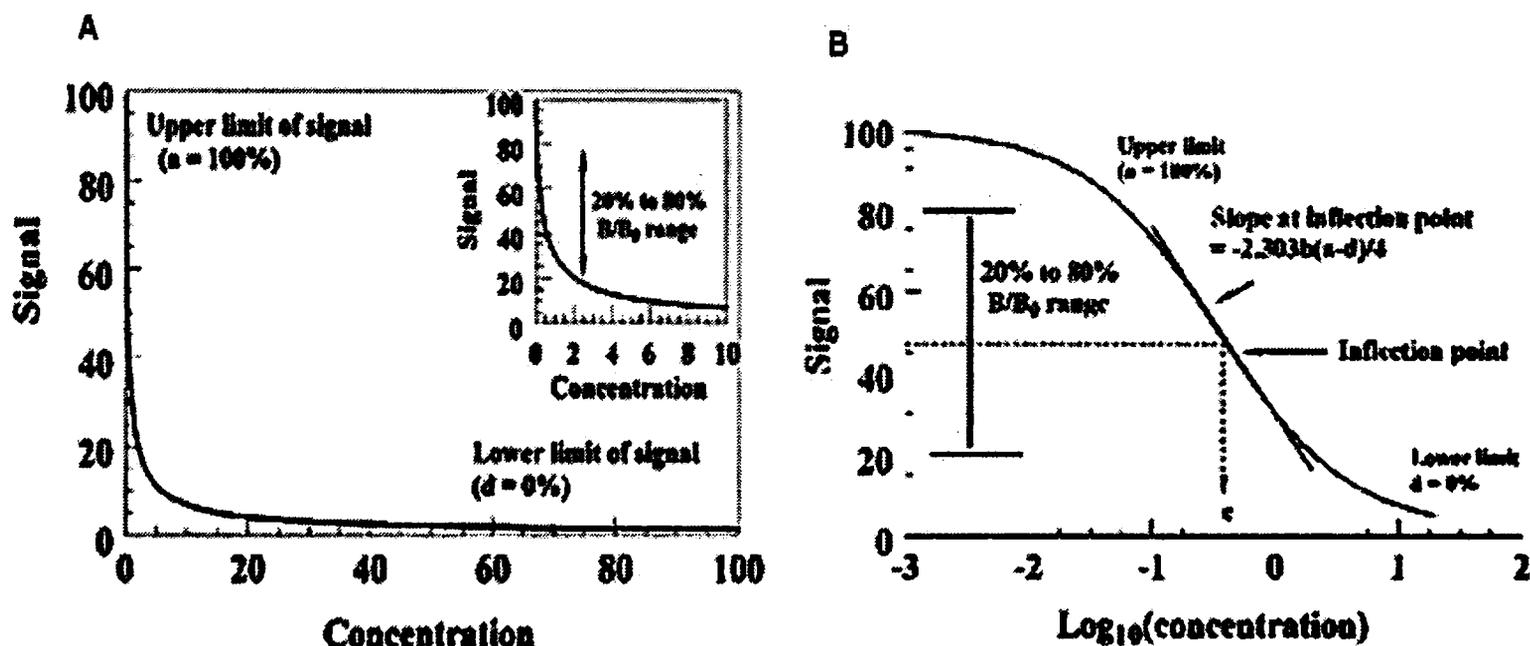


Figura 20. En A, curva estándar modelo para un ELISA competitivo. En B, gráfico de los datos utilizando una escala semilogarítmica para los valores de concentración (Sasaki y Mitchell, 2005)

A partir de los datos obtenidos para la curva estándar, y utilizando el *software* adecuado, se puede realizar un análisis de regresión no-lineal usando un modelo logístico de cuatro parámetros (Maciel, 1985, Diamandis y Christopoulos, 1996). Si no se cuenta con dicho *software*, los datos del ELISA competitivo pueden ser linealizados y analizados usando una transformación log-logit (Diamandis y Chistopoulos, 1996). La parte lineal de la curva estándar obtenida puede ser usada para evaluar las muestras incógnitas por regresión lineal. Deben ser incluidas concentraciones estándares bajas y altas a fin de establecer los valores para la señal máxima (a) y la señal de la línea de fondo (d), respectivamente. Una vez obtenidos estos valores, los datos son ajustados a la ecuación:

$$\text{Logit } r = \text{constante} - b \log_{10} (\text{Concentración})$$

donde $r = B/B_0$ y $\text{logit } r = \ln(r/(1-r))$, siendo $B_0 = a-d$ y $B = y-d$

III. B. 1) ELISA competitivo secuencial (24K)

Determinado el rango de sensibilidad del suero mediante el ELISA indirecto, se efectuaron diferentes ensayos a fin de establecer la dilución del suero a utilizar en el ELISA competitivo secuencial y el rango de concentración de la proteína pura utilizada para que la curva de calibración posea un comportamiento lineal.

Las condiciones seleccionadas para el ensayo fueron un factor de dilución de 1:8000 final para el anticuerpo primario y una concentración de antígeno de $1,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ totales por pocillo de microplaca de ELISA. Para la curva estándar se utilizaron concentraciones de 10 pg a 200 ng de antígeno totales por pocillo. Cada punto fue ensayado por triplicado en la microplaca de ELISA.

La curva estándar (Figura 21A) mostró un comportamiento sigmoideo como el descrito (Figura 20B) y aplicando la transformación log-logit a los valores obtenidos para los puntos de la curva estándar se determinó un rango de medida de $100 - 1000 \text{ ng ml}^{-1}$ (Figura 21B) para dicha curva. El límite de detección del ensayo fue de 68 ng ml^{-1} , el cual corresponde a la concentración de proteína 24K que permite un 90% de unión al anticuerpo. Así, quedaron establecidas las condiciones óptimas para los posteriores ensayos de ELISA competitivo secuencial que fueron aplicados para la detección de la proteína 24K en cítricos transgénicos y planta inoculadas con CPsV (ver Capítulo 3 y 4).

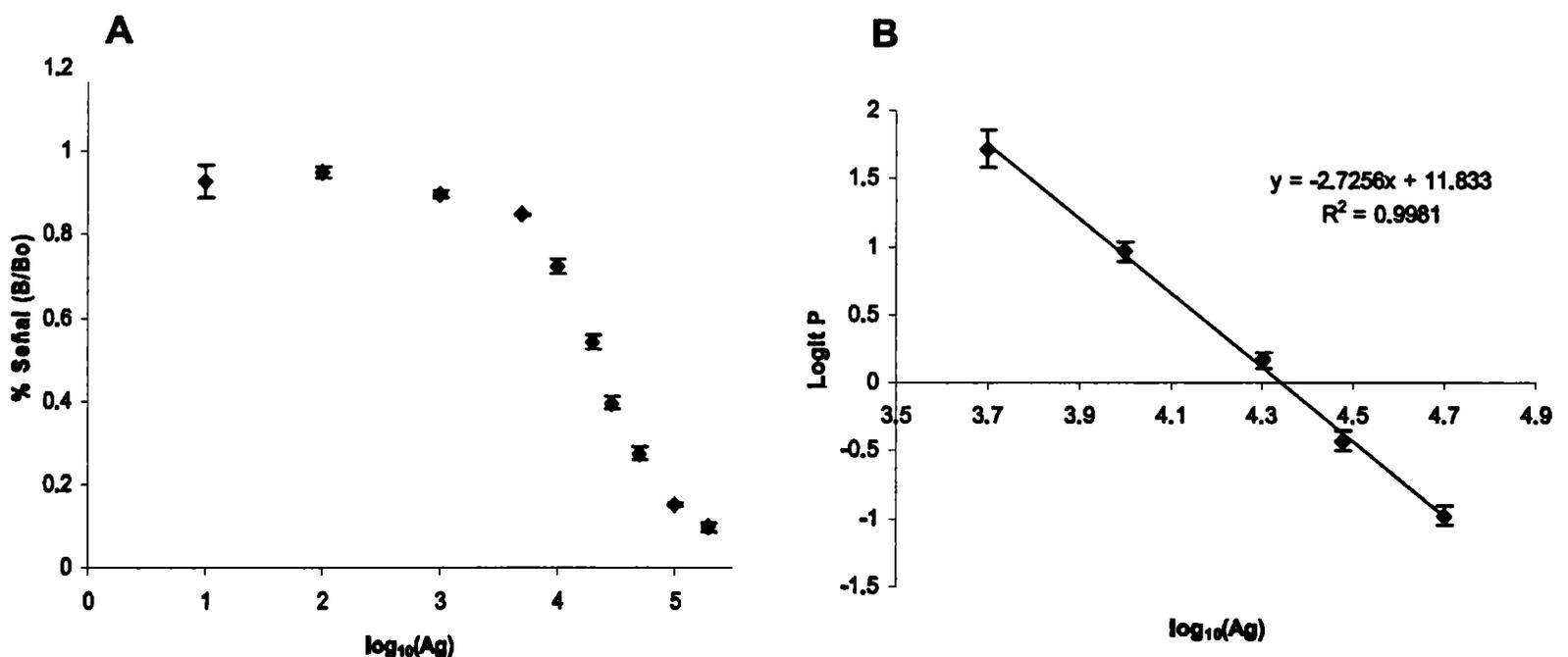


Figura 21. ELISA competitivo secuencial para la determinación de la proteína 24K. En A se muestra la curva estándar obtenida y en B la linealización aplicando la transformación log-logit. Los valores de DO son el promedio del triplicado de las muestras, las barras indican la desviación estándar.

III. B. 2) *ELISA competitivo secuencial (54K)*

Para la optimización del ELISA competitivo secuencial aplicado a la detección de la proteína 54K se realizaron ensayos similares a los descritos para la optimización del ensayo para la proteína 24K (III. B. 1). Así, establecido el rango de sensibilidad del suero anti-54K (ensayo de ELISA indirecto) se efectuó la determinación de la dilución del suero a utilizar en el ELISA (1:9000 final) y el rango de concentración del antígeno a utilizar en la curva de calibración. Se sensibilizó la microplaca de ELISA con una concentración de proteína 54K pura de $1,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ totales por pocillo y para la curva estándar se ensayaron concentraciones de 10 pg a 200 ng de antígeno totales por pocillo. Cada punto fue ensayado por triplicado. Con estas condiciones la curva estándar mostró un comportamiento sigmoideo similar al obtenido para el ensayo para la proteína 24K (datos no mostrados). Se aplicó la transformación log-logit a los valores obtenidos para la curva estándar determinándose como rango de medida $100 - 1000 \text{ ng ml}^{-1}$. La concentración de proteína 54K que permite un 90% de unión al anticuerpo, fue de 32 ng ml^{-1} .

Así, quedaron establecidas las condiciones óptimas para los posteriores ensayos de ELISA competitivo secuencial aplicado a la detección de la proteína 54K en cítricos transgénicos y en plantas inoculadas con CPsV (ver Capítulo 3 y 4).

III. B. 3) *Determinación de la concentración de proteína total en las muestras (ensayo Bradford)*

Debido a que las muestras a ser analizadas en el ELISA competitivo secuencial provendrían de un extracto crudo de muestras foliares, ya sea de plantas infectadas con CPsV o plantas transgénicas, era necesario determinar la concentración de proteína total a fin de realizar comparaciones cuantitativas entre muestras y analizar si la presencia de contaminantes provenientes del extracto proteico podrían interferir en la interacción entre el antígeno y el anticuerpo presentes en el tubo de reacción.

Por lo tanto, se realizó dicho ensayo utilizando diferentes diluciones de extracto de cítrico sano. Para ello, previo a la pre-incubación, la concentración de la muestra fue determinada por el método de Bradford (mg totales). Se efectuó el procedimiento de microensayo realizando una curva de calibración usando albúmina de suero bovino (BSA, por *Bovine Serum Albumin*) como proteína estándar (Ver Materiales y Métodos). La concentración que produjo la menor disminución de señal en el ensayo, similar a la obtenida para el control sin antígeno en competición con el suero fue de $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ de proteínas totales de cítrico sin infectar. Mayores concentraciones proteicas de extracto de cítrico provocaron una disminución no específica de la señal (datos no mostrados).

Por lo tanto, los ELISA competitivos secuenciales se realizaron empleando $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ de proteínas totales en la etapa de pre-incubación con el anticuerpo primario a fin de determinar la concentración de proteína 24K y 54K en muestras de plantas transgénicas y de plantas infectadas con CPsV (ver capítulos 3 y 4, respectivamente).

IV. Modificación del método TAS-ELISA para la detección de la proteína 48K

IV. A. Diferentes métodos aplicados a la detección de la proteína 48K en cítricos transgénicos

En publicaciones previas se han desarrollado distintos métodos de detección de la proteína 48K de CPsV utilizando diferentes anticuerpos. El primer método reportado fue un ELISA doble sándwich (DAS-ELISA) desarrollado por García *et al.*, en 1997, utilizando el anticuerpo policlonal (A322) obtenido a partir de la inyección de conejos con virus parcialmente purificado. Luego, este anticuerpo, fue utilizado en un inmunoensayo desarrollado por Alioto *et al.* (1999), el ELISA triple sándwich (TAS-ELISA) en el cual también se usó un anticuerpo monoclonal, el MAbs 13C5 (IgG) desarrollado por Alioto. El anticuerpo policlonal A322 es aun usado en varios laboratorios del mundo para detectar CPsV por TAS-ELISA-AP pero su disponibilidad es limitada y se agotará en poco tiempo. Piero Roggero (IVA, Torino, Italia) obtuvo un nuevo anticuerpo policlonal, el A376, a partir de la inyección de conejos con una mezcla de virus parcialmente purificado y proteína 48K recombinante, expresada en *E. coli* desarrollada por Martín (IVIA, España).

Al analizar mediante *Western blot* extractos proteicos de plantas infectadas y transgénicas 48K utilizando los sueros policlonales A322 y A376, y el MAbs 13C5 no pudo detectarse la proteína de la cápside (datos no mostrados).

Estos resultados indicaron que era necesario aplicar una técnica más sensible para la detección de esta proteína. Por lo tanto, para el análisis de las plantas transgénicas 48K desarrolladas durante el trabajo de tesis se utilizó el TAS-ELISA desarrollado por Alioto. Este método es usado para el diagnóstico de CPsV y su implementación como método de detección ha dado buenos resultados (Martín *et al.*, 2002). Cuando esta técnica fue aplicada a extractos proteicos de transgénicas 48K, su detección fue variable y muy baja, posiblemente debido a que el nivel de expresión de dicha proteína en cítricos transgénicos se encuentra por debajo del límite de detección del método (datos no mostrados).

Por ello, se efectuaron modificaciones del TAS-ELISA en los últimos pasos de ensayo a fin de aumentar el límite de detección para luego aplicar esta técnica modificada (TAS-ELISA-HRP) al análisis de las plantas transgénicas 48K.

IV. B. Modificación del método TAS-ELISA-HRP

El procedimiento utilizado en el TAS-ELISA- HRP es, básicamente, el mismo que fue descrito por Alioto *et al.*, 1999, para el ensayo de TAS-ELISA usando Fosfatasa Alcalina (TAS-ELISA-AP). Ambos inmunoensayos se describen en Materiales y Métodos. Además del uso del anticuerpo policlonal A376 en reemplazo del A322 se realizó la detección utilizando otro conjugado enzimático (HRP por AP).

En ensayos previos, los policlonales A322 y A376 fueron comparados mediante TAS-ELISA-AP en la misma microplaca y con las mismas muestras mostrando niveles de detección similares, indicando que el suero A376 podría reemplazar al A322. Debido a la falta de policlonal A322, esta misma comparación no pudo realizarse mediante TAS-ELISA-HRP.

En primera instancia, se optimizó la dilución del anticuerpo de captura (A376) ensayando diluciones del mismo y manteniendo fija la dilución del anticuerpo de reconocimiento (MAbs 13C5) y del antisuero anti-IgG de ratón marcado con HRP o AP (*Alkaline Phosphatase*). Estos ensayos fueron realizados por el Lic. Eduardo J. Peña en el IBBM. Las condiciones utilizadas para el TAS-ELISA-HRP y los ensayos de comparación se establecieron en una dilución 1:2500 para el anticuerpo policlonal A376, una dilución 1:32000 para el anticuerpo monoclonal Mabs 13C5 (IgG) y una dilución 1:3000 para el antisuero anti-IgG de ratón conjugado a HRP o AP.

IV. C. Comparación de los métodos TAS-ELISA aplicados a la detección de 48K en cítricos transgénicos

Se aplicó la técnica modificada TAS-ELISA-HRP al análisis de plantas transgénicas 48K y se comparó con el método TAS-ELISA-AP. Los dos ensayos se efectuaron en la misma microplaca de ELISA y las muestras se analizaron por triplicado. En los párrafos siguientes se detallan los resultados obtenidos así como las dificultades para realizar los cálculos con los valores de densidad óptica obtenidos por esta técnica.

IV. C. 1) Consideraciones para realizar los cálculos

En la Figura 22 se muestran los resultados obtenidos para la muestra sana (S) y para el *buffer* PBS, observándose que los valores obtenidos no difieren significativamente. Es decir, éste método no detecta proteínas o reacciona inespecíficamente con componentes del extracto sano siendo el valor de DO igual al obtenido con el *buffer* PBS. Por lo tanto, cuando se realiza la resta del valor obtenido para el *buffer* PBS al valor de S resulta un número muy bajo (en el orden de 0,001) y, en algunos casos, un valor negativo. Si se consideraran estos valores, las relaciones de DO entre las muestras incógnitas y los valores de S resultarían ser extremadamente altas (I/S de 100 a 1000), o incluso negativas, lo cual no tendría un significado biológico.

Estos mismos inconvenientes en los cálculos han tenido los mismos investigadores que desarrollaron el TAS-ELISA (Alioto y Martín, comunicación personal). Por esta razón, para los análisis realizados en la comparación de los métodos TAS-ELISA-AP y TAS-ELISA-HRP se usaron las lecturas de DO de las muestras sin restarles el valor de PBS. En general, los valores al aplicar el TAS-ELISA presentados en otros capítulos de la tesis, se reportan sin efectuar dicha resta, a menos que se indique lo contrario.

IV. C. 2) Ensayo en muestras de plantas transgénicas 48K

En la presente tesis se obtuvieron veintiuna plantas de cítrico transgénico conteniendo el ORF 48K. Cuando se analizaron 9 de dichas líneas mediante *Western blot*, la proteína 48K no pudo detectarse debido al bajo nivel de expresión del transgén. Por esta razón, una vez optimizado, el TAS-ELISA-HRP fue aplicado para la detección de la proteína 48K en estas muestras. Dichas líneas presentan diferentes niveles de expresión de la proteína de la cápside viral (Ver Capítulo 3).

En la Figura 22A se muestran los valores de DO obtenidos para las 9 líneas transgénicas, aplicando ambos ELISAS. Se realizó un análisis estadístico (ANOVA) de los valores obtenidos para la relación T/S para ambos métodos de TAS-ELISA el cual reveló que los valores del TAS-ELISA-HRP son significativamente mayores ($P < 0,001$) que los obtenidos mediante el TAS-ELISA-AP. Si se analizan las relaciones T/S para cada una de las líneas transgénicas y para cada método aplicado, el TAS-ELISA-HRP resultó 1,9 a 5,1 veces más sensible que el TAS-ELISA-AP a 2 horas y entre 1,5 a 3,3 veces respecto a los resultados obtenidos para el TAS-ELISA-AP a 24 horas de incubación (Figura 22B).

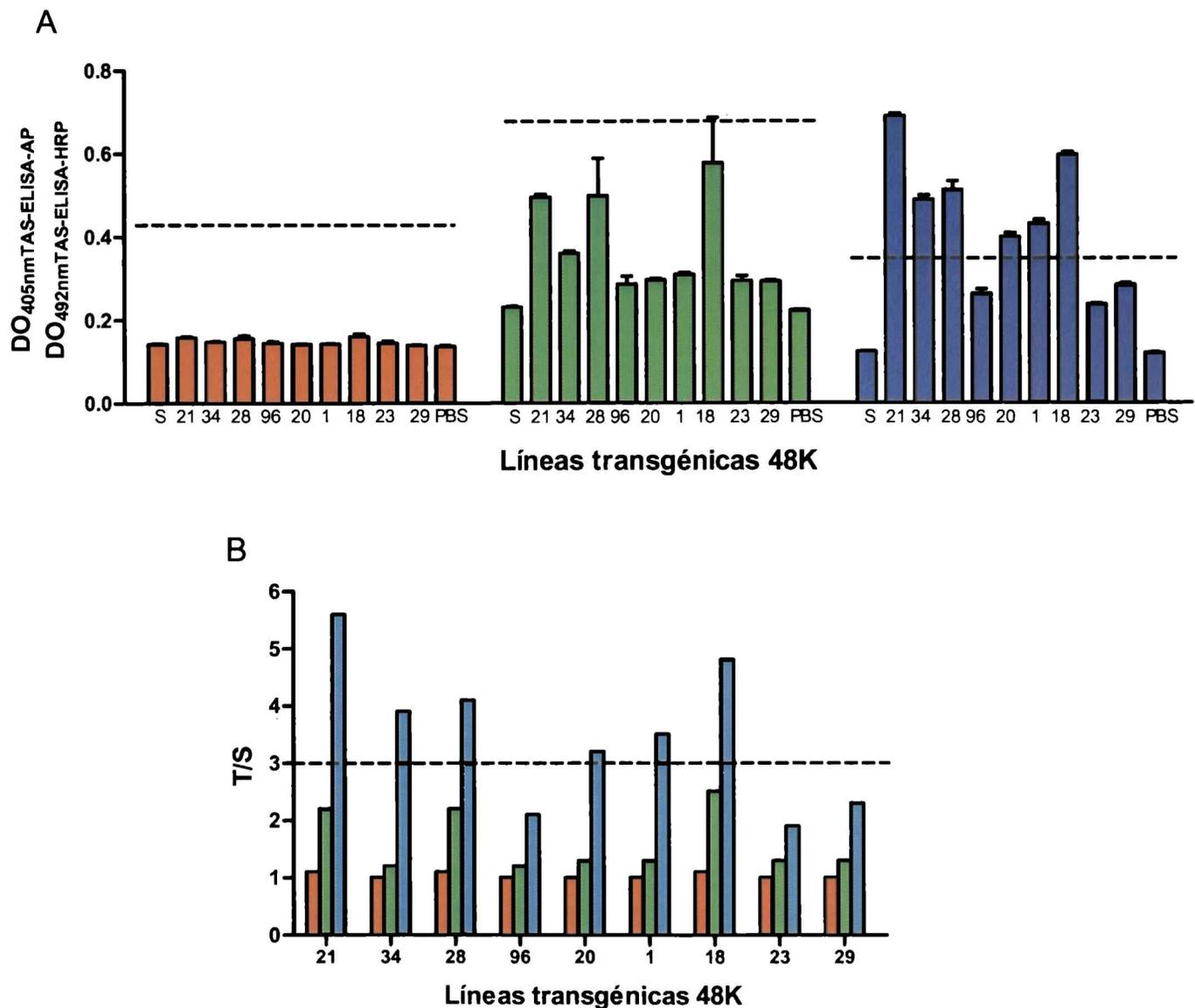


Figura 22. Comparación de los ensayos TAS-ELISA para la detección de la proteína 48K de CPsV en plantas de cítrico transgénicas. **(A)** Los valores de DO son el promedio del triplicado de las muestras, las barras indican la desviación estándar. La línea punteada indica el valor de 3 veces la DO del cítrico sano. **(B)** T/S: relación del valor de DO de la línea transgénica (T) sobre el valor de DO de la planta sana (S). La línea punteada representa una relación T/S de 3 veces.

Los valores de DO fueron obtenidos en la misma microplaca con los mismos extractos. Barras rojas: TAS-ELISA-AP (2hs); barras verdes: TAS-ELISA-AP (24hs) y barras azules: TAS-ELISA-HRP.

Cuando el TAS-ELISA es utilizado en muestras provenientes de plantas de campo o posiblemente infectadas con el virus, se considera que, si los valores de DO de muestras incógnitas dan mayores que 3 veces el promedio de los valores obtenidos para el control

de planta sana, las muestras son positivas para la detección de CPsV (García *et al.*, 1997; Alioto *et al.*, 1999). Si se tiene en cuenta este valor umbral (una relación T/S de 3), cuando se analizan los valores de DO se observa que todas las líneas transgénicas resultaron ser negativas empleando el TAS-ELISA-AP, tanto para las medidas tomadas a 2 como después de 24 horas. Sin embargo, cuando se aplicó el TAS-ELISA-HRP, considerando este valor umbral, en seis de las nueve líneas transgénicas se pudo detectar la proteína 48K.

Si se analiza la dispersión de los datos, dado que cada extracción fue determinada por triplicado en la microplaca de ELISA, las desviaciones estándar obtenidas en el TAS-ELISA-AP fueron mayores a 24 horas que a 2 horas, y, en general, fueron superiores a las obtenidas con el TAS-ELISA-HRP (Figura 22A). Además, dicha dispersión dependía de la posición de la muestra en la microplaca ("efecto borde"). Estos resultados pueden deberse, probablemente, a que el TAS-ELISA-AP es más sensible al gradiente de temperatura, dado que el desarrollo de la reacción AP lleva entre 17 a 24 horas. Por el contrario, el TAS-ELISA-HRP demora 30 minutos para dar los resultados y no hay marcada variabilidad entre los triplicados de la muestra cuando se encuentran en el borde de la placa.

CONCLUSIONES

Se han expresado las proteínas virales 24K, 48K y 54K de CPsV en diferentes sistemas de expresión (*E. coli* y/o células de insecto) obteniéndose alta concentración proteica.

Se han logrado purificaciones parciales (CI) y mediante cromatografía de afinidad de las proteínas 24K, 48K y 54K obteniendo hasta 20 mg por ml de cultivo bacteriano (54K) o 10 ng por 10^5 células (24K). Dichas proteínas fueron utilizadas como antígenos para la inoculación de conejos y ratones.

Los sueros obtenidos anti-24K, anti-48K y anti-54K han presentado especificidad hacia los antígenos ensayados determinándose su título mediante diferentes inmunoensayos (*dot-blots* y ELISA indirectos).

Se han desarrollados inmunoensayos para la detección de las proteínas virales 24K y 54K (ELISA competitivo secuencial) permitiendo una detección del antígeno en un rango lineal de 100 – 1000 ng ml⁻¹.

Se ha optimizado el método TAS-ELISA tradicional (TAS-ELISA-AP) utilizando un nuevo suero policlonal y se han modificado las últimas etapas del procedimiento a fin de aumentar el límite de detección y la rapidez del método (TAS-ELISA-HRP).

Se ha demostrado que el TAS-ELISA-HRP aplicado al análisis de plantas transgénicas con baja concentración de proteína 48K es un método más confiable, sensible y rápido que el TAS-ELISA-AP (ver Capítulo 5).

CAPÍTULO 3. Búsqueda de resistencia derivada del patógeno mediante la obtención de cítricos transgénicos conteniendo ORFs de CPsV.

- I. **Obtención de líneas transgénicas 24k, 48k y 54k de naranjo dulce
Pineapple**
- II. **Caracterización molecular de las líneas transgénicas obtenidas**
- III. **Evaluación de la resistencia de las líneas transgénicas
seleccionadas al virus de la psorosis de los cítricos**



INTRODUCCIÓN

De los agentes patológicos que afectan las plantas, los virus son uno de los mayores problemas en los cultivos agronómicos, causando grandes pérdidas económicas mundiales. Dentro de los daños que pueden generar no solo se incluyen las pérdidas directas del cultivo sino que la infección viral puede ejercer además daños indirectos como reducción del crecimiento y vigor de la planta, reducción de la calidad o el valor comercial del producto, etc. Por largo tiempo se han utilizado técnicas de manejo de cultivo para limitar el efecto de estos patógenos, como la rotación del cultivo, la detección temprana de las plantas infectadas y su eliminación, el control químico de sus vectores, protección cruzada y el manejo del cultivo en búsqueda de resistencia (Matthews, 1991).

En muchos sistemas virus-plantas se ha descrito resistencia natural del huésped. Sin embargo, hasta el momento, no se ha reportado este tipo de resistencia a CPsV ni en cítricos y ni en especies relacionadas usadas como pie como las del tipo trifoliado (*Poncirus trifoliata*).

La resistencia derivada del patógeno (PDR, por *Pathogen-Derived Resistance*) ha sido utilizada como medio para controlar las enfermedades de origen viral a través de la incorporación de secuencias derivadas del virus en plantas transgénicas (Sanford y Johnston, 1985).

Al inicio de 1980 se obtuvieron las primeras plantas transgénicas. El uso de esta tecnología por el grupo de investigación dirigido por el Dr. Beachy, quienes expresaron el gen de la proteína de cubierta viral (CP) de TMV (*Tobacco mosaic virus*) en plantas de tabaco, permitió obtener resistencia a la infección viral (Abel *et al.*, 1986). A partir de estos resultados, se han generado una gran variedad de plantas transgénicas que expresan diferentes proteínas virales (proteína de la cápside, proteína de movimiento, replicasa, etc.) capaces de resistir la infección con el virus homólogo (Anderson *et al.*, 1992, Lapidot *et al.* 1993, Baulcombe, 1994, 1996; Lomonossoff, 1995, Palukaitis y Zaitlin, 1997). En estos casos, la PDR es conocida como resistencia mediada por proteína. Por otro lado, se ha descrito resistencia a la infección viral mediada por RNA, reportada primero por Lindbo *et al.*, 1993, basada en el silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS, por *Post-Transcriptional Gene Silencing*) (Goldbach *et al.* 2003, Prins, 2003, Ritzenthaler, 2005). En plantas, el PTGS, funciona como un sistema de defensa antiviral y plantas transgénicas capaces de inducir dicho mecanismo ante la infección viral han sido desarrolladas a fin de obtener resistencia al patógeno. De hecho, se ha reportado correlación entre PTGS del transgén y resistencia a virus en algunas plantas transgénicas (Kalantidis *et al.* 2002, Scorza *et al.* 2001, Fagoaga *et al.* 2006).

En cítricos, la transformación biológica empleando *Agrobacterium tumefaciens* ha sido utilizada con éxito en una cantidad considerable de especies, entre las que se incluye *Citrus sinensis* (naranja dulce Pineapple) (Peña *et al.*, 1995b, Cervera *et al.*, 1998a, Bond y Rose, 1998), la cual es una de las especies más cultivada en Argentina como a nivel mundial, siendo muy apreciada por su alta calidad de zumo. Asimismo, estos avances en la transformación de cítricos han permitido generar resistencia a *Citrus tristeza virus* (CTV) mediada por PDR (Domínguez *et al.*, 2002, Fagoaga *et al.*, 2006).

A fin de lograr PDR aplicada al cítrico contra CPsV se obtuvieron 51 líneas transgénicas de naranja dulce Pineapple que expresan los ORF 24K, 48K o 54K de

CPsV. Trece de estas líneas se desafiaron usando el aislado de CPsV del cual deriva el transgén. En los siguientes apartados se detallan los resultados obtenidos.

I. Obtención de líneas transgénicas 24K, 48K y 54K de naranjo dulce Pineapple

Como se describió en el capítulo 1, se obtuvieron plásmidos binarios conteniendo el *cassette* de expresión para el ORF 24K, el ORF 48K y el ORF 54K. Dichas construcciones fueron introducidas en *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, las que fueron utilizadas para la transformación de *Citrus sinensis* (naranjo dulce Pineapple). La técnica utilizada para realizar la transformación y regeneración de entrenudos de cítricos fue la reportada previamente por Peña et. al., 1995b (ver Materiales y Métodos).

I. A. Transformación de explantos y regeneración selectiva

Se transformaron segmentos internodales de naranjo dulce Pineapple utilizando cultivos de los clones de *A. tumefaciens* EHA 105 que contienen los plásmidos binarios:

1. p35SGUSINT (utilizado como control)
2. p35SGUSINT-48K
3. p35SGUSINT-54K

Estas construcciones poseen el gen de selección *nptII* que codifica para la neomicina fosfotransferasa confiriéndole resistencia a Kanamicina (Kn) y el gen reportero *uidAint* que expresa la proteína beta-glucuronidasa (GUS) bajo el promotor 35S de CaMV.

4. pBIN19sgfp (utilizado como control)
5. pBIN19sgfp-48K
6. pBIN19sgfp-24K

Estos plásmidos, además del gen para la selección con Kn, contiene el gen reportero *sgfp* que expresa la "*green fluorescent protein*" (GFP) bajo el promotor 35S del CaMV.

Los segmentos internodales transformados fueron cultivados en medio Murashige and Skoog suplementado con las hormonas vegetales y los antibióticos adecuados para permitir la regeneración de brotes presuntamente transgénicos (Figura 1 A-D). La metodología usada se describe en Materiales y Métodos, al igual que las dificultades técnicas encontradas durante los experimentos de transformación.

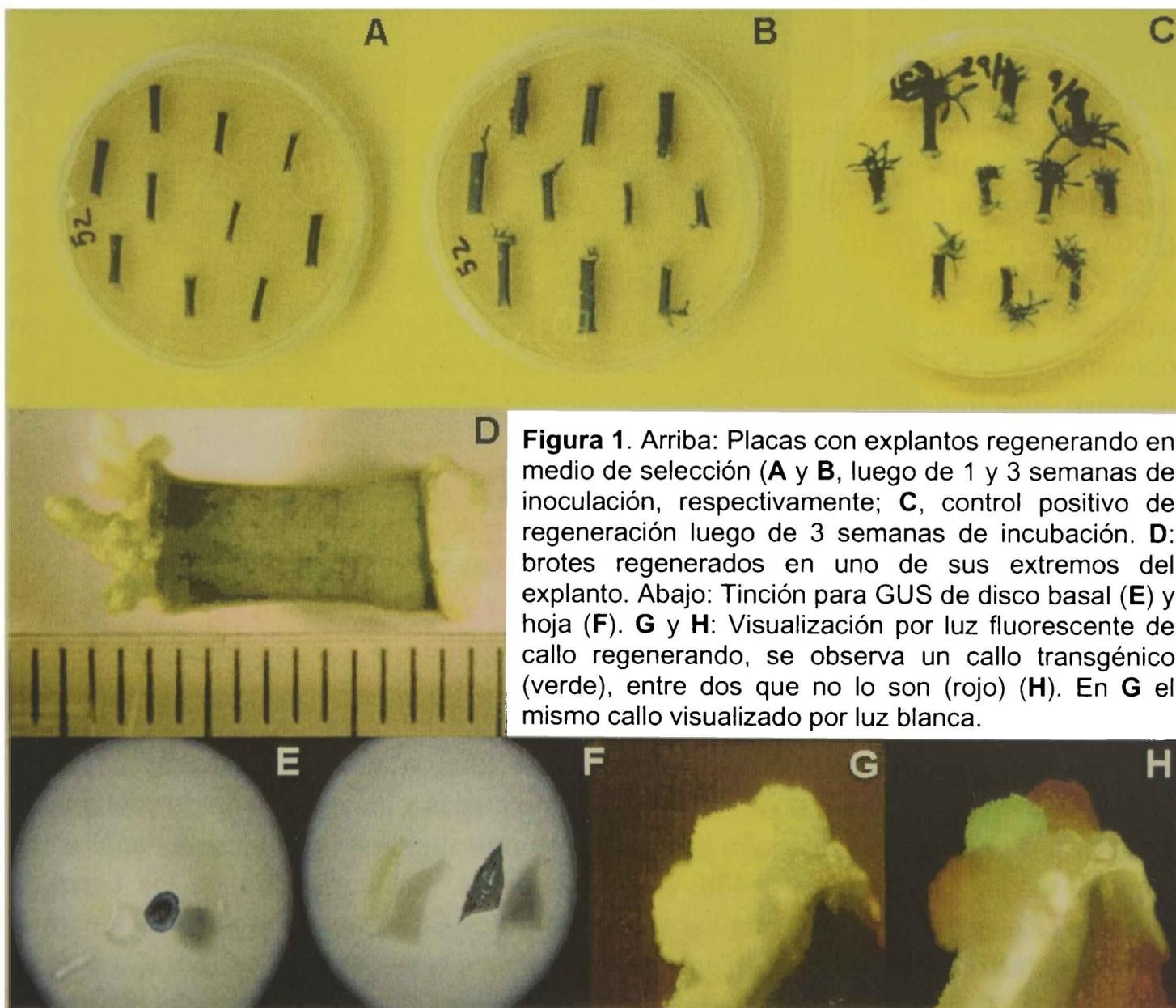
I. B. Selección de brotes transgénicos

La selección de brotes transformados resulta, en ocasiones, poco eficiente ya que puede existir inactivación del agente de selección por las células transformadas y persistencia de *Agrobacterium* en los explantos, lo cual permite la regeneración de brotes no transformados (denominados "escapes") (Petri y Burgos, 2005).

En cítricos se ha reportado alta frecuencia de regeneración de escapes y brotes quiméricos los cuales provienen de tejidos transformados y no transformados (Peña et al.,

1995a, Gutiérrez *et al.*, 1997). En algunos casos esta alta frecuencia de regeneración se vuelve un problema y el aumento de la concentración del agente de selección puede no ser la solución, dado que, a veces, provoca la inhibición de la proliferación celular. Por lo cual, una alternativa es el uso de genes marcadores, los cuales permiten la selección visual de los eventos transformantes luego de la aplicación del agente de selección. En cítricos esta alternativa ha sido utilizada generando plantas transgénicas que expresan los genes marcadores *uidA* (GUS) (Peña *et al.*, 1995a) o *sgfp* (GFP) (Ghorbel *et al.*, 1999), además del gen de selección, lo cual ha permitido aumentar la eficiencia de transformación.

Así, durante el proceso de obtención de las líneas transgénicas conteniendo genes de CPsV, además de la presión de selección por la presencia de Kn en el medio de regeneración, se ha realizado la selección de los brotes por reacción histoquímica para GUS o detección de fluorescencia por iluminación UV (GFP) (Figura 1 A-D), según el plásmido utilizado para la transformación (ver Materiales y Métodos). Una vez seleccionados visualmente los eventos transgénicos fueron injertados *in vitro* sobre un pie etiolado de Citrange Troyer (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) (Figura 2 A-B), como se describe en Materiales y Métodos. En general, entre un 95 a 100% de los eventos injertados resultaron viables luego de la realización del injerto *in vitro*.



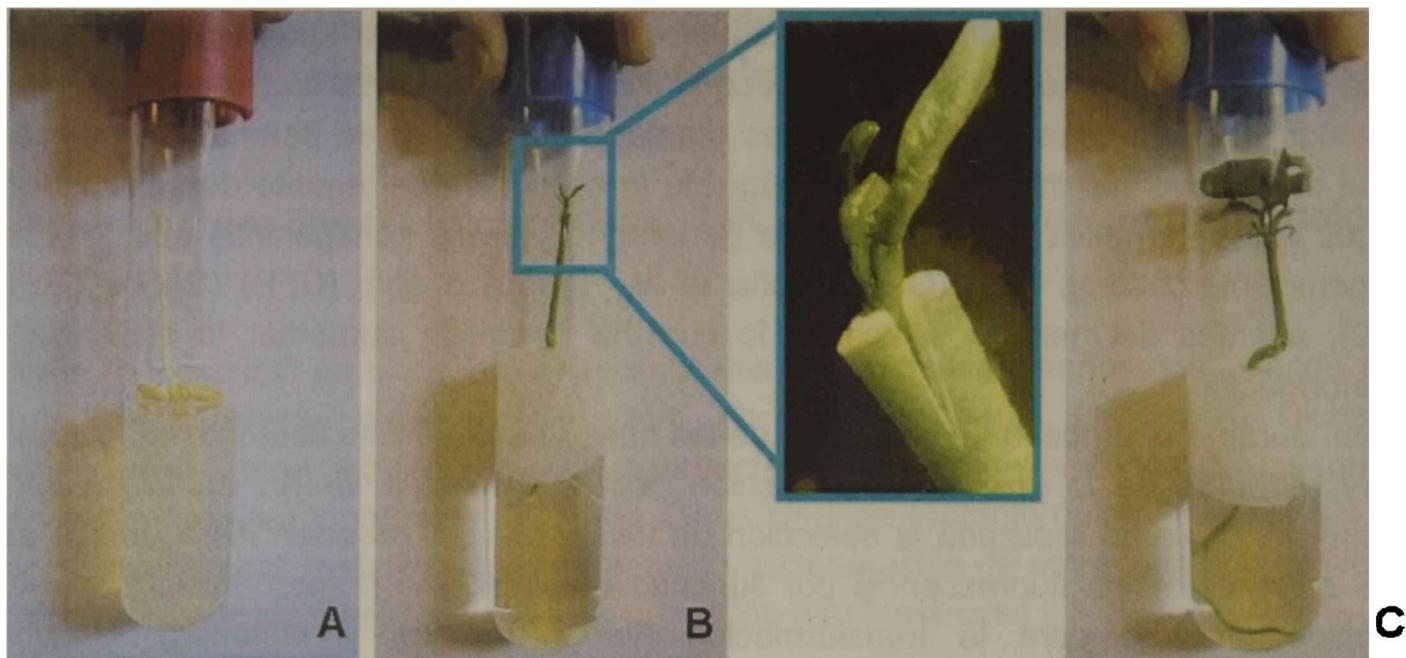


Figura 2. Plántula etiolada de *Citrangle troyer* desarrollada *in vitro* (A). Injerto *in vitro* de brote transgénico sobre pie etiolado de *Citrangle troyer* una semana después de realizado el injerto, a la derecha se muestra el detalle de la unión entre el brote transgénico y el pie (B). Plántula establecida *in vitro* luego de tres semanas de realizado el injerto (C).

I.B.1) Análisis de la presencia de quimeras

A partir de los experimentos realizados para la obtención de las líneas 48K y 54K (4 experimentos de transformación usando aproximadamente 400 explantos por experimento), se han calculado las frecuencias de regeneración según Domínguez *et al.* (2004), que considera las frecuencias de regeneración de brotes transgénicos, quimeras y escapes como el promedio \pm la desviación estándar de brotes regenerantes mostrando expresión positiva, parcial o negativa de GUS, respectivamente. En este trabajo se han obtenido $12 \pm 5,2\%$ de aparición de brotes GUS positivos, $78,9 \pm 7,1\%$ brotes GUS negativo, mientras que la presencia de quimeras representó un $9 \pm 3\%$. Domínguez *et al.* (2004) también reportó una alta proporción de quimeras (12%) cuando se realiza la transformación de lima mexicana y Citrange troyer mediante *A. tumefaciens*, encontrando que derivan no solo del resultado de la fusión de eventos transgénicos y no transgénicos, sino que pueden derivar de la convergencia de diferentes eventos de transformación.

I.B.2) Análisis de la integración del transgén mediante PCR

Luego de dos o tres semanas después de realizar el injerto, cuando las plántulas desarrollaron sus primeras hojas, se aplicó la técnica de PCR utilizando *primers* específicos al DNA extraído de tejido foliar (ver Materiales y Métodos) a fin de confirmar la presencia de los genes virales. En la Figura 3 se muestran los resultados del análisis de algunas de las plántulas 24K, 48K y 54K obtenidas. En la mayoría de los casos la amplificación resultó positiva, con excepción de 10 de 38 plántulas regeneradas para la transformación de 48K y 6 de 27 plántulas para la transformación de 54K (por ejemplo, en la Figura 3, líneas 7, 10 y 17). En dichas muestras la amplificación del fragmento específico para el gen resultó negativa aún cuando las plántulas resultaron positivas para

el gen marcador. Esto podría deberse a la estrategia de clonado utilizada. Como se indica en los paneles A de las figuras 4 y 5, en dichas construcciones, el *cassette* de expresión se insertó en el sitio único de clonado disponible, ubicado adyacente al borde izquierdo (BI) del T-DNA contenido en el plásmido binario. La frecuencia de transformación suele verse afectada por la longitud del T-DNA dando como resultado, en ocasiones, integraciones de fragmentos parciales del DNA a transferir (Domínguez *et al.* 2000). Dada la ubicación del *cassette* de expresión en el T-DNA, las integraciones parciales podrían llevar a la pérdida de inserción del ORF para las proteínas 48K o 54K, y por consiguiente, algunos de los eventos podrán contener solamente el gen marcador y el de selección insertados en el genoma de la planta transformada.

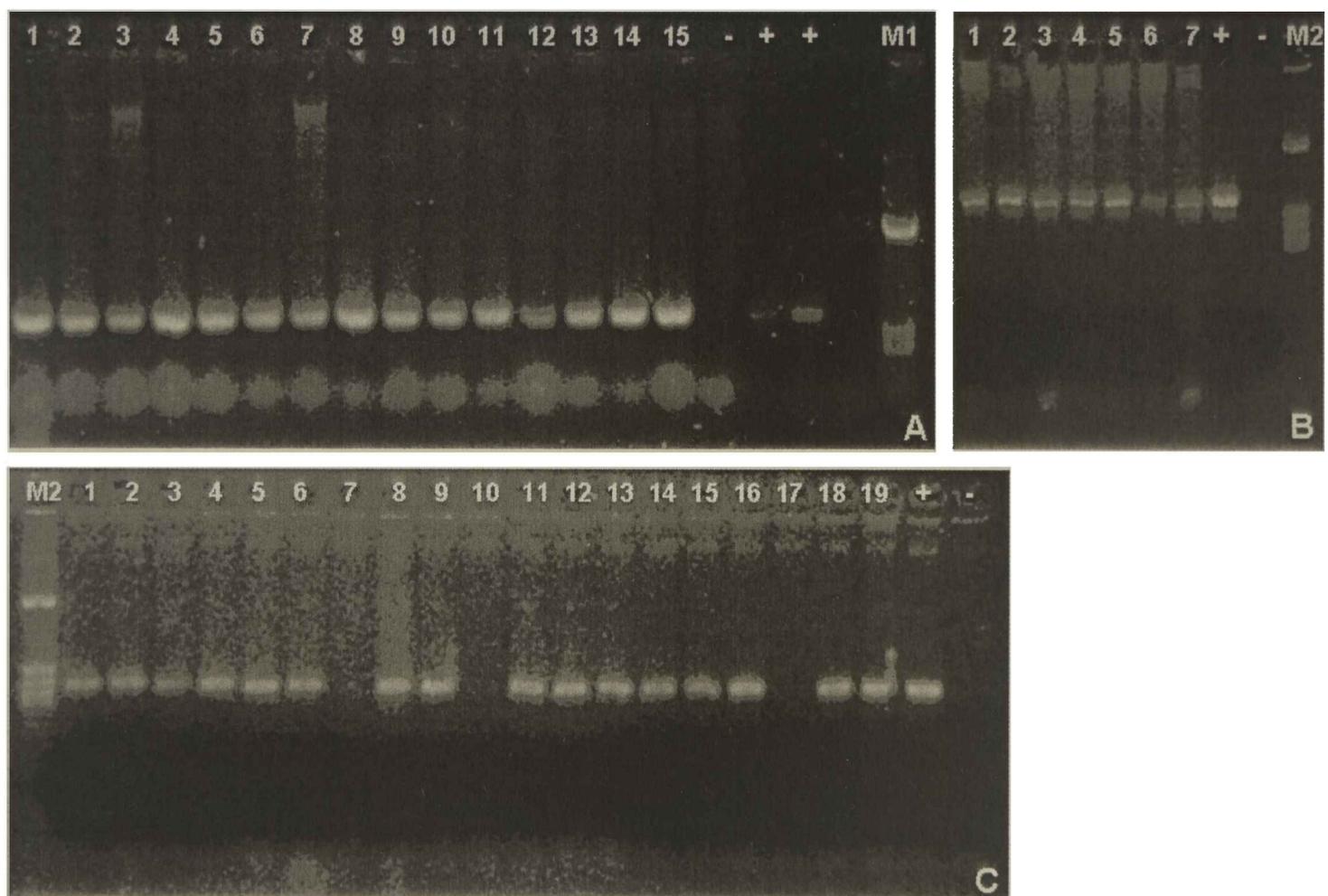


Figura 3. Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR del ORF 24K de líneas 24K (A) utilizando los *primers* 24Kdir y 24krev, del ORF 48K de líneas 48K (B) utilizando los *primers* CPV1 y CPV2 y del ORF 54K de líneas 54K (C) utilizando los *primers* A y B. M1, marcador de peso molecular en pb (1898, 540, 409). M2, marcador de peso molecular en pb (1129, 517, 453, 396, 356).

Las plántulas que resultaron positivas para el transgén viral fueron enviadas a la Estación Experimental del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Concordia, Entre Ríos donde se injertaron sobre un pie de Limón Rugoso de 6 a 8 meses de edad (Figura 4A y B), trabajo realizado por la Ing. Norma Costa y la Biol. María Inés Plata.

La eficiencia de transformación (definida como el número de líneas transgénicas establecidas en el invernáculo por número de explantos inoculados por 100) varió entre 3,3 y 4,5. Estos valores fueron menores a los reportados por Peña *et al.*, 1995a (eficiencia de alrededor del 8% cuando se transforma naranjo dulce Pineapple).

Domínguez *et al.* (2000) ha reportado similares diferencias (dos a tres veces menor) con los valores obtenidos por Peña *et al.*, (1997) en la transformación de lima mexicana. Esta discrepancia en las eficiencias puede deberse a que en el presente trabajo, se transfiere un T-DNA de mayor tamaño (el plásmido binario utilizado posee 3 *cassette* de expresión: *uidA* o *sgfp*, *nptII* y ORF-CPsV), así como Domínguez, el cual utiliza un plásmido binario conteniendo, además del gen marcador *uidA* y el gen de resistencia *nptII*, un *cassette* para expresar la proteína de la cápside (p25) de *Citrus Tristeza Virus* (CTV). En cambio, Peña reportó la eficiencia utilizando un T-DNA con dos *cassette* de expresión (*uidA* y *nptII*) tanto para la transformación de naranjo dulce como para lima mexicana.

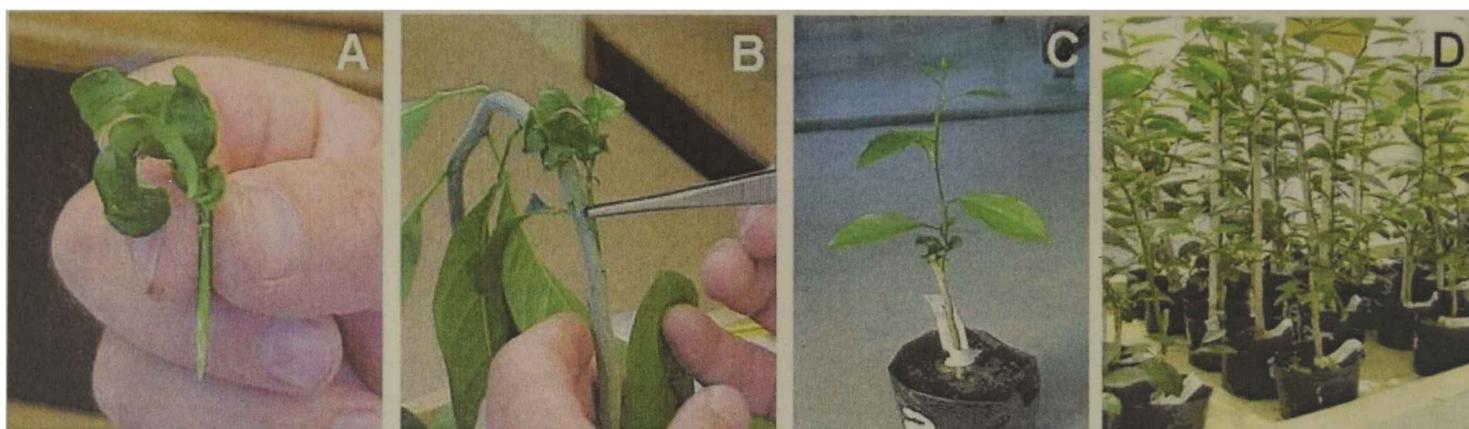


Figura 4. Injerto en bisel de líneas transgénicas sobre plantines de Limón rugoso de 6 meses (A y B). Desarrollo del injerto en una línea transgénica tres meses después de ser injertada (C). Líneas transgénicas establecidas en el invernáculo (D).

I. C Plantas transgénicas establecidas en el invernáculo

En total, se obtuvieron 14 plantas transgénicas 48K-GUS, 7 plantas 48K-GFP 15 plantas 24K-GFP y 15 plantas 54K-GUS. Como controles se establecieron en el invernáculo 11 plantas GUS y 13 plantas GFP. Además se obtuvieron 3 plantas como controles de regeneración (1-control, 2-control y 3-control), provenientes de entrenudos de naranjo dulce que sufrieron todo el proceso de regeneración pero obviando la incubación con el cultivo de *A. tumefaciens*. Todas las plantas transformadas con el gen marcador *sgfp* fueron obtenidas durante una pasantía realizada en el IVIA, Valencia, España, bajo la supervisión del Dr. Leandro Peña, durante los meses de Abril y Mayo del 2002.

El fenotipo de las plántulas obtenidas fue indistinguible de los controles de regeneración y de plantas no transgénicas, para todas las líneas desarrolladas (24K, 54K, 48K, GUS y GFP) (Figura 4 C y D), las cuales crecen normalmente en el invernadero. Mas aún, en colaboración con el Dr. Elliot W. Kitajima se han realizado cortes histológicos de líneas transgénicas 48K observando al microscopio electrónico el estado de las células que expresan la proteína CP sin encontrarse ningún efecto citopático (datos no mostrados).

Se ha reportado la obtención de limas transgénicas que expresan la proteína p23 de *Citrus tristeza virus* (CTV) que presentan síntomas idénticos a los observados en limas infectadas con el virus, por lo cual dicha proteína estaría involucrada en el desarrollo de síntomas y la patogénesis en su huésped natural (Ghorbel *et al.*, 2001b). También se han reportado efectos similares en otras plantas transgénicas donde la expresión de proteínas virales con funciones de movimiento, replicación, de cubierta viral, etc, ha generado síntomas similares a los producidos por la partícula viral (Baughman *et al.*, 1988; van der Wilk *et al.*, 1997; Pascal *et al.*, 1993; Duan *et al.*, 1997). Posteriormente, se determinó que muchas de estas proteínas estaban implicadas en la supresión del mecanismo de defensa contra patógenos virales, PTGS (revisado en Voinnet, 2005). Sin embargo, en el caso de las plantas que expresan cada uno de los ORF 24K, 48K y 54K de CPsV no se han observado efectos citopáticos, por lo cual, la expresión de cada proteína por separado y en la cantidad en que se expresan, no es suficiente para la manifestación de síntomas de psorosis.

II. Caracterización molecular de las líneas transgénicas obtenidas

Una vez establecidas las plántulas en el invernadero se inició la caracterización de 9 líneas 48K, 10 líneas 24K y 10 líneas 54K. Las metodologías aplicadas para el análisis de las líneas se detallan en Materiales y Métodos.

II. A. Análisis de la integridad y el número de copias del cassette de expresión en líneas transgénicas 24K, 48K y 54K

Con el objetivo de confirmar la integridad del cassette de expresión y estimar el número de copias introducidas de las líneas 24K, 48K y 54K se aplicó la técnica de *Southern blot*. Para ello se efectuaron extracciones del DNA genómico de material foliar, el cual fue digerido con enzimas de restricción adecuadas para liberar el ORF presente en el T-DNA introducido (determinación de la integridad del transgén) o con un sitio único de corte en dicho T-DNA (determinación del número de copias). En este último caso, las digestiones revelan uno o varios fragmentos que comprenden una parte del T-DNA introducido y una parte de DNA del cítrico, variando la longitud de los mismos de acuerdo a la localización del cassette en el genoma de la planta y, por consiguiente, la distancia entre el sitio de restricción en el T-DNA y el sitio más próximo localizado en el DNA nuclear. El número de copias deducido de las bandas obtenidas en el *Southern blot* representa el número mínimo de fragmentos de T-DNA integrados. El DNA digerido se analizó utilizando como sonda un fragmento del gen introducido amplificado por PCR y marcado con DIG-11-dUTP, excepto para la determinación de la integración del ORF 48K donde se utilizó una sonda marcada con $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP (ver Materiales y Métodos). En los siguientes apartados se describen los resultados obtenidos.

II. A. 1) Integridad del transgén

El DNA genómico de líneas transgénicas 48K fue digerido con *EcoRI* y posteriormente hibridado con sonda específica para el ORF 48K (sonda cp, fragmento amplificado con los *primers* CPV1 y CPV2). Como se observa en la Figura 5B, se confirmó la integración de al menos una copia intacta del *cassette* para cada línea transgénica analizada observándose un fragmento del tamaño esperado para el *cassette* de expresión 48k (2,44 kb).

En el caso de las plántulas transgénicas 24K y 54K, el DNA extraído fue sujeto a digestión con *HindIII*. La hibridación se realizó utilizando las sondas 24K (fragmento amplificado con los *primers* 24dir y 24rev) y 54K (fragmento amplificado con los *primers* B y 54krev) respectivamente. Como se esperaba, las líneas 24K presentaron un fragmento de 1,73 kb confirmando su integridad (Figura 6B). En un solo caso se observó un fragmento mayor además del fragmento del tamaño previsto cuando se realizó la digestión del DNA genómico de la línea 18–24K con *HindIII* (Ver Figura 6B) que podría sugerir la presencia de rearrreglos en el *cassette* 24K presente en esta línea transgénica.

Asimismo, en las líneas 54K se constató la integridad del *cassette* de expresión por presencia del fragmento de 2,56 kb, tamaño previsto para la digestión del DNA genómico con *EcoRI* (Figuras 7B).

II. A. 2) Número de copias del transgén

El DNA de planta fue digerido con una enzima conteniendo un sitio único de restricción en el T-DNA a fin de determinar el número de copias del transgén introducido, utilizando *HindIII* para el *cassette* 48K y 54K y *EcoRI* para el *cassette* 24K, aunque en este último caso posee un sitio adicional de corte que genera una banda de 1150 pb presente en todas las hibridaciones (ver esquema A, Figura 6). Para las digestiones realizadas sobre el material extraído de líneas 54K, dentro del *cassette* de expresión existen varios sitios de corte para dicha enzima, como se indica en el esquema A de la Figura 7. De acuerdo a la localización de la sonda utilizada se puede determinar el número de copias del transgén 54K.

La figura 5C muestra los resultados obtenidos en el análisis de las líneas transgénicas 48K donde se observa 1 copia (líneas 1, 18, 20, 21, 28, 29 y 34), 2 copias (línea 96) y 3 copias (línea 23) integradas del transgén.

Como se observa en la Figura 6C, en las líneas transgénicas 24K también se encontraron entre 1 (líneas 3, 6, 8, 17, 19 y 20) y 3 copias (línea 12). Las líneas 9, 16, 18 presentaron 2 copias integradas del transgén.

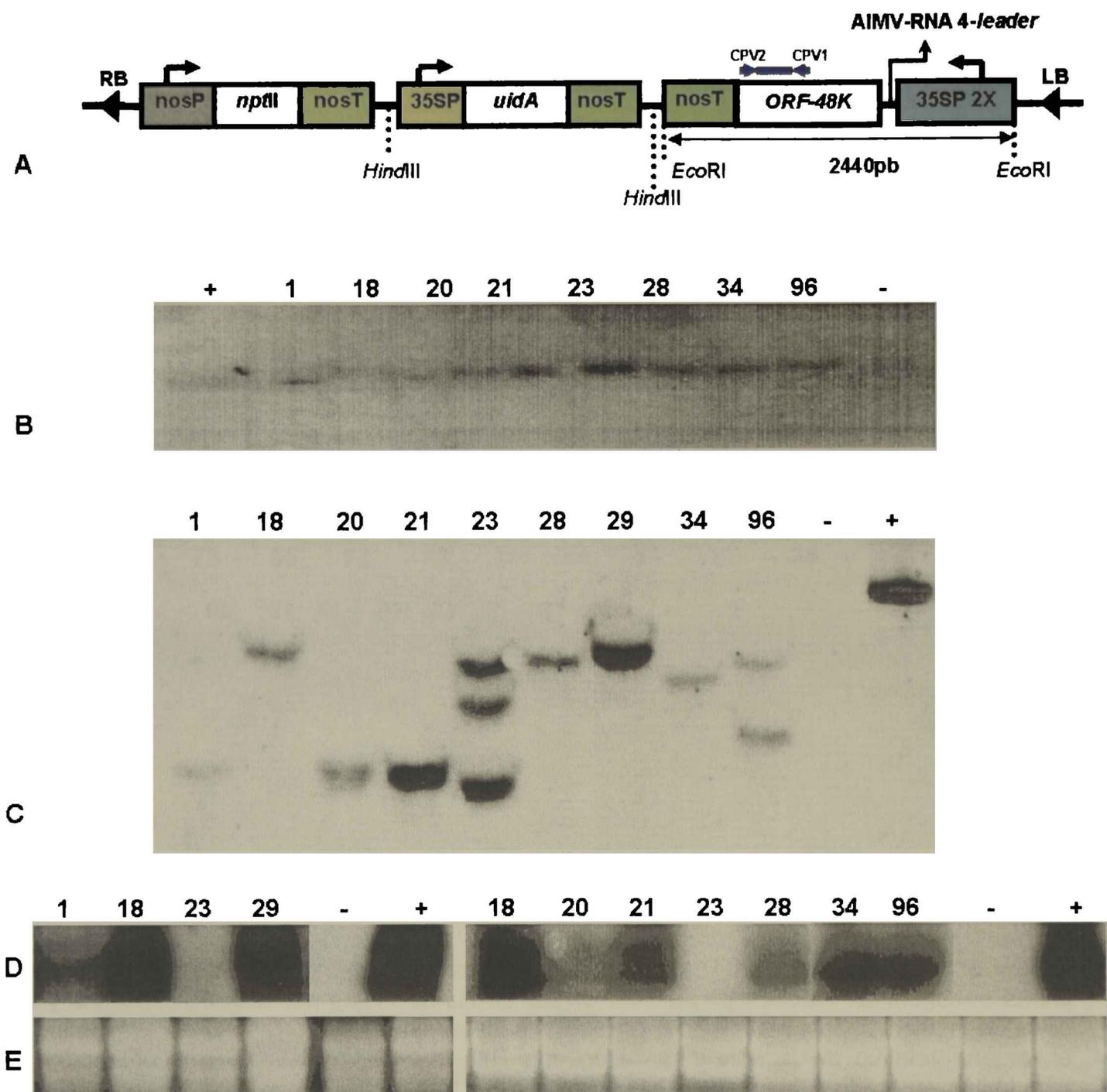


Figura 5. A. Diagrama del T-DNA del plásmido binario p35SGUSINT-48K introducido en las líneas transgénicas 48K. La orientación de los genes se indica por medio de flechas y los sitios de restricción para las enzimas *EcoRI* y *HindIII* por líneas verticales punteadas. Se indica el tamaño relativo de la sonda utilizada y el producto de hibridación esperado. **B.** Análisis de la integridad del transgén 48K mediante *Southern blot* de DNA total extraído de las líneas transgénicas 1, 18, 20, 21, 23, 28, 29, 34 y 96 digerido con *EcoRI*, la cual libera el ORF 48K completo. **C.** DNA total extraído de las mismas líneas transgénicas digerido con *HindIII* mostrando el número de copias del transgén. **D.** *Northern blot* de RNA total extraído de las líneas transgénicas 48K (1, 18, 20, 21, 23, 28, 29, 34 y 96) revelado con el fragmento de DNA marcado con $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP (sonda CPV1-CPV2). **E.** RNA total extraído de las plantas transgénicas revelado con Bromuro de etidio después de la electroforesis para comparar las cantidades de RNA extraído.

Las líneas conteniendo el *cassette* 54K mostraron entre 1 y 4 copias (Figura 7C). Se observó 1 copia en las líneas 34, 41 y 55; 2 copias en las líneas 5, 22, 70 y 73; 3 copias en las líneas 35 y 66, y 4 copias en la línea 63.

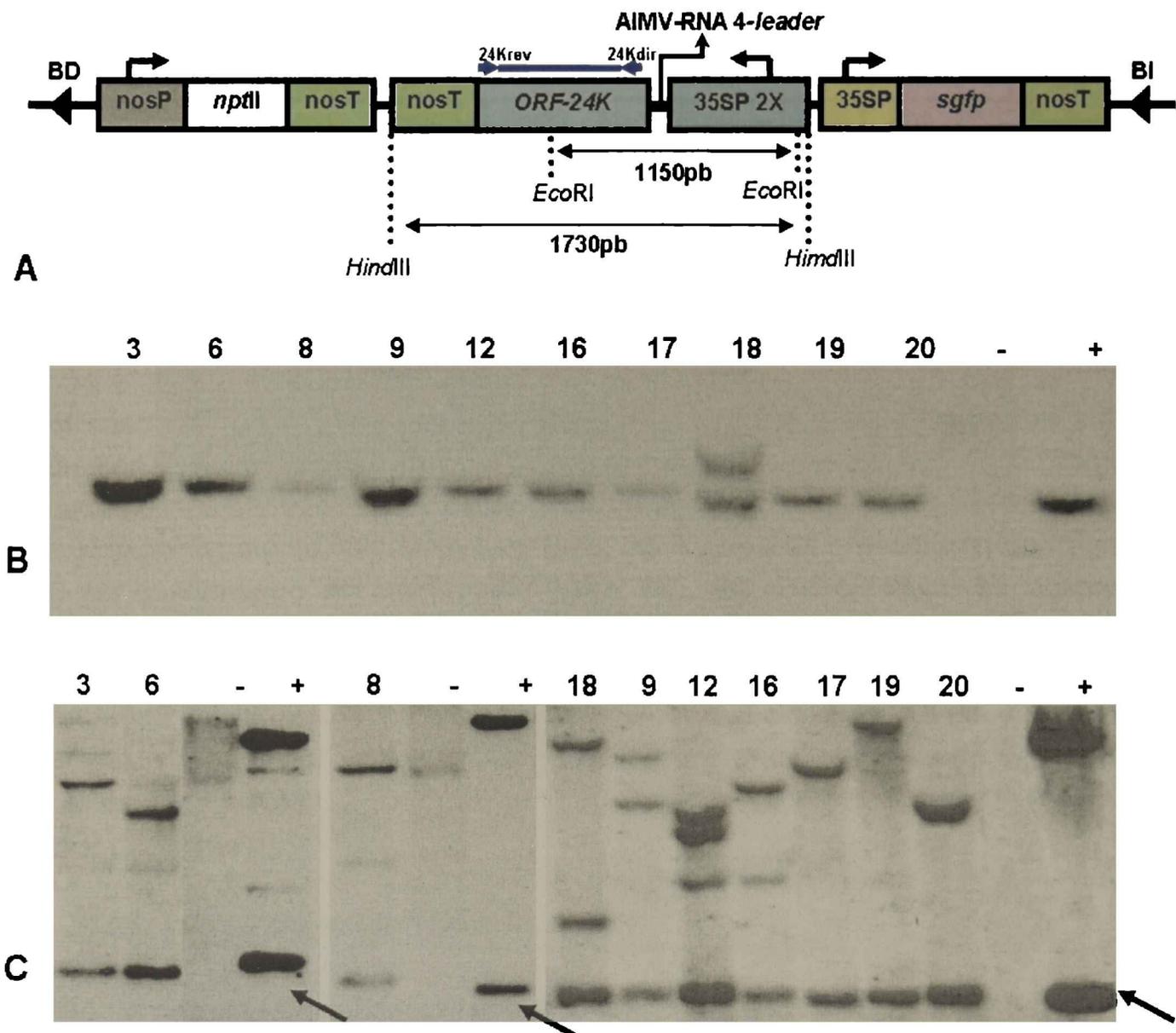


Figura 6. A. Diagrama del T-DNA del plásmido binario pBIN19sgfp-24K introducido en las líneas transgénicas 24K. La orientación de los genes se indica por medio de flechas y los sitios de restricción para las enzimas *EcoRI* y *HindIII* por líneas verticales punteadas. Se indica el tamaño relativo de la sonda marcada con DIG-11-dUTP utilizada y los productos de hibridación esperados. **B.** Análisis de la integridad del transgén 24K mediante *Southern blot* de DNA total extraído de las líneas transgénicas 3, 6, 8, 9, 12, 16, 17, 18, 19 y 20 digerido con *HindIII*, la cual libera el ORF 24K completo. **C.** DNA total extraído de las mismas líneas transgénicas digerido con *EcoRI* mostrando el número de copias del transgén. Las flechas indican la banda accesoria de 1150pb liberada por la digestión de la enzima y revelada por la sonda.

II. B. Análisis de la expresión del RNA mensajero en las líneas transgénicas 24K, 48K y 54K mediante *Northern blot* o RT-PCR

II. B. 1) *Northern blot* aplicado al análisis de las líneas transgénicas 48K

Se determinó la expresión del RNA mensajero de las líneas transgénicas 48K partiendo de extracción de RNA total de material foliar (por el método desarrollado por Bekesiova *et. al* 1999, descrito en Materiales y Métodos), utilizando como sonda el fragmento de amplificación del gen 48k (*primers* CPV1 y CPV2) marcado con $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP mediante la técnica de *Northern blot*. Los niveles de expresión de RNA mensajero que presentaron las diferentes líneas analizadas fueron variables. En general, las líneas 18,

20, 21, 29, 34 y 96 presentaron mayor expresión que las líneas 1, 23 y 28, como lo indica la Figura 5 D, donde se muestran dos *Northern blots* revelando diferentes niveles de expresión en los transcritos 48k entre las líneas analizadas. La cantidad de RNA total analizado es comparable entre las muestras (medido por la cantidad de RNA ribosomal como lo indica el panel E de la Figura 5).

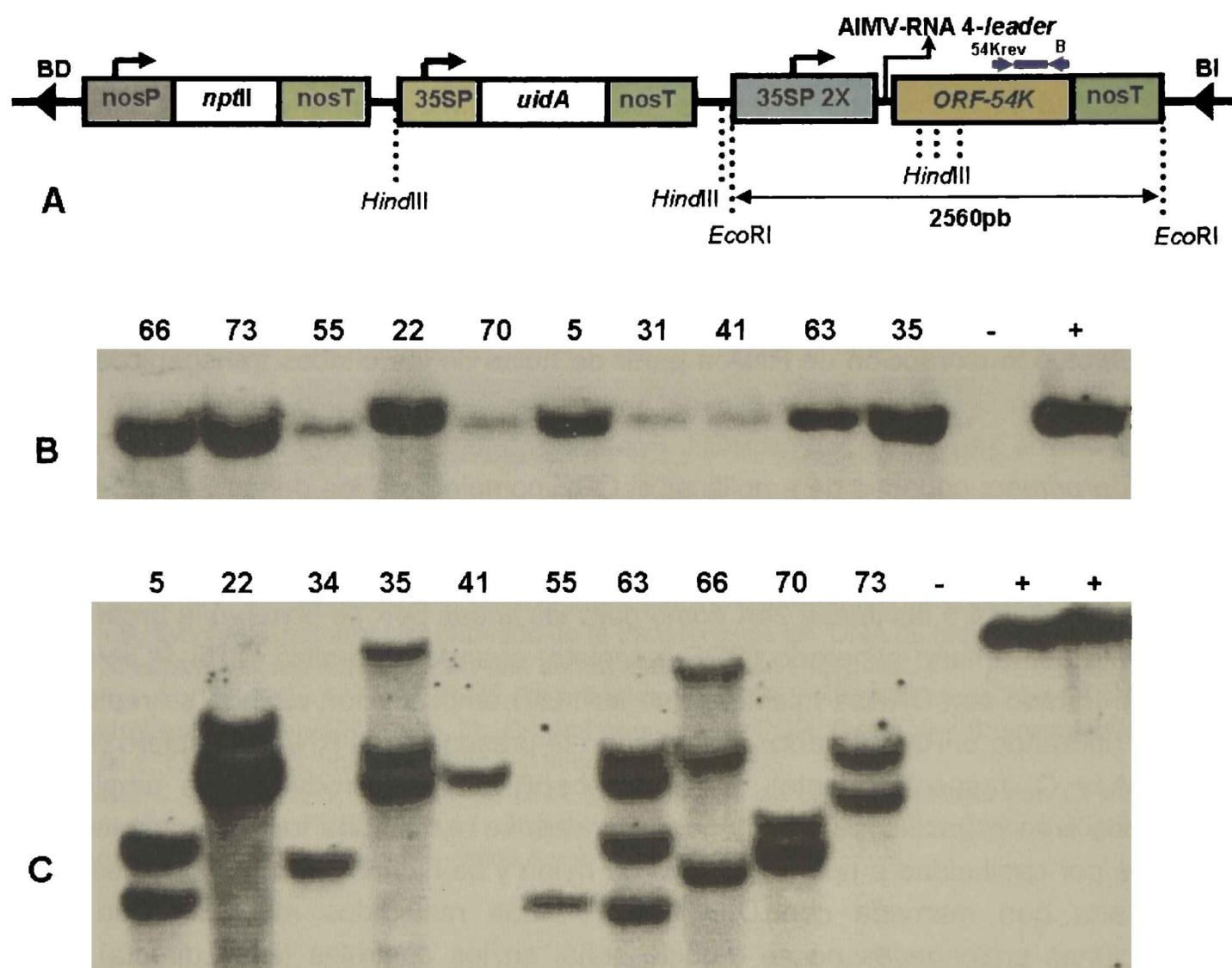


Figura 7. A. Diagrama del T-DNA del plásmido binario p35SGUSINT-54K introducido en las líneas transgénicas 54K. La orientación de los genes se indica por medio de flechas y los sitios de restricción para las enzimas *EcoRI* y *HindIII* por líneas verticales punteadas. Se indica el tamaño relativo de la sonda marcada con DIG-11-dUTP utilizada y el producto de hibridación esperado. **B,** Análisis de la integridad del transgén 54K mediante *Southern blot* de DNA total extraído para las líneas transgénicas 5, 22, 34, 35, 41, 55, 63, 66, 70 y 73 digerido con *EcoRI*, la cual libera el ORF 54K completo. **C,** DNA total extraído de las mismas líneas transgénicas digerido con *HindIII* mostrando el número de copia del transgén.

No existe correlación entre los niveles de RNA mensajero del gen *cp* y el número de copias en las nueve líneas transgénicas 48K. Por ejemplo, las líneas 34 y 96 expresan similar cantidad de RNA mensajero pero contienen diferente número de copias (1 y 2 copias, respectivamente). Mas aún, en el caso de la línea 23, que contiene 3 copias del transgén, no se detectó el mRNA en 2 de 3 *Northern blots* realizados presentando uno de ellos una banda muy tenue, como puede observarse en la Figura 5D.

II. B. 2) RT-PCR aplicada al análisis de las líneas transgénicas 24k y 54k

Cuando se analizaron las líneas transgénicas 24K y 54K por *Northern blot* utilizando sondas radiactivas específicas para los respectivos RNAs mensajeros no reveló resultados positivos debido, probablemente, a la falta o a la baja concentración de estos en los extractos de RNA total. Por ello, se aplicó una técnica que tuviera un nivel de sensibilidad mayor al *Northern blot* a fin de confirmar la presencia e integridad de los RNAs transcriptos expresados del *cassette* 24K y el 54K.

Se realizó RT-PCR para 4 de las líneas 24K transgénicas y otras 4 líneas 54K obtenidas. Dichas líneas fueron seleccionadas de acuerdo al número de copias del transgén determinado anteriormente. Las líneas 24K analizadas fueron las líneas 3 y 8 (1 copia), la línea 9 (2 copias) y la línea 12, que contiene 3 copias integradas del transgén. En el caso de cítricos transgénicos 54K se seleccionaron las líneas 41 (1 copia), 70 (2 copias), 35 (3 copias) y 63 (4 copias).

Se efectuó la extracción de RNA a partir de hojas de los cítricos transgénicos, el cual fue tratado con DNAsa a fin de eliminar trazas de DNA genómico que pudiera producir falsos positivos en la reacción de PCR. Posteriormente se realizó la reacción de RT-PCR utilizando *primers* capaces de amplificar el ORF completo de los genes *24k* o *54k* según correspondiera. Como control se realizó la reacción de amplificación (PCR directa) sobre el RNA vegetal tratado con DNAsa. El resultado de la electroforesis se muestra en la Figura 8. Tanto para las líneas 24K como para las líneas 54K se observó la presencia del fragmento del tamaño esperado (ORF completo) cuando se realizó la RT-PCR sobre el material tratado con DNAsa mientras que no hubo amplificación cuando se realizó PCR directa utilizando el RNA tratado, confirmando la presencia del RNA mensajero (Figura 8 panel A y C, respectivamente). Para corroborar que los productos de amplificación obtenidos eran específicos para los genes virales, se realizó una transferencia del gel de agarosa por capilaridad a una membrana de nylon y se hibridó con una sonda específica para cada gen marcada con DIG-11-dUTP. Los resultados muestran que aún a exposiciones prolongadas no se detecta señal en los controles (PCR directa), siendo específica la señal obtenida para las muestras tratadas con DNAsa y sujetas a RT-PCR (Figura 8 B y D). Así, se confirmó la presencia y la integridad de los RNAs transcriptos en las 8 líneas transgénicas 24K y 54K analizadas.

II. C. Análisis de la expresión de las proteínas 24K, 48K y 54K en los cítricos transgénicos

II. C. 1) Análisis de las líneas transgénicas 48K aplicando el TAS-ELISA- HRP

A fin de detectar y determinar la integridad de la proteína de cubierta expresada en las líneas transgénicas 48K se realizó *western blot* a partir de material foliar de dichas líneas. Se ensayaron todos los sueros disponibles desarrollados contra la proteína 48K de CPsV, los anticuerpos policlonales A322 (García *et al.*, 1997), A376 (obtenido por Piero Roggero) y el anticuerpo monoclonal 13C5 (IgG) (Alioto *et al.*, 1999). Ninguno de estos

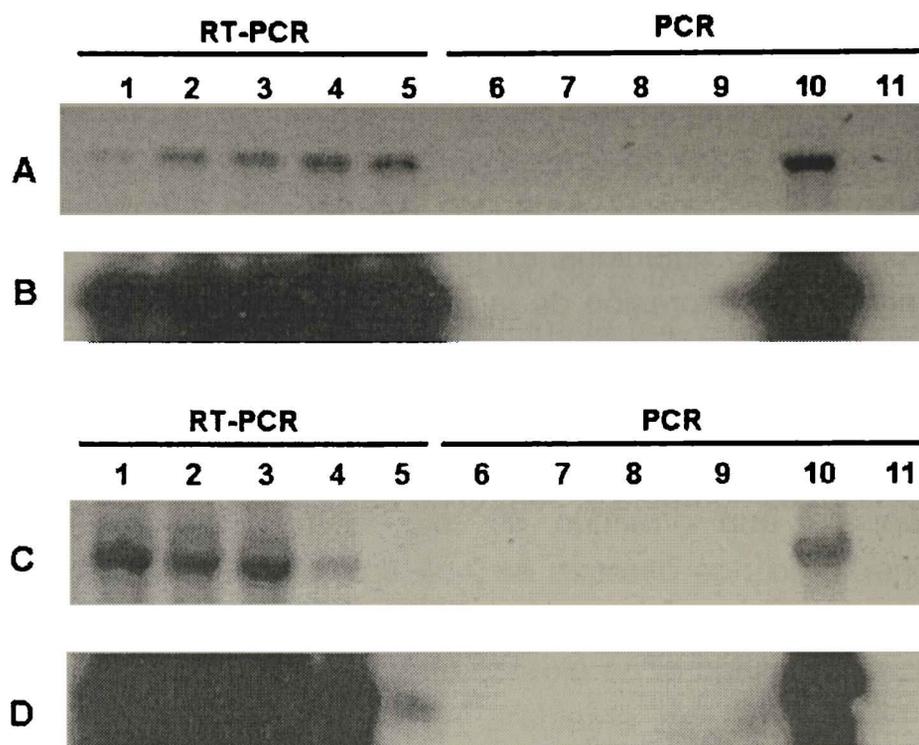


Figura 8. Análisis de los productos de RT-PCR utilizando como molde RNA total tratado con DNAsa extraído de líneas transgénicas 24K (3, 8, 9 y 12, Panel A y B) y líneas transgénicas 54K (35, 41, 63 y 70, Panel C y D).

En el panel A y C se muestra la electroforesis (tinción con bromuro de etidio) y en el panel B y D el resultado del *Southern blot* obtenido de la transferencia del DNA de las electroforesis de A y C. El *Southern blot* fue revelado con una sonda marcada con DIG-11-dUTP.

Panel A y B: Calle 1: RT-PCR de RNA total extraído de cítrico infectado con CPsV. Calle 10: control positivo de PCR. Calle 11: Control negativo de PCR. Calles 2 y 6: línea 3, Calles 3 y 7: línea 8, calles 4 y 8: línea 9, calles 5 y 9: línea 12.

Panel C y D: Calle 5: RT-PCR de RNA total extraído de cítrico infectado con CPsV. Calle 10: control positivo de PCR. Calle 11: Control negativo de PCR. Calles 1 y 6: línea 35, Calles 2 y 7: línea 41, calles 3 y 8: línea 63, calles 4 y 9: línea 70.

sueros permitió detectar la proteína 48K, tanto en extracto de plantas infectadas (*C. quinoa* y cítrico) ni en extractos de las líneas transgénicas mediante *western blot*. Cuando se procedió a ensayar el anticuerpo policlonal 48K obtenido en la presente tesis con esta misma técnica, se pudo detectar la proteína en extractos de plantas herbáceas infectadas y en preparaciones parcialmente purificadas de partículas virales (ver Capítulo 4), pero no, en extractos de cítricos infectados o de plantas transgénicas 48K (datos no mostrados).

Dichos resultados imposibilitaban analizar la expresión de la proteína 48K en las plantas transgénicas mediante *western blot*, por lo tanto, se utilizó la técnica de ELISA triple sándwich (TAS-ELISA) usualmente aplicada al diagnóstico de psorosis en plantas de campo. Los primeros ensayos realizados utilizando este método no aportaron resultados positivos, posiblemente debido al bajo nivel de expresión presente en las líneas transgénicas. A fin de mejorar la sensibilidad de la técnica, se efectuaron modificaciones en las etapas finales del ensayo de ELISA, detalladas en el Capítulo 2 (TAS-ELISA-HRP).

Se realizaron entre 6 y 7 determinaciones independientes aplicando esta última técnica, en muestras extraídas de plantas madres (de alrededor de 1 año de edad), y durante el transcurso de 5 meses como también para material extraído de una planta de naranjo dulce Pineapple sana. En la figura 9 se muestran las densidades ópticas (DO) obtenidas. Debido a las variaciones de concentración de la proteína 48K en las líneas transgénicas evaluadas, para determinar si las diferencias encontradas entre las líneas y el control sano eran significativas, se aplicó la prueba de diferencias mínimas de Fisher (LSD) a los valores de DO obtenidos. En general, como previamente se indicó, las líneas poseen bajos niveles de expresión de la proteína 48K resultando muy por debajo de la expresión del cítrico infectado pero con diferencias significativas (líneas 18, 20, 21, 28, 29, 34 ($P < 0.01$) y para la línea 1 ($P < 0.05$)) cuando se comparan con los valores obtenidos para el 3-control. La excepción fueron las líneas 23 y 96, las cuales presentan un nivel de expresión comparable al control no transgénico.

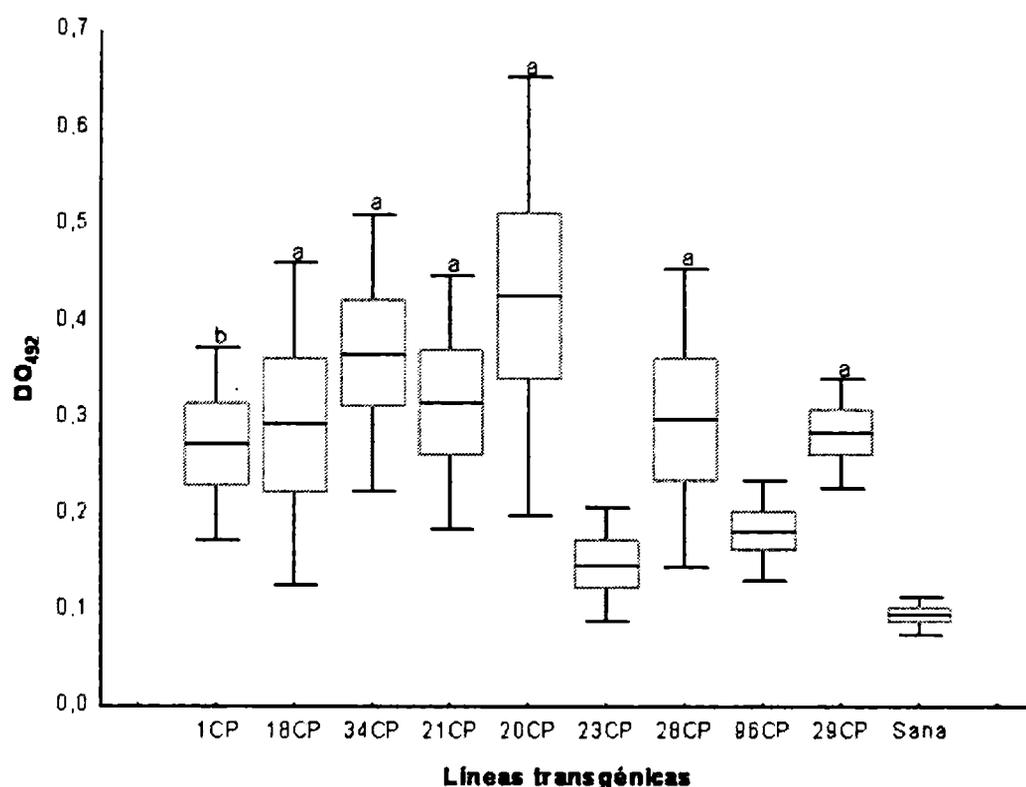


Figura 9. TAS-ELISA-HRP para la detección de la proteína de cubierta de CPsV en plantas de cítrico transgénicas. Los valores de DO se refieren al promedio de las densidades ópticas obtenidas de 6 a 7 determinaciones independientes. Las cajas amarillas representan la media \pm EEM (error estandar de la media) y las barras la media \pm DE (desviación estándar). Las diferencias en los valores de DO fueron analizadas mediante la prueba de diferencias mínimas de Fisher (LSD) :

a Representa diferencias significativas en el valor medio de DO comparado con la planta no transgénica (S), $P > 0.01$

b Representa diferencias significativas en el valor medio de DO comparado con la planta no transgénica (S), $P > 0.05$

En general, se ha observado algo de variabilidad en la expresión del transgén en el transcurso del análisis (5 meses de crecimiento). Esta variabilidad podría atribuirse al crecimiento simpodial del cítrico, donde la yema axilar reemplaza a la yema terminal una vez que esta finaliza su crecimiento, y por lo tanto, se alternan periodos de crecimiento activo con periodos de crecimiento lento, pudiendo existir variabilidad de la expresión del transgén. Por otro lado, sabiendo que la concentración de proteína en las muestras

analizadas se encuentra cerca del límite de detección del método, otra causa de dicha variabilidad en la expresión de la proteína 48K podría ser por variaciones debidas a la técnica de extracción de proteínas y/o debido a las condiciones fisiológicas de las plantas. Baja expresión del transgén también ha sido observada en cítricos transgénicos expresando la proteína p25 de CTV (Domínguez, *et al.* 2000) y en otras plantas transgénicas leñosas como vid, donde algunas líneas transformadas con el gen *cp* del *Grapevine fan-leaf virus* (GFLV), mostraron niveles no detectables de la proteína de cubierta mediante DAS-ELISA (Gambino *et al.*, 2005, Maghuly *et al.*, 2005).

Como se comentó anteriormente, la integridad de la proteína 48K de CPsV expresada en los cítricos transgénicos no pudo ser determinada por *Western blot* dado que el nivel de acumulación de proteína y la sensibilidad de la técnica con los sueros disponibles no fue suficiente. Sin embargo, la expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana* resultó en mayores niveles de acumulación que la expresión constitutiva en las plantas de cítricos (ver Capítulo 4). Mediante *Western blot* se confirmó que en las plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas, la proteína 48K se expresó con el tamaño esperado y sin detectarse otros productos de bajo peso molecular. Esto indica que la proteína CP se expresa completa a partir del transgén y es estable en la célula herbácea, por lo que su detección en cítrico podría deberse a un problema de sensibilidad de las técnicas disponibles.

De los resultados obtenidos para el número de copias del transgén analizado por *Southern blot*, el nivel de RNA mensajero y el nivel de proteína 48K, se puede inferir que no existe correlación entre dichos valores para cada una de las líneas analizadas. Sin embargo, en la línea 23 el nivel de expresión fue muy bajo, mostrando correlación con el nivel de RNA mensajero y siendo la línea que presentó mayor número de copias del transgén (tres copias) de las líneas transgénicas 48K evaluadas. Este punto se discute más adelante en este capítulo.

II. C. 2) *Análisis de las líneas transgénicas 24K y 54K aplicando ELISAS competitivos secuenciales*

El análisis mediante *Western blot* utilizando los sueros obtenidos en extractos de plantas transgénicas 54K o 24K no evidenció la presencia de dichas proteínas (ver Capítulo 2). Por lo tanto, se procedió al desarrollo de un ensayo que permitiera analizar la presencia de las proteínas 24K o 54K, aún en baja concentración (ELISA competitivo secuencial). En el Capítulo 2 se detallan las características de este inmunoensayo, junto con las condiciones utilizadas para el análisis del extracto proteico de tejido foliar de las líneas transgénicas 24K y 54K. A fin de unificar la cantidad de proteína presente en cada extracto analizado, cada muestra se cuantificó por el método de Bradford y se realizó el ensayo de competición colocando una concentración final de 500 ng ml⁻¹ (ver Capítulo 2). Los resultados obtenidos para las líneas 24K y 54K se detallan en las Figuras 10 y 11, respectivamente. Los porcentajes de inhibición calculados para los extractos de las plantas transgénicas resultaron alrededor del 90%, similar a los valores calculados para los puntos de menor concentración de proteína purificada usada en la curva de calibración y al valor obtenido para la muestra de cítrico no transgénico. Así, en las condiciones del experimento utilizadas, y teniendo en cuenta la concentración de proteína

purificada utilizada en la curva patrón del ensayo, la concentración de la proteína (24K o 54K) presente en las muestras de cítrico transgénico sería inferior a 200pg de antígeno por µg de proteína total.

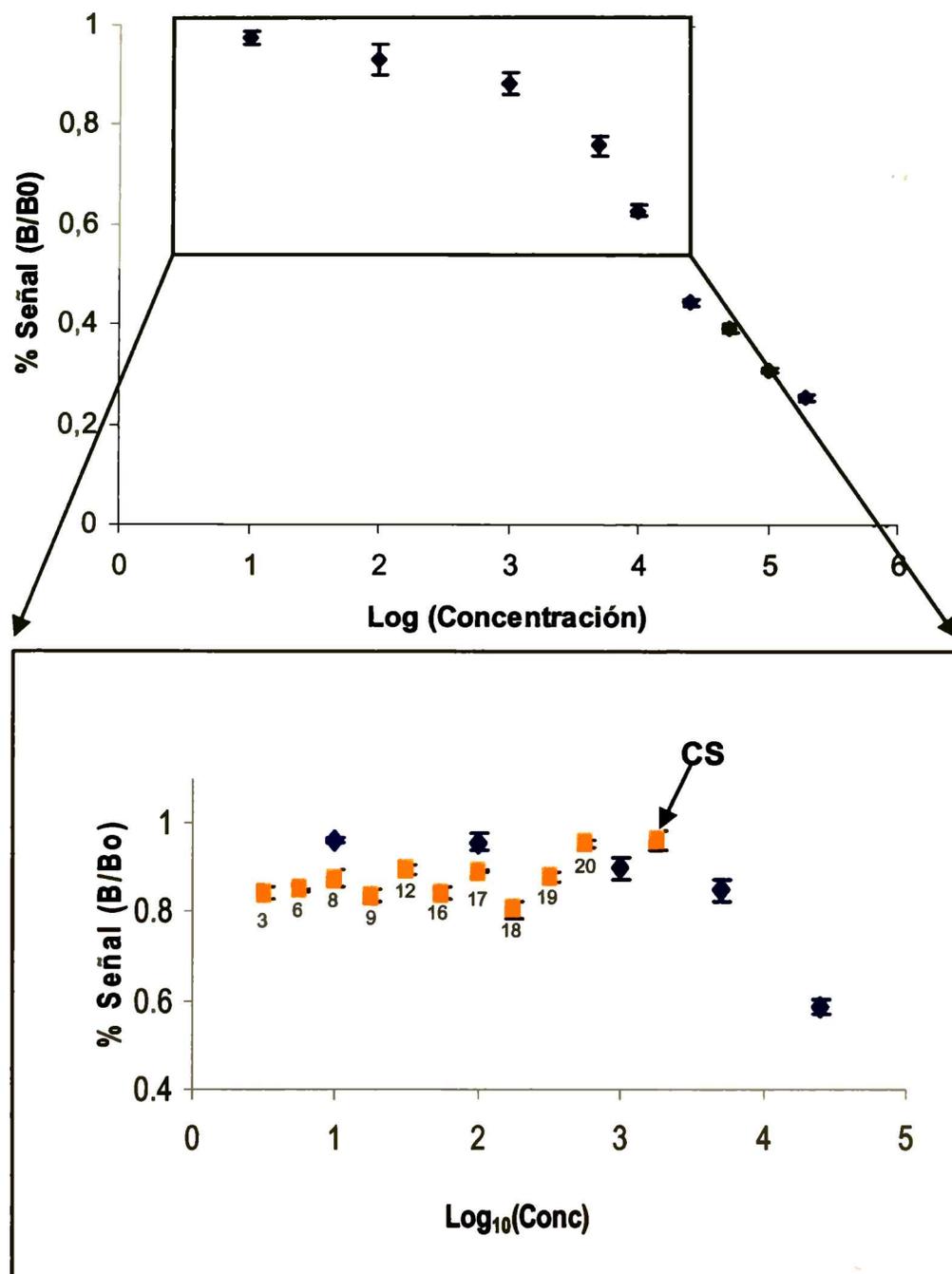


Figura 10. ELISA competitivo secuencial aplicado al análisis de la expresión de la proteína 24K en plantas transgénicas. Arriba: Porcentaje de Inhibición obtenido para diluciones del antígeno purificado. Abajo: En rojo se muestran los porcentajes de inhibición obtenidos para las líneas transgénicas 3, 6, 8, 9, 12, 16, 17, 18, 19 y 20, de izquierda a derecha y para extracto de cítrico sano (CS). En azul se indican los porcentajes de inhibición para los puntos de la curva de calibración más diluidos realizada con el antígeno 24K purificado. Cada punto se determinó por triplicado. La barra indica la desviación estándar.

El hecho que esta proteína se exprese en una concentración por debajo del límite de detección de estos ensayos se correlaciona con los resultados negativos para la detección de los mRNAs correspondientes mediante *Northern blot*. Sin embargo, debido a que la presencia de los transcriptos fue confirmada por RT-PCR en 4 líneas de las 10 analizadas, la expresión de la proteína, aunque baja, no podría descartarse. Por lo tanto, en el futuro, la detección mediante el ELISA competitivo secuencial podría ser mejorada

optimizando algunas condiciones del ensayo que se han utilizado en la tesis a fin de aumentar el límite de detección del método.

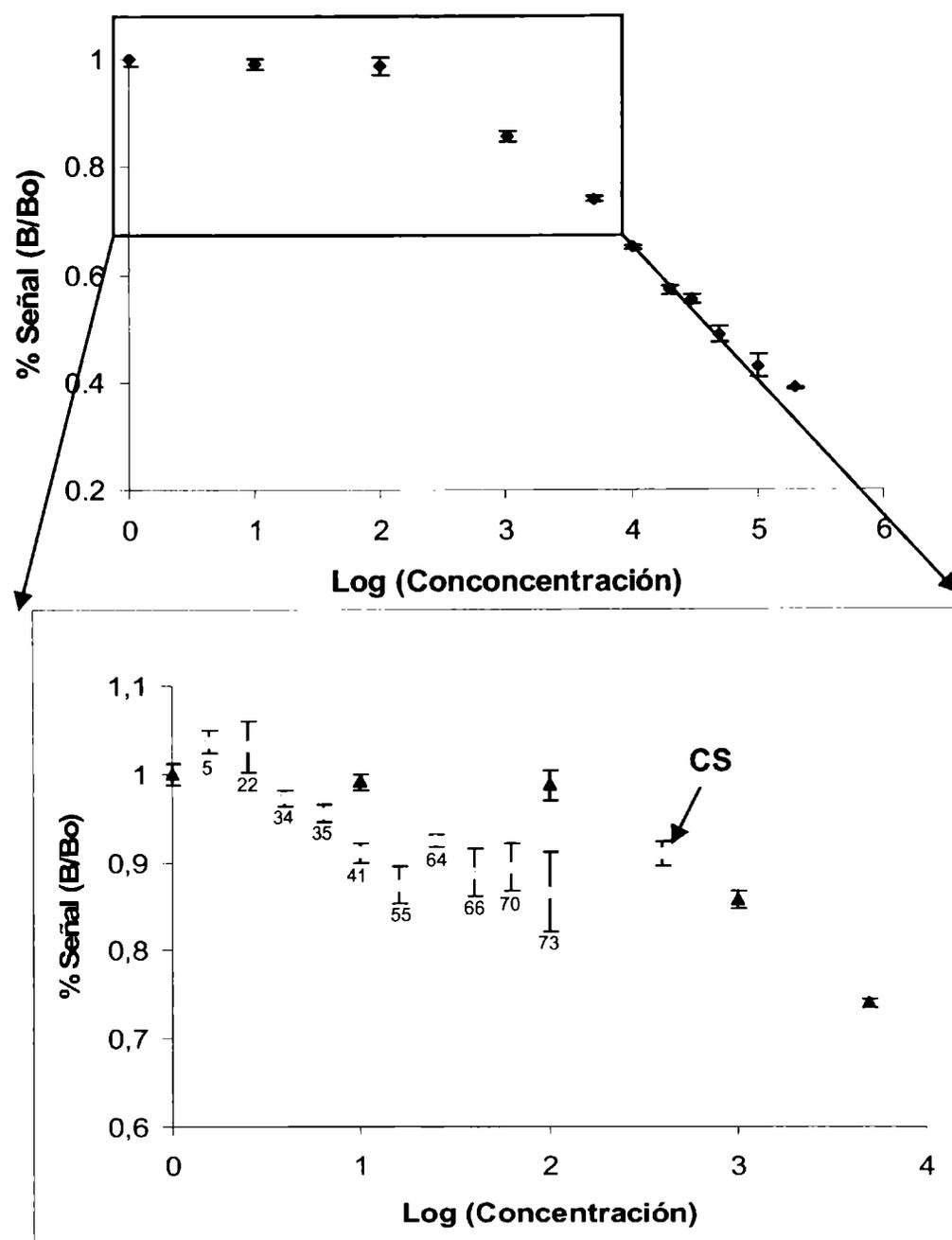


Figura 11. ELISA competitivo secuencial aplicado al análisis de la expresión de la proteína 54K en plantas transgénicas. En rojo se muestran los porcentajes de inhibición obtenidos para las líneas transgénicas 5, 22, 34, 35, 41, 55, 64, 66, 70 y 73, de izquierda a derecha y para extracto de cítrico sano (CS). En azul se indican los porcentajes de inhibición para los puntos de la curva de calibración mas diluidos realizada con el antígeno 54K purificado. Cada punto se determinó por triplicado. La barra indica la desviación estándar.

II. D. Análisis de la metilación del transgén en líneas transgénicas 48K

En muchos casos se ha observado que la introducción de un transgén en plantas ha inducido silenciamiento del mismo. Los transgenes pueden ser silenciados transcripcionalmente (TGS, por *Transcriptional gene silencing*) o post-transcripcionalmente (PTGS, por *Post-transcriptional gene silencing*). En el primer fenómeno, la síntesis de RNA puede verse inhibida por la metilación de la secuencia promotora del transgén, mientras que el PTGS involucra degradación específica de RNA

mensajero en el citoplasma de la célula vegetal. La inducción de PTGS ha sido asociado con múltiples copias del transgén, metilación de citocinas en la región codificante, bajo nivel de acumulación de RNA mensajero, y con la producción de RNAs pequeños (siRNAs, *small interferente RNAs*) específicos del transgén.

Dado que la línea 23 posee 3 copias del transgén, bajo nivel de expresión de la proteína de la cápside y del RNA mensajero, dicha línea podría estar silenciada. Por lo cual se realizó el análisis de metilación del transgén de la línea 23 y, como controles de este ensayo, se incluyeron en el análisis, el control de regeneración (3-control) y la línea 96, la cual posee 2 copias de transgén, presenta bajo nivel de expresión de CP y mayor nivel de expresión del mRNA que la línea 23 (ver Figura 5D). En la Figura 12 se muestran los resultados del *Southern blot* del DNA total extraído de cada línea, digerido con *EcoRI*, a fin de liberar el *cassette* de expresión y con *Ddel*, enzima sensible a metilación del DNA. La línea 96 presenta el mismo patrón de digestión que el obtenido para el plásmido

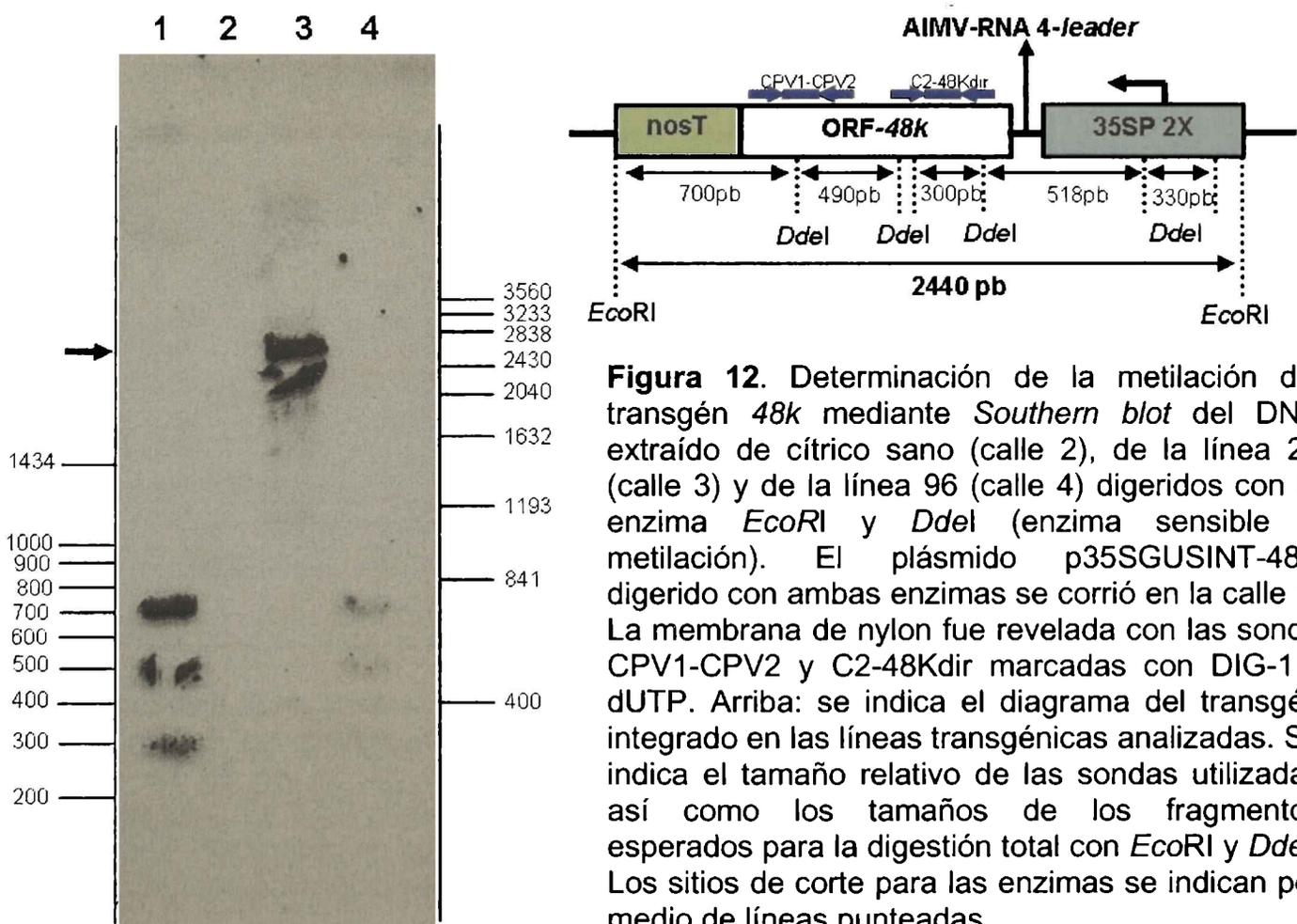


Figura 12. Determinación de la metilación del transgén 48k mediante *Southern blot* del DNA extraído de cítrico sano (calle 2), de la línea 23 (calle 3) y de la línea 96 (calle 4) digeridos con la enzima *EcoRI* y *Ddel* (enzima sensible a metilación). El plásmido p35SGUSINT-48K digerido con ambas enzimas se corrió en la calle 1. La membrana de nylon fue revelada con las sonda CPV1-CPV2 y C2-48Kdir marcadas con DIG-11-dUTP. Arriba: se indica el diagrama del transgén integrado en las líneas transgénicas analizadas. Se indica el tamaño relativo de las sondas utilizadas así como los tamaños de los fragmentos esperados para la digestión total con *EcoRI* y *Ddel*. Los sitios de corte para las enzimas se indican por medio de líneas punteadas.

binario p35SGUSINT/CP sugiriendo que los transgenes presentes en dicha línea no están metilados (calles 1 y 4). Por otro lado, el patrón obtenido para la línea 23 presenta una banda de aproximadamente 2400nt (se indica con la flecha) correspondiente a la digestión con *EcoRI*. Los productos de digestión del *Southern blot* presentan retraso en la migración en el gel respecto a los marcadores de peso molecular, como se puede observar en los controles, debido posiblemente a la masa de ácidos nucleicos utilizada en el ensayo. La presencia de la banda de 2400nt muestra que existe metilación en la región del ORF de esta línea, dado que no se observa la presencia de bandas de bajo peso

molecular presentes en las digestiones de la línea 96 y el plásmido binario. Por otro lado, se observa una banda de menor tamaño que podría ser el producto de la metilación parcial en la zona del promotor en alguna de las copias del transgén presentes en la línea 23.

III. Evaluación de la resistencia de las líneas transgénicas seleccionadas al virus de la psorosis de los cítricos

III. A. Primer ensayo de desafío de líneas transgénicas 48K para evaluar su resistencia al virus de la psorosis de los cítricos.

A fin de analizar la resistencia derivada del patógeno adquirida, con el correspondiente permiso de CONABIA, cuatro de las líneas 48K (denominadas 21CP, 28CP, 34CP y 96CP) fueron propagadas e infectadas con el virus de la psorosis de los cítricos. Dichas líneas fueron seleccionadas al momento de iniciar el experimento de desafío teniendo en cuenta que en los primeros análisis habían presentado diferentes niveles de expresión de la proteína CP (las líneas 21 y 34 fueron consideradas como de alta expresión mientras que las líneas 28 y 96 como de baja expresión de la proteína viral).

En este primer ensayo de desafío se realizaron entre 4 y 5 propagaciones de cada línea injertando yemas de las plantas madres en plantines de Limón Rugoso (ver Materiales y Métodos). Las plantas se mantuvieron en un invernáculo a 22-24 °C con un fotoperíodo de 16 horas. Una vez alcanzado el tamaño adecuado (10-12 meses de crecimiento), 3 o 4 de dichas propagaciones fueron infectadas con CPsV (aislado CPV-4, homólogo al transgén introducido) siguiendo el procedimiento aplicado en los ensayos de *indexing biológico* para psorosis de los cítricos (Programa de Mejoramiento Cítrico Varietal y Sanitario, PROCITRUS, INTA-Concordia, Entre Ríos). Las restantes propagaciones fueron inoculadas con material proveniente de una planta sana, estableciendo así el control no inoculado (CNI). En estos ensayos la transmisión del virus se realiza mediante el injerto de dos piezas de corteza seleccionada de una planta que contiene una fuerte carga viral (alta concentración de virus) que es manifestada por la expresión de los síntomas foliares. Tal injerto permanece en la planta inoculada, siendo fuente constante de virus (Figura 13). Las propagaciones de las líneas transgénicas, el injerto de las mismas, así como la observación de sintomatología fueron realizadas en la Estación Experimental del INTA-Concordia.

Las cuatro líneas infectadas manifestaron los síntomas foliares característicos de CPsV entre las 4 y 5 semanas posteriores a haber sido inoculadas por injerto siendo indistinguible de los controles no transgénicos infectados. A fin de analizar la multiplicación viral en este ensayo se aplicó la técnica TAS-ELISA sobre material obtenido de cada nueva brotación durante los primeros 4 meses a partir de la infección. En general, las plantas transgénicas infectadas presentaron altos valores de DO comparables con los obtenidos para los controles infectados, resultando los valores de DO de los CNI muy bajos, similares a los obtenidos para los controles no transgénicos no inoculados (datos no mostrados). Los resultados obtenidos al aplicar la técnica de RT-

PCR utilizando *primers* específicos para detectar el RNA2 (*primers* A y B) se correlacionaron con los resultados del TAS-ELISA y las observaciones de los síntomas, confirmando la acumulación del virus en las cuatro líneas a través de los 4 meses del ensayo.

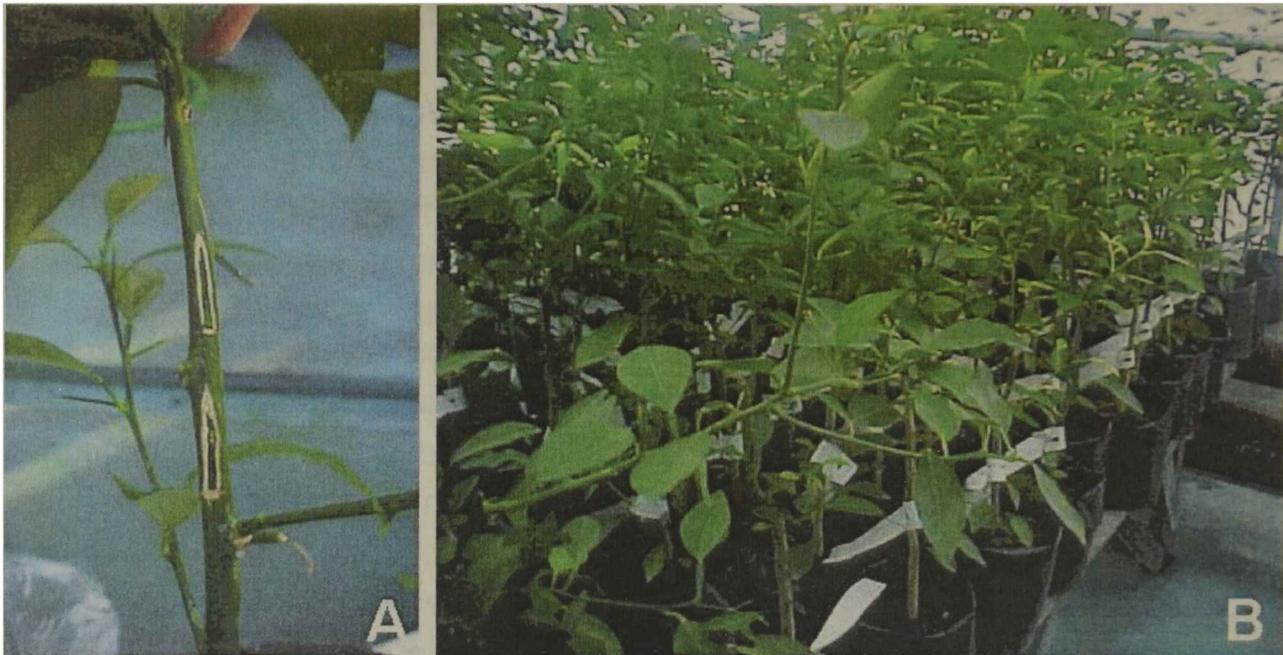


Figura 13. Primer ensayo de desafío de líneas transgénicas 21CP, 28CP, 34CP y 96CP. **A**, una de las propagaciones transgénicas inoculada con dos trozos de corteza proveniente de material infectado con CPsV. **B**, lote de plantas de cítrico desafiadas en la Estación Experimental Agropecuaria del INTA-Concordia, Entre Ríos.

En el transcurso del experimento de desafío, algunas de las propagaciones de las líneas transgénicas evaluadas murieron y algunas de las inoculaciones en las propagaciones de controles no transgénicos fallaron, por lo que debieron ser re-inoculadas, desfasándose su análisis respecto a las restantes propagaciones.

De acuerdo a los valores de DO obtenidos (TAS-ELISA) y la expresión de los síntomas en las plantas desafiadas, en este ensayo preliminar, la tolerancia o resistencia adquirida por las líneas transgénicas podría no haberse manifestado debido a la fuerte carga viral del inóculo, siendo mucho más alta que los inóculos transmitidos en el campo. Probablemente transmitido por un vector (Beñatena y Portillo, 1984; Palle *et al.*, 2004), el virus puede tomar años para multiplicarse en un árbol y manifestar los síntomas. Algunos experimentos han indicado que la transmisión del agente de psorosis ocurre en pocos días cuando se realiza mediante injerto en plantas crecidas en el invernáculo (Pedro Moreno y L.W. Timmer, comunicación personal). Por estos motivos, pensando que podría disminuirse el inóculo viral en el invernadero, se ensayaron distintos tiempos de contacto con el objetivo de disminuir la cantidad de virus que llegue a transmitirse desde el tejido infectado al tejido sano, como se describe en el siguiente apartado.

III. B. Segundo ensayo de desafío líneas transgénicas 24K, 48K y 54K para evaluar su resistencia al virus de la psorosis de los cítricos.

III. B. 1) *Ensayo de carga viral*

La transmisión de CPsV en cítricos se realiza en el invernáculo por medio de injerto de un trozo de corteza proveniente de una planta infectada en una planta sana. Las dos partes a injertar son cortadas a fin de abrir el eje de la planta receptora hasta llegar al cambium y se prepara el injerto de manera tal que este tejido quede en contacto con el de la planta receptora. Cuando las células del cambium de la planta receptora y el injerto comienzan a dividirse se forma un callo (masa parenquimática) y se establece la continuidad entre ambas partes. En este nuevo tejido el virus se multiplica y pasa a los vasos del resto de la planta.

Utilizando esta metodología, y con el objetivo de disminuir la carga viral con la que se realizó el primer ensayo de desafío, se llevó a cabo el ensayo de carga viral. Para ello se injertaron 10 plantines de naranjo dulce Pineapple con sólo una pieza de corteza joven infectada con CPsV e inmediatamente fueron podados a fin de forzar la brotación. Las plantas se mantuvieron en un invernáculo a 22-24 °C con un fotoperíodo de 16 horas. Después de 10 días, la pieza fue retirada de cuatro de los 10 plantines inoculados (10 días post inoculación, dpi). Seis días después se retiró la pieza a otros 4 plantines (16 dpi), dejando los dos plantines restantes como controles positivos de infección, sin retirarle la fuente de inóculo. La observación de síntomas en los brotes de todas las plantas se realizó a los 25 dpi. Para confirmar la presencia del virus se aplicó la técnica de RT-PCR partiendo de tejido foliar de la primera brotación (25 dpi). Los resultados de la observación coincidieron con los obtenidos por RT-PCR, mostrando que 16 días fueron suficientes para asegurar la transmisión del virus en el total de las plantas ensayadas (Figura 14). Esta condición fue la elegida para realizar el nuevo ensayo de desafío de las líneas transgénicas seleccionadas.

En paralelo se realizó el mismo ensayo sobre otros 10 plantines de naranjo dulce pero en el momento de la infección no fueron podados completamente (se les dejó un brote de unos 30 cm aproximadamente). Se procedió igual que en el ensayo anterior, donde 4 plantines estuvieron en contacto con el injerto por 10 días (10 dpi), a otros 4 plantines se les retiró el inóculo a los 16 dpi y los dos plantines restantes fueron mantenidos con la fuente de inóculo. Se aplicó RT-PCR a los 24 dpi a partir de la extracción de RNA total de material de hojas viejas de los plantines, ya que los brotes nuevos no se habían desarrollado lo suficiente para poder ser analizados, incluso por sintomatología. El ensayo de RT-PCR resultó negativo para todas las muestras analizadas (Figura 14). Transcurridos 2 meses todas las plantas presentaron síntomas de CPsV en brotes nuevos, pero el crecimiento fue heterogéneo, algunos plantines brotaron dentro del primer mes y otros al final del segundo. Esto demostró que el virus fue capaz de transmitirse desde el tejido infectado (injerto) a la planta receptora pero que fue incapaz de moverse desde las células del sistema vascular a las células meristemáticas de hojas maduras de la planta receptora 24dpi dado que la presencia del mismo no fue confirmada por RT-PCR ni en las plantas en contacto con el injerto por 16 días ni en los controles donde permanece el inóculo. En plantas de naranjo dulce Pineapple crecidas en el invernáculo y en árboles de campo infectados con CPsV se ha observado que la cantidad de virus presente en hojas maduras es nula o muy baja y menor que en hojas jóvenes cuando se realiza el análisis mediante métodos inmunológicos (Martín et al., 2002a). En

general, los árboles afectados por psorosis pueden presentar ramas sin síntomas, las cuales, en la siguiente brotación, resultan afectadas presentando síntomas característicos de la enfermedad.



III. B. 2) *Ensayo de desafío de líneas transgénicas 24K, 48K y 54K para evaluar su resistencia al virus de la psorosis de los cítricos aplicando el procedimiento optimizado previamente (Ensayo de carga viral)*

El tiempo transcurrido entre la propagación de las líneas transgénicas de cítrico a desafiar y el momento en que se realiza la infección con el virus suele tomar entre 10 a 12 meses, ya que es necesario que la propagación tenga un tamaño adecuado para realizar la inoculación por injerto. La elección de las líneas a desafiar dependerá de la caracterización molecular que se tenga de dichas líneas al momento de la propagación. Al inicio del segundo experimento de desafío se sabía que la línea 23 contenía 3 copias del gen, la expresión del mRNA no era detectable y la expresión de la proteína CP había sido negativa comparada con las plantas no transgénicas. Esto hacía que la línea 23 fuera un buen candidato para ser desafiado, proponiendo esta línea como resistente a través de un mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional. Por otro lado, algunas propagaciones de las líneas 28 y 96, habían muerto durante el transcurso del

primer desafío, con lo cual, teniendo en cuenta que contenían diferente número de copia del transgén (1 y 2 copias, respectivamente), también eran buenas candidatas a ser incluidas en el desafío siguiente. Las restantes líneas desafiadas fueron seleccionadas de acuerdo al número de copias del transgén. Para el desafío de las plantas transgénicas 24K se seleccionaron las líneas 3 y 8 (1 copia), la línea 9 (2 copias) y la línea 12 (3 copias), mientras que en el caso de las plantas transgénicas 54K se seleccionaron las líneas 41 (1 copia), 70 (2 copias), 35 (3 copias) y 63 conteniendo 4 copias integradas del transgén.

Así, 8 yemas de tres de las líneas 48K (28CP, 96 CP y 23CP), 8 yemas de 4 líneas 24K (3-24K, 8-24K, 9-24K y 12-24K) y otras 8 yemas de 4 líneas 54K (35-54K, 41-54K, 63-54K y 70-54K) fueron injertadas sobre un pie joven de limón rugoso (Figura 15) en la EEA-INTA, Concordia y trasladadas al invernáculo de Virus Vegetales – IBBM, La Plata para su inoculación y evaluación. Las plantas se mantuvieron en el invernáculo a 22-24 °C con un fotoperíodo de 16 horas. Transcurridos 10 meses, 6 de estas propagaciones fueron desafiadas mediante infección con CPsV (aislado CPV-4) utilizando las condiciones optimizadas a partir del ensayo de carga viral (una pieza de

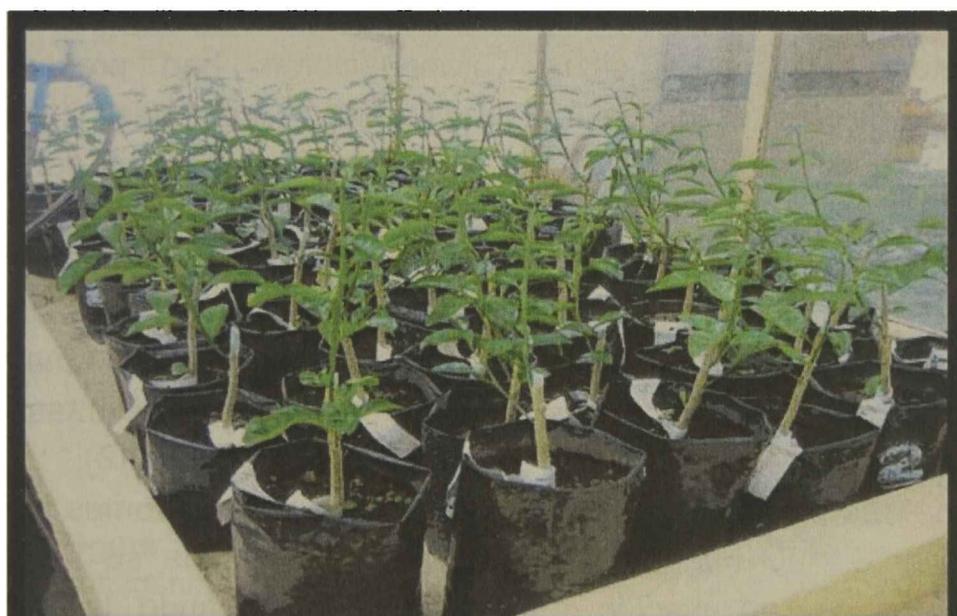
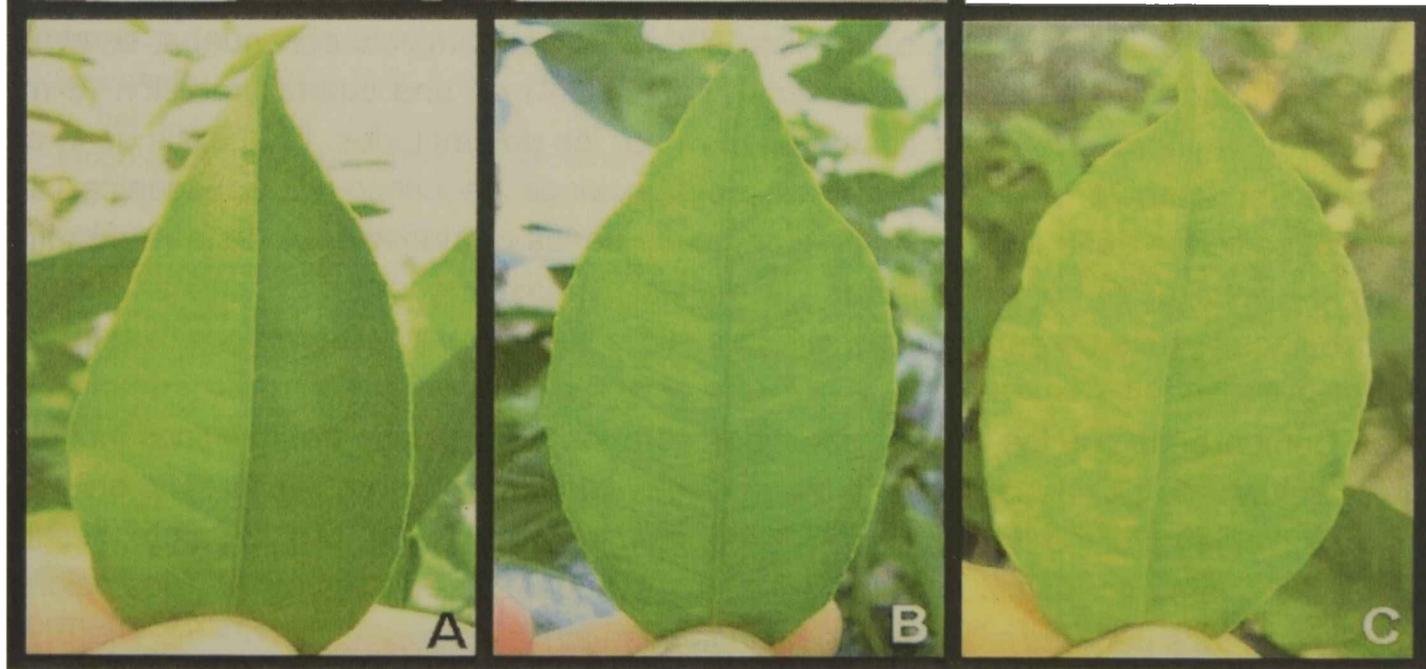


Figura 15. Arriba: Propagaciones de las líneas transgénicas 24K (3, 8, 9 y 12), 48K (23, 28 y 96) y 54K (35, 41, 63 y 70) injertadas sobre Limón rugoso creciendo en el invernáculo de Virus Vegetales - IBBM, La Plata. Abajo: **A**, Observación de una hoja de la línea 96CP propagada sin infectar; **B y C**, flecos, manchas y cloróticas, desarrollados en hojas de dos propagaciones de la línea 96CP, 6 meses post-infección.



corteza, 16 días de permanencia del inóculo y poda de las plantas). Las restantes 2 propagaciones no fueron injertadas (controles negativos). Además se infectaron propagaciones de plantas no transgénicas como control positivo del inóculo viral.

Cada 30 días se realizaron observaciones de las plantas mostrando la manifestación de síntomas. Entre observaciones se realizó la poda de las plantas, a fin de inducir la nueva brotación de las plantas desafiadas y el material foliar extraído fue utilizado para analizar la presencia del virus mediante TAS-ELISA-HRP dada su mayor sensibilidad (Zanek *et al.*, 2006). Así, durante las tres sucesivas brotaciones luego de la inoculación (primeros 4 meses), las plantas fueron analizadas individualmente por TAS-ELISA. Los resultados obtenidos para las líneas 48K, 54K y 24K, se muestran en las Figuras 16-18, respectivamente, los cuales se discuten más adelante.

A fin de confirmar la presencia de CPsV, en la primera brotación, además del TAS-ELISA, se realizó RT-PCR con *primers* específicos para el RNA2 (*primers* A y B), en el caso de las líneas 48K, y para el RNA3 (*primers* CPV1 y CPV2) para las líneas 24K y 54K.

Para las líneas 48K, 54K y los cítricos control, todas las plantas que habían sido injertadas con un trozo de corteza infectada con CPsV fueron positivas por RT-PCR, confirmando que 16 días de contacto con el inóculo fueron suficientes para transmitir el virus a la planta receptora. Más aun, dichas propagaciones han presentado sintomatología indistinguible de los controles no transgénicos (manchas y flecos cloróticos) (Figura 15) y el análisis por TAS-ELISA ha confirmado la presencia del virus (Figura 16 y 17).

En algunas de las propagaciones de las líneas 6-24K y 9-24K, se observó un retraso en la aparición de los síntomas (1 de 6 y 2 de 6 propagaciones, respectivamente). Dichas propagaciones resultaron negativas por TAS-ELISA y RT-PCR cuando se evaluó material de la primera brotación. Sin embargo, en la segunda brotación, estas plantas han presentado síntomas de psorosis resultando positivas por TAS-ELISA (Figura 18).

En la línea 8-24K, una de sus propagaciones presentó ausencia de síntomas siendo negativa por TAS-ELISA (ver 8-24K-1, Figura 18) cuando fue evaluada su segunda brotación (las demás plantas habían crecido más rápidamente, dando la tercera brotación). Por lo tanto, a fin de analizar si este comportamiento continuaba, se evaluó la sintomatología y la presencia del virus (TAS-ELISA) en una cuarta brotación (6 meses luego de la inoculación), resultando positiva por los dos métodos. El análisis de la cuarta brotación también se realizó en las propagaciones de cítrico no transgénico, en las propagaciones de la línea 3-24K y en algunas de las propagaciones de la misma línea a fin de analizar el comportamiento de dichas plantas. En todos los casos, las plantas inoculadas presentaron síntomas característicos de psorosis y fueron positivas por TAS-ELISA.

Comparando con los valores obtenidos para los controles no-transgénicos inoculados, los valores de DO de las plantas transgénicas infectadas fueron similares y, en general, se incrementaron a lo largo del experimento (Figuras 16-18). Siempre resultaron significativamente mayores (entre 5 y 30 veces) cuando se comparan con los valores de DO obtenidos para las propagaciones de la línea sin infectar.

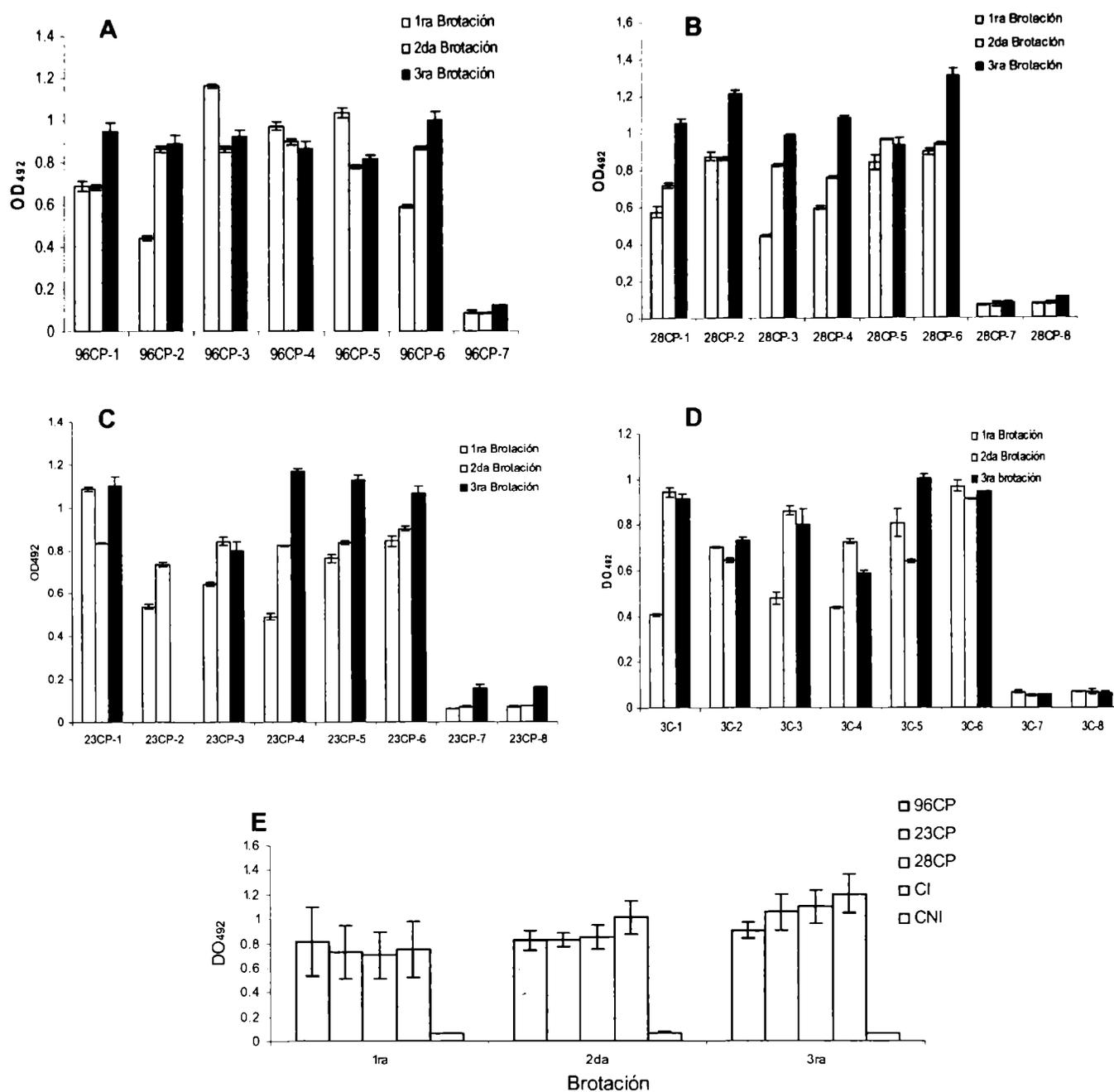


Figura 16. Evaluación de la resistencia a CPsV mediante TAS-ELISA en las líneas transgénicas que expresan el ORF 48K de CPsV. **A-D.** Análisis mediante TAS-ELISA-HRP de 7 propagaciones de las líneas transgénicas 96CP (96CP-1 a 96CP-6: inoculado con CPsV, 96CP-7: no inoculado), 23CP (23CP-1 a 23CP-6, inoculado con CPsV. 23CP-7 y 23CP-8, no inoculado) y 28CP (28CP-1 a 28-CP6 inoculado con CPsV. 28CP-7 y 28CP-8, no inoculado) y del control de regeneración (3C-1 a 3CP-6, inoculado con CPsV. 3C-7 y 3C-8, no inoculado). Los valores de DO se expresaron como el promedio de las densidades ópticas de los triplicados realizados en la misma microplaca de ELISA (las barras indican la desviación estándar) para tres sucesivas brotaciones durante 4 meses. **E.** Los valores de DO se refieren al promedio de las densidades ópticas para las 6 propagaciones infectadas con el aislado CPV-4 para las mismas líneas transgénicas en las tres sucesivas brotaciones. CI: se refiere al promedio de los controles de regeneración inoculados y CNI: se refiere al promedio de los controles de regeneración no inoculados. Las desviaciones estándar se indican mediante barras.

Los síntomas de psorosis se han manifestado por un año desde el inicio del desafío indicando que no hubo recuperación de la infección con CPsV y las plantas aún permanecen infectadas, por lo que ninguna de las líneas evaluadas fue resistente a CPsV o mostró una disminución en la expresión de los síntomas a lo largo del tiempo. Mas aún, no se encontró diferencia consistente y significativa entre las líneas o entre las

propagaciones en respuesta contra el desafío de CPsV, como se reportó en plantas transgénicas de cítrico expresando la proteína de cubierta de CTV (Domínguez, *et al.* 2002).

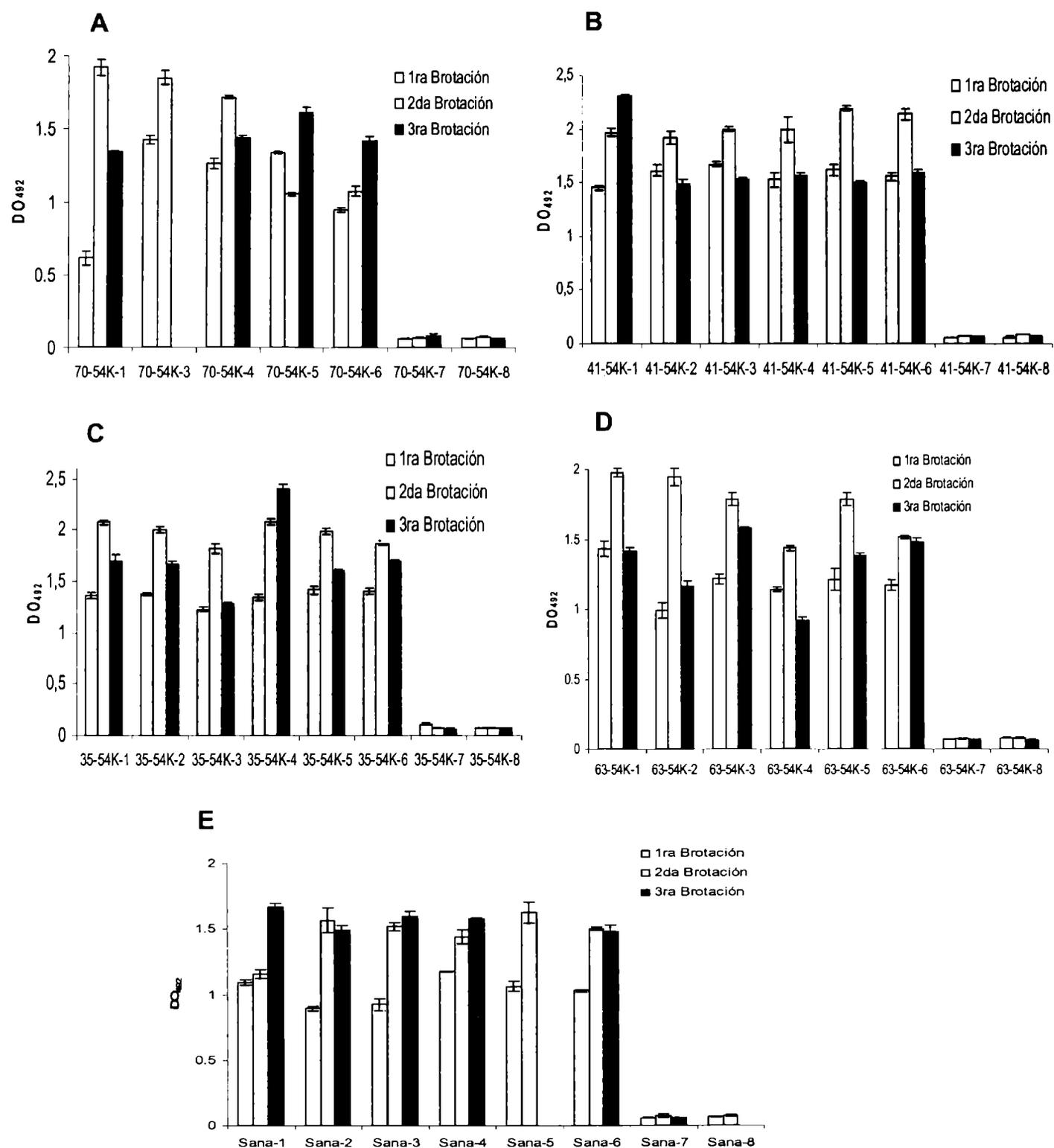


Figura 17. Evaluación de la resistencia a CPsV mediante TAS-ELISA en las líneas transgénicas que expresan el ORF 54K de CPsV. **A-E.** Análisis mediante TAS-ELISA-HRP de 6 propagaciones de las líneas transgénicas 35-54K (35-54K-1 a 35-54K-6: inoculado con CPsV, 35-54K-7 y 35-54K-8: no inoculado), 41-54K (41-54K-1 a 41-54K-6: inoculado con CPsV, 41-54K-7 y 41-54K-8, no inoculado), 63-54K (63-54K-1 a 63-54K-6 inoculado con CPsV, 63-54K-7 y 63-54K-8: no inoculado) y 70-54K (70-54K-1 a 70-54K-6 inoculado con CPsV, 70-54K-7 y 70-54K-8, no inoculado) y del control de planta no transgénica sana (Sana-1 a Sana-6 inoculado con CPsV. Sana-7 y Sana-8: no inoculado). Los valores de DO se expresaron como el promedio de las densidades ópticas de los triplicados realizados en la misma microplaca de ELISA (las barras indican la desviación estándar) para tres sucesivas brotaciones durante 4 meses.

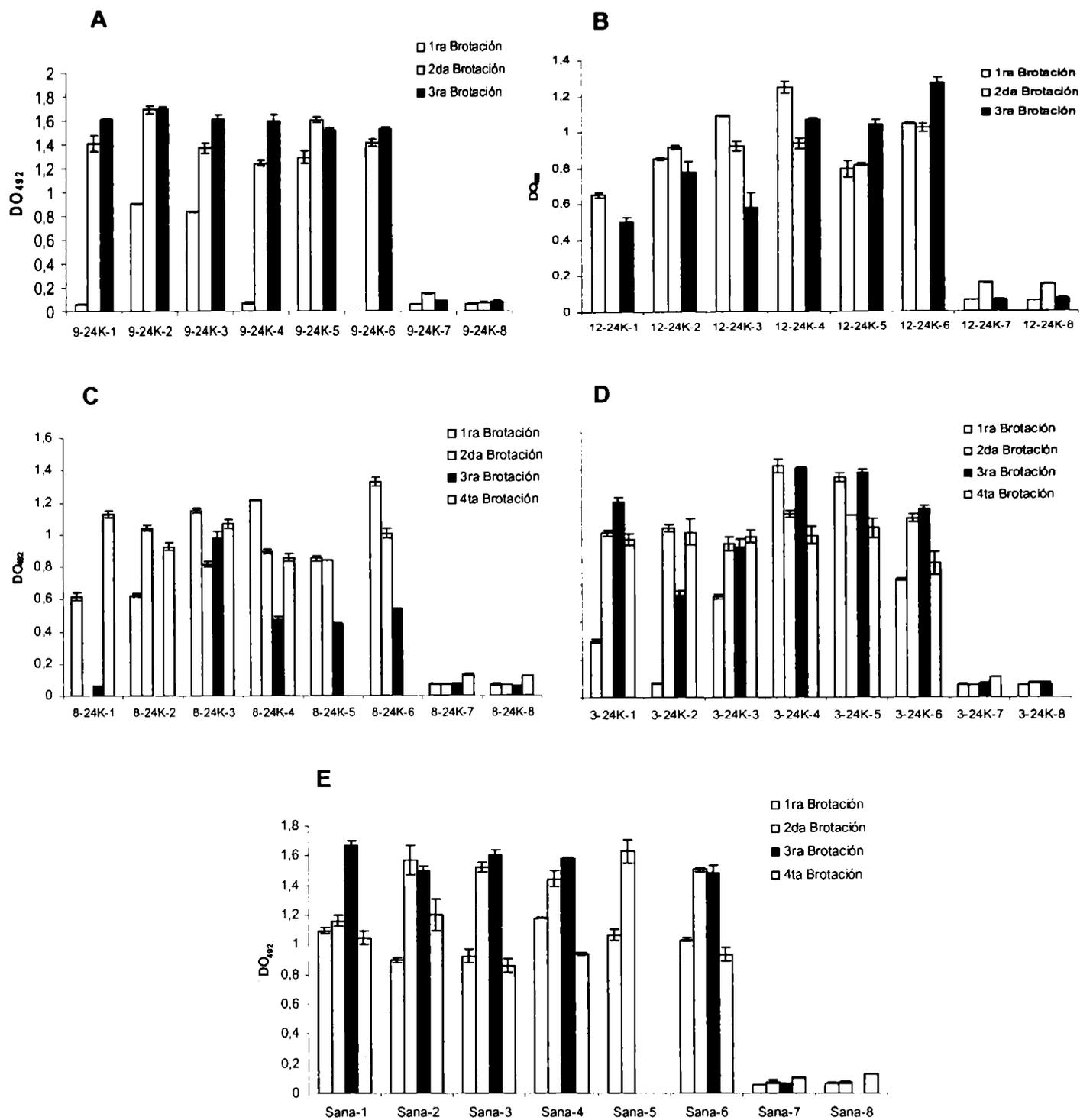


Figura 18. Evaluación de la resistencia a CPsV mediante TAS-ELISA en las líneas transgénicas que expresan el ORF 24K de CPsV. **A-E.** Análisis mediante TAS-ELISA-HRP de 6 propagaciones de las líneas transgénicas 3-24K (3-24K-1 a 3-24K-6: inoculado con CPsV, 3-24K-7 y 3-24K-8: no inoculado), 8-24K (8-24K-1 a 8-24K-6: inoculado con CPsV, 8-24K-7 y 8-24K-8: no inoculado), 9-24K (9-24K-1 a 9-24K-6: inoculado con CPsV, 9-24K-7 y 9-24K-8: no inoculado) y 12-24K (12-24K-1 a 12-24K-6: inoculado con CPsV, 12-24K-7 y 12-24K-8: no inoculado) y del control de planta no transgénica sana (Sana-1 a Sana-6: inoculado con CPsV, Sana-7 y Sana-8, no inoculado). Los valores de DO se expresaron como el promedio de las densidades ópticas de los triplicados realizados en la misma microplaca de ELISA (las barras indican la desviación estándar) para cuatro sucesivas brotaciones durante 4 meses.

En la estrategia de PDR mediada por CP, la resistencia podría ser provista por la sobre acumulación de la CP derivada del transgén o por la inducción de PTGS disparado por la expresión del transgén. Si el mecanismo de protección fuera mediado por proteína, la acumulación de la proteína la cápside en las líneas transgénicas 48K, y las proteínas en las líneas transgénicas 24K y 54K analizadas (en las cuales no ha sido posible

confirmar la presencia de la proteína) podría no ser suficiente para ejercer la protección en las condiciones del análisis (carga viral y etapa del desarrollo de la planta inoculada).

Si un mecanismo de PTGS fuera el involucrado para la protección de la planta, la línea 23 podría ser un buen candidato ya que contiene 3 copias del transgén, expresa bajos niveles de expresión de mRNA y de la proteína 48K, presentando metilación del ORF. Sin embargo, en experimentos preliminares no se han detectado RNAs pequeños, la huella del mecanismo de PTGS, mediante *Northen blot*. Sin embargo, este resultado debería ser confirmado ya que podrían aplicarse otras metodologías, como la técnica de protección a RNAsa, utilizada con éxito, en la búsqueda de RNAs pequeños en limas transgénicas resistentes a CTV (Fagoaga *et al.*, 2006).

La resistencia derivada del patógeno ha sido una de las estrategias utilizadas para el control de la infección viral en algunos sistemas. Sin embargo, la mayor parte de los artículos que se han divulgado han sido dirigidos a virus con genoma a RNA positivo y en huéspedes transgénicos herbáceos. Cítricos y otras plantas leñosas, como la vid y el ciruelo, han sido transformados con genes de virus de polaridad positiva, como CTV (Domínguez *et al.*, 2002; Fagoaga *et al.*, 2006), GFLV (Gambino *et al.*, 2005, Maghuly *et al.*, 2005) y *Plum pox virus* (Ravelonandro *et al.*, 1997, Hily *et al.*, 2004), respectivamente. Existen pocas publicaciones de transformación con genes de virus con genoma negativo como *Tomato spotted wild virus*, TSWV (Levin *et al.* 2005; Pang *et al.* 1992; Prins *et al.* 1995) y pero no existe experiencia en plantas transgénicas leñosas con virus negativos.

Varios factores podían contribuir a la falta de protección observada en las líneas transgénicas evaluadas: i) la alta dosis de virus debido a la inoculación por injerto en las plantas desafiadas podría superar la potencial protección producida por la expresión constitutiva del ORF 48K en las células transgénicas, ii) el nivel variable de la expresión del transgén durante el desarrollo y crecimiento simpodial de las plantas transgénicas podría afectar el mecanismo de PDR, y iii) el genoma de CPsV podría codificar proteína/s que supriman el PTGS inducido, por lo menos en la línea 23.

A pesar de los resultados obtenidos, 16 líneas transgénicas 48K, 6 líneas 24K y 6 líneas 54K de Naranja dulce Pineapple todavía no se han analizado y podrían ser evaluadas, dado que alguna de ellas, quizás produzca acumulación eficiente de 24K, 48K o 54K o inducción de PTGS capaz de generar protección contra CPsV en su huésped natural.

CONCLUSIONES

Se han obtenido 75 líneas transgénicas de *Citrus sinensis* (naranja dulce Pineapple) utilizando como genes marcadores *uidA* (GUS) o *sgfp* (sGFP). De estas líneas 15 contienen el gen *24k*, 15 el gen *54k* y 21 el gen *48k*.

De las 15 líneas que contienen el gen *48k* y expresan GUS, 9 han sido analizadas *Southern blot*, *Northen blot* y TAS-ELISA-HRP. Las líneas contenían entre 1 y 3 copias integradas del transgén, presentando diferentes niveles de expresión de la proteína viral. No se encontró correlación entre el número de copias del transgén, la expresión de mensajero y de la proteína.

La línea 23CP, conteniendo 3 copias del transgén, ha presentado baja concentración de RNA mensajero y baja expresión de proteína. Esta línea presenta metilación de citocinas en la región codificante, por lo que la inducción del PTGS no puede descartarse.

Diez de las líneas 24K y 54K se evaluaron por *Southern blot*. Las líneas 24K presentaron entre 1 y 3 copias mientras que en las líneas 54K se encontraron entre 1 y 4 copias integradas del transgén.

El análisis por *Northern blot* de las líneas 24K y 54K resultó negativo pero se confirmó la presencia y la integridad del RNA mensajero en 4 líneas 24K y 4 líneas 54K mediante RT-PCR.

Mediante ELISA competitivos secuenciales se determinó que la concentración de la proteína 24K y 54K presente en las muestras de cítrico transgénico sería inferior a 200pg de antígeno/ μ g de proteína total, expresándose en una concentración por debajo del límite de detección del ensayo. Este resultado se correlaciona con los resultados negativos para la detección de los mRNAs mediante *Northern blot*.

Cuatro de las nueve líneas 48K fueron desafiadas con CPsV en condiciones similares al Indexing biológico presentaron sintomatología indistinguible de los controles no transgénicos. La presencia del virus fue confirmada por TAS-ELISA y RT-PCR. En este primer experimento, los valores obtenidos y el comportamiento de las líneas inoculadas, indujeron a pensar que la tolerancia o resistencia adquirida por las líneas transgénicas podría no haberse manifestado debido a la fuerte carga viral del inóculo.

Se realizó el experimento de carga viral a fin de disminuir la cantidad de virus que pueda transmitirse acortando el tiempo de contacto entre el tejido infectado y el tejido sano, determinándose que 16 días de contacto fueron suficientes para infectar el 100% de las plantas inoculadas.

Tres líneas 48K, 4 líneas 24K y 4 líneas 54K fueron desafiadas con CPsV usando las condiciones determinadas en el ensayo de carga viral. Aunque algunas pocas propagaciones de algunas líneas 24K presentaron un retraso en la aparición de síntomas, todas las líneas transgénicas analizadas presentaron síntomas de psorosis y resultaron positivas por TAS-ELISA a lo largo de 6 meses de observaciones. La presencia del virus fue confirmada por RT-PCR en la primera brotación.

CAPÍTULO 4. Estudio de la expresión de la proteínas 24K, 48K y 54K y la localización sub-celular de la proteína de cubierta viral de CPsV.

- I. Estudio de la expresión de las proteínas virales durante el curso de la infección en hospedantes herbáceos.
- II. Análisis de probables secuencias de transporte nuclear en los ORFs 24K, 48K y 54K
- III. Expresión transitoria de las proteínas 24K, 48K y 54K fusionadas a GFP y dsRed en hojas de *Nicotiana benthamiana*.
- IV. Localización sub-celular de la proteína 48K en hojas de *N. benthamiana* mediante microscopía confocal.

INTRODUCCION

El análisis de la localización subcelular de proteínas virales es una herramienta importante para la elucidación de su participación en el ciclo de infección. Varias estrategias han sido utilizadas para poder establecer la localización subcelular de diferentes proteínas virales como su expresión en protoplastos (Lucy *et al.*, 2000), en células de insecto (van Wezel *et al.*, 2001) y en células de levadura (Goodin *et al.*, 2001). En muchos casos, el desarrollo de antisueros contra dichas proteínas ha posibilitado su uso en experimentos de fraccionamiento subcelular de extractos vegetales infectados o la visualización mediante microscopio electrónico por medio de inmunomarcado del anticuerpo a partículas unida a oro (*immunogold*) con el objetivo de analizar su localización subcelular (Mayers *et al.*, 2000; Kormelink *et al.*, 1994). En los últimos años se ha utilizado la proteína GFP como proteína reportera, no solo en el desarrollo de plantas transgénicas (Sheen *et al.*, 1995, Chiu *et al.*, 1996), sino asociada a la caracterización de proteínas de movimiento viral (Baulcombe *et al.*, 1995, Lazarowitz y Beachy, 1999). Además ha sido ampliamente usada como proteína de fusión con el objetivo de analizar su direccionamiento debido a la presencia de motivos de secuencia presentes en el péptido fusionado. Dentro de esta metodología, se han utilizado virus recombinantes capaces de expresar la fusión cuando infectan un huésped vegetal (Dong *et al.*, 2003) y también en la expresión transitoria de plásmidos binarios mediante bombardeo (von Armin *et al.*, 1998, Reis Figueira *et al.*, 2001) o agroinfiltración de hojas de plantas herbáceas (Goodin *et al.*, 2001, 2002).

La identificación y caracterización de las proteínas virales, y sus señales de localización requeridas para el transporte nuclear de virus de plantas, son importantes, no solo para el entendimiento de los ciclos de infección viral, sino para el diseño de estrategias antivirales para la protección del cultivo. La interferencia con el transporte nuclear de los patógenos virales, por ejemplo, por inducción de silenciamiento de las proteínas de intercambio nuclear o mediante sobre-expresión de mutantes con señales NLS y/o NES inactivas podría representar una estrategia biológica atractiva para prevenir o atenuar las infecciones virales de especies de plantas agrónomicamente importantes. (Krichevsky *et al.*, 2006)

En este capítulo se describen los experimentos que se realizaron con el objetivo de determinar la expresión de las proteínas virales 24K, 48K y 54K en el transcurso de la infección con CPsV y la posible localización subcelular de dichas proteínas para el entendimiento de su participación en el ciclo infectivo de CPsV.

I. Estudio de la expresión de las proteínas virales durante el curso de la infección en hospedantes herbáceos

I. A. Infección de plantas herbáceas utilizando una purificación parcial de CPsV. Toma de muestra.

A fin de determinar la expresión de las proteínas virales durante el curso de la infección de CPsV y su correlación con la manifestación de los síntomas en plantas herbáceas, se realizó un ensayo de infección en *Chenopodium quinoa* recolectando material vegetal a 1, 2, 3, 4 y 5 días post-infección (dpi). En paralelo se realizó la infección de plantas de *Gomphrena globosa* (hospedante local y sistémico) analizando el material foliar a 1, 2, 4, 5, 7, 9, 11, 15, 17 y 20 dpi. Además, en *G. globosa* también se recolectaron muestras de hojas superiores no infectadas (sistémicas) a 9, 11, 15, 17 y 20 dpi. En todos los casos se realizó la infección con una purificación parcial de CPsV, a partir de tejido de *C. quinoa* infectada, realizada según lo reportado por García *et al.*, 1991a (ver Materiales y Métodos). Para cada tiempo se efectuó la observación de síntomas de CPsV y se tomó una hoja inoculada y una superior no inoculada de tres plantas diferentes. Parte de cada muestra fue procesada para el análisis por *western blot* (ver Materiales y Métodos). Previamente, mediante SDS-PAGE, se determinó la integridad y la concentración de las proteínas extraídas. El resto de la muestra fue dividida en tres, congelada en nitrógeno líquido y guardada a -70°C hasta ser utilizada en los ensayos de ELISA.

I. B. Presencia de la proteína 48K durante el transcurso de la infección local y sistémica.

La expresión de la proteína 48K se analizó mediante TAS-ELISA-HRP y *western blot* en las muestras de *G. globosa* y *C. quinoa* infectadas con CPsV. Antes del análisis por TAS-ELISA-HRP se realizó la cuantificación de las muestras mediante el método de Bradford, colocando en cada pocillo de la microplaca una concentración de proteína de 0.5 mg/ml.

En la figura 1 se muestran los resultados obtenidos mostrando que esta proteína, en las hojas de *G. globosa* inoculadas, es detectada mediante TAS-ELISA 3 días antes de la aparición de los síntomas locales (puntos azules) y que el virus se movilizó a hojas superiores sin manifestar síntomas durante el período analizado (puntos verdes, hojas superiores asintomáticas). En las muestras de *C. quinoa*, hospedante local, la proteína se detectó al mismo tiempo que aparecían los síntomas (Figura 2).

Cuando las muestras fueron analizadas por *western blot* se observó la banda del tamaño esperado a partir de los 9 dpi y en las hojas sistémicas a partir de los 15 dpi en *G. globosa*. Para *C. quinoa* fue posible detectar la proteína 48K a partir de los 4 dpi (Figura 3).

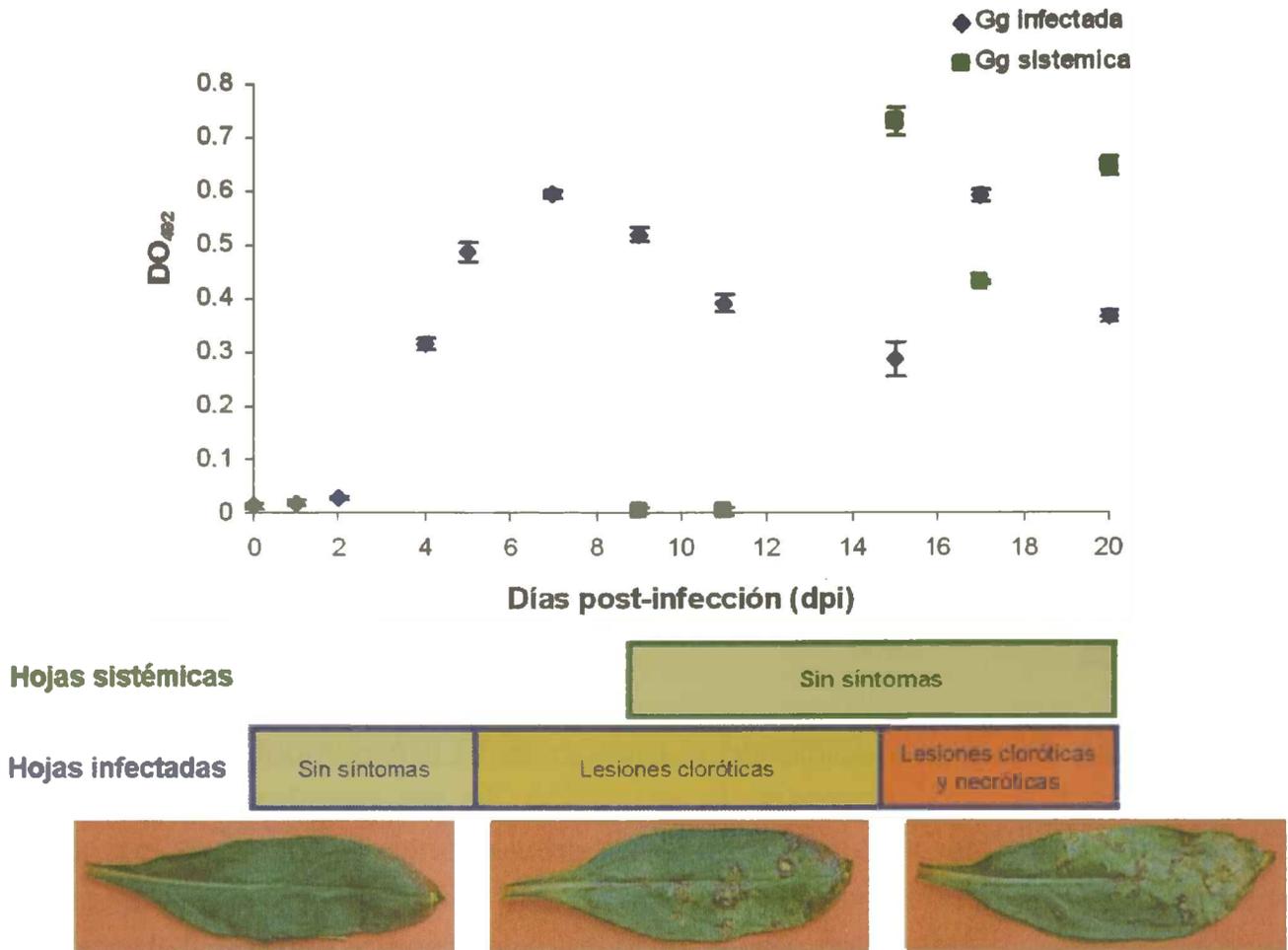
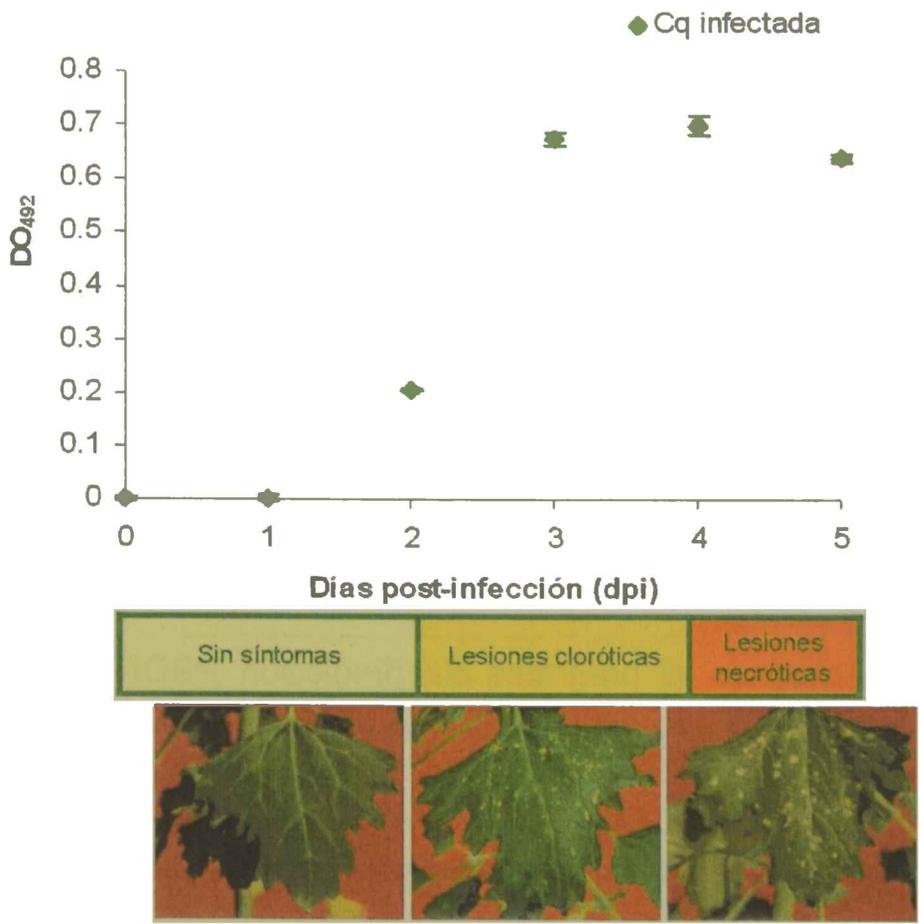


Figura 1. TAS-ELISA aplicado a muestras de hojas infectadas de *Gomphena globosa* para la detección de la proteína 48K durante el curso de la infección y su correlación con la manifestación de los síntomas producidos por CPsV . Cada muestra fue determinada por triplicado. Las barras indican la desviación estándar. Abajo del gráfico, los cuadros y fotos indican el tipo de síntoma y su aparición en las muestras recolectadas a los tiempos indicados en la absisa.

Figura 2. TAS-ELISA aplicado a muestras de hojas infectadas de *Chenopodium quinoa* para la detección de la proteína 48K durante el curso de la infección y su correlación con la manifestación de los síntomas producidos por CPsV . Cada muestra fue determinada por triplicado. Las barras indican la desviación estándar. Abajo del gráfico, los cuadros y fotos indican el tipo de síntoma



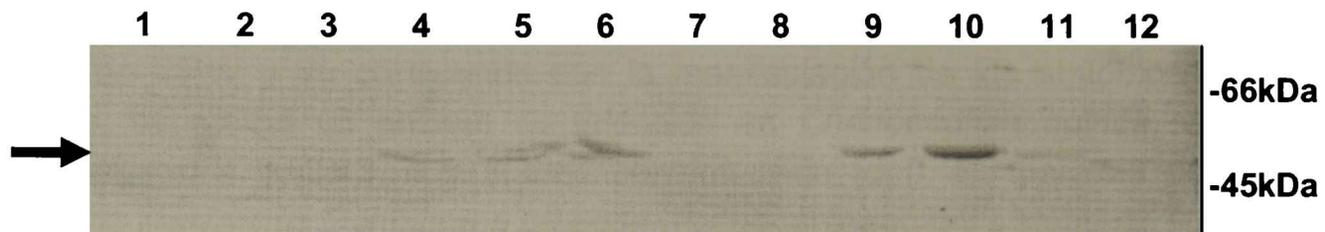


Figura 3. Detección de la proteína 48K en el curso de la infección de hojas de *C. quinoa* y *G. globosa* infectadas. Las muestras fueron analizadas mediante *Western blot*. Calle 1, *C. quinoa* sin inocular. Calle 2, *C. quinoa* inoculada con *buffer* BH, Calles 3 a 6, *C. quinoa* colectadas a 3, 4, 5 y 6 dpi, respectivamente. Calle 7, *G. Globosa* sin inocular. Calle 8 a 10, *G.globosa* colectadas a 5, 10 y 15 dpi, respectivamente. Calle 11 y 12, hojas superiores no inoculadas asintomáticas de *G. globosa*.

I. C. Presencia de las proteínas 24K y 54K durante el transcurso de la infección local y sistémica

En las mismas muestras y aplicando el ensayo de ELISA competitivo secuencial (ver punto III del Capítulo 2), se analizó la expresión de las proteínas 24K y 54K. Las condiciones utilizadas fueron las determinadas previamente, usando una concentración de proteína en la pre-incubación con el antisuero 24K o 54K de 500 ng.ml^{-1} . Tanto en el inmunoensayo para la detección de la proteína 24K, como para la detección de la proteína 54K se obtuvieron señales de densidad óptica fuera del rango de la curva de calibración del método. Por lo tanto, dichas proteínas no pudieron ser detectadas a los tiempos analizados (Figura 4A y B) indicando que probablemente no se trate de proteínas estructurales sino que podrían estar asociadas a funciones de control de la expresión viral, requeridas en bajas concentraciones y en un período corto del ciclo viral.

El momento en el cual las proteínas 24K y 54K se expresan en el tejido infectado con CPsV es un dato importante para el estudio de su localización en la célula vegetal. Así, algunas modificaciones al ensayo inmunológico podrían realizarse con el objetivo de mejorar su sensibilidad.

II. Análisis de probables secuencias de transporte nuclear en los ORFs 24K, 48K y 54K

Naum-Onganía y colaboradores, en el 2003, realizaron el análisis de la secuencia aminoacídica del ORF 280K (la probable RNA polimerasa) presente en el RNA 1 de CPsV e identificaron una señal de localización nuclear (NLS por *nuclear localization signal*) bipartita. Al extender el análisis a secuencias publicadas pertenecientes a las RNA polimerasas de MiLV y RWMV, otras especies del género Ophiovirus, encontraron NLS equivalentes.

Aplicando el programa de predicción PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp>), se realizó el análisis a la secuencia publicada del ORF 261K de *Lettuce ring necrosis virus* (LRNV). Se determinó la presencia de una NLS bipartita ($^{1373}\text{KKLYNITSKERIRNKGK}^{1390}$ y $^{1958}\text{KRDCLSSIIGDCKEPRK}^{1975}$), confirmando que estas señales están altamente conservadas en las RNA polimerasas del género Ophiovirus.

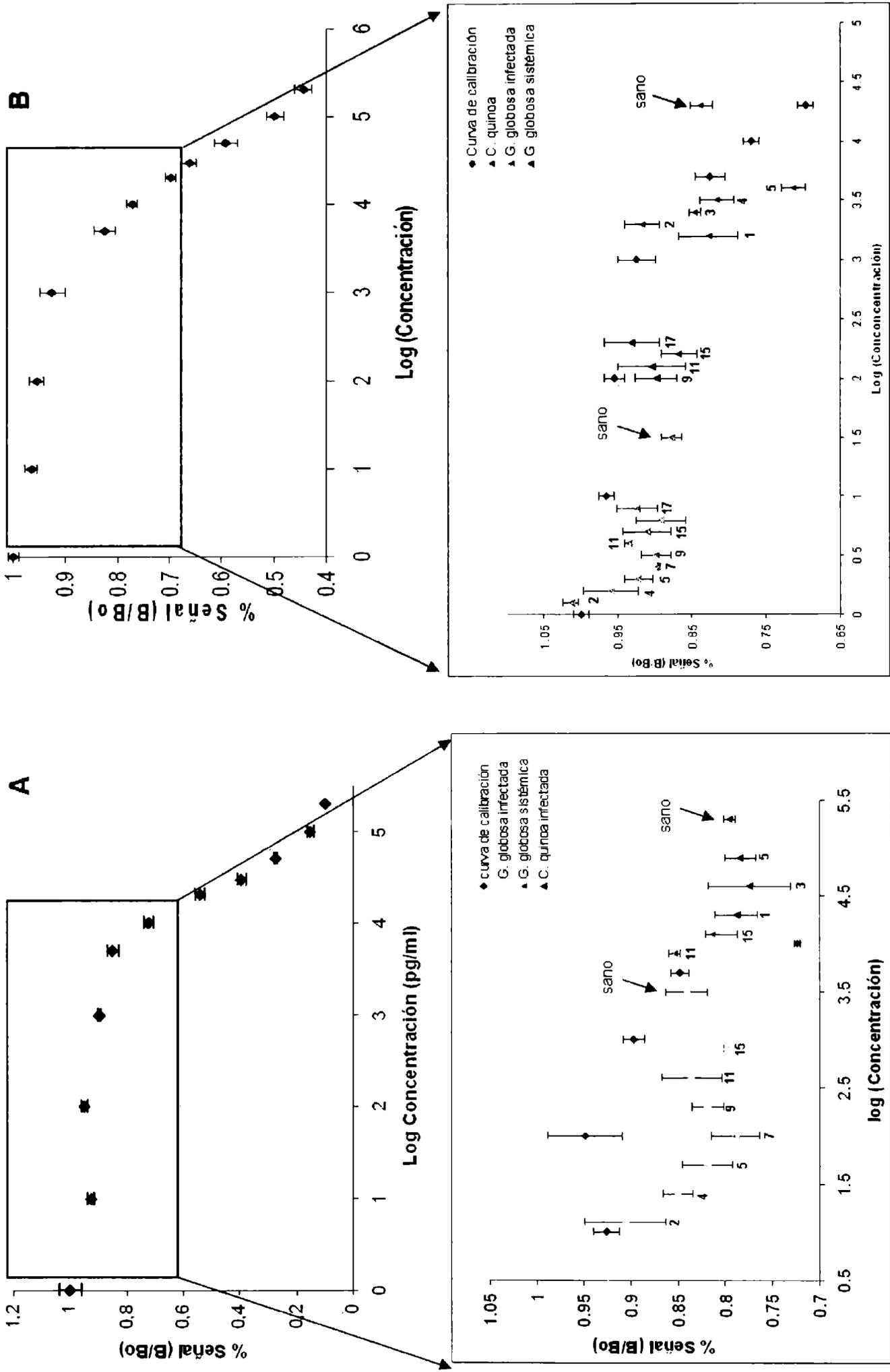


Figura 4. Elisa competitivo secuencial para la detección de la proteína 24K (A) y la proteína 54K (B) en muestras de hojas infectadas de *Gomphena globosa* y *Chenopodium quinoa* para el análisis de la presencia de las proteínas virales durante el curso de la infección de CPsV. Cada punto se determinó por triplicado. Las barras indican la desviación estándar. Los números indican los días transcurridos desde la inoculación, al momento de la toma de muestra.

Del mismo modo, en el ORF que codificaría para la proteína 54K (RNA2) de CPsV, Sanchez de la Torre y colaboradores (2002) han encontrado una NLS bipartita. Dichas señales también están presentes en la proteína N de los virus negativos no segmentados que replican en el núcleo como *Sonchus yellow net virus*, SYNV (Martins *et al.*, 1998) y *Borna disease virus* (Pyper y Gartner, 1997).

El análisis de la secuencia publicada de la proteína 55K de MiLV mediante el programa PSORT reveló una NLS (²⁷⁴KKLVGEVNKRIEKKKGK²⁹²) mientras que el análisis realizado en la secuencia 50K de LRNV no reportó la presencia de ninguna secuencia de direccionamiento nuclear.

Además de la entrada al núcleo mediada por NLS, las proteínas se exportan desde el núcleo, para lo cual, es requerida una señal de exportación nuclear (NES, por *nuclear export signal*). Estas señales han sido identificadas en proteínas de transporte al núcleo de células y virus animales. En general, la secuencia NES es un segmento hidrofóbico relativamente corto (entre 10-13 aminoácidos) a menudo rico en residuos de leucinas, el cual no es procesado después que se ha completado la exportación y es funcionalmente independiente de su posición en la secuencia proteica (Lazarowitz y Beachy, 1999). En virus de plantas, una de las NESs mejor descritas es la de BR1, una proteína de lanzadera nuclear (NSP por *nuclear shuttle protein*) de *Squash leaf curl virus* (SLCV), un begomovirus bipartito, la cual es muy similar en sus características a otras NESs eucarióticas y virales (Krichevsky *et al.*, 2006). Aunque las secuencias NES no posee un motivo conservado, se deduce un consenso L X1-2-3/ (F,I,L,V,M) X 1-2-3 (L,I) X (L,I) (Sekimoto *et al.*, 2005).

Se realizó el análisis de las secuencias 24K, 48K y 54K de CPsV usando el software online de predicción NetNES (<http://www.cbs.dtu.dk/index.shtml>). Se determinó la presencia de una probable NES, ¹⁵⁶LKCLKIIS¹⁶⁴ presente en el carboxilo terminal de la secuencia 24K de CPsV. El mismo análisis fue realizado con las secuencias publicadas de otros Ophiovirus, 25K de MiLV y 22K de LRNV. En estas proteínas no se ha encontrado ninguna secuencia NES significativa. Sin embargo, cuando el análisis se extendió a los otros ORFs presentes en estas especies se pudo determinar la presencia de una NES (⁵³LRISHILL⁶¹) en la probable proteína 10,6K presente en el RNA 4 de MiLV. La tabla 1 muestra el alineamiento de secuencia de las predichas NES de 24K de CPsV y de 10,6K de MiLV con otras NES caracterizadas. Como se muestra en la tabla, existe similitud entre las secuencias NES de estos Ophiovirus y las NES bien estudiadas como es la del inhibidor de la proteína quinasa A (PKI) (Wen *et al.*, 1995), el factor de transcripción III A (TFIIIA) (Fridell *et al.*, 1996), BR1 de SLCV (Ward y Lazarowitz, 1999), la proteína Rev de HIV (Human immunodeficiency virus) (Fischer *et al.*, 1995; Pollard y Malim, 1998, Rhee *et al.*, 2000) y la proteína βC1 asociada con BYVND (Bhendi yellow vein mosaic disease) (Kumar *et al.*, 2006).

TABLA 1 Alineamiento de secuencia de las NES de 24K de CPsV y de 10,6K de MiLV con otras NES bien caracterizadas

TFIIIA (<i>X.laevis</i>)	L--VLDK-ITDQ
TFIIIA (<i>Bufo americanus</i>)	LP-VLEN-ITLK
Protein kinase A inhibitor	LALKLAG-LDI-
HIV-2 Rev	LQ-HLQG-ITIQ
SLCV BR1	LEKDLL--IDLH
BYVNDβC1	LEEDLIHMVDI-
MiLV 10.6K	LR--LSH-LLL-
CPsV 24K	LK-KLK--TIS
	: : : :
Consenso	LX _(1,2,3) F, I, L, V, M X _(1,2,3) L, I X L, I

A fin de confirmar experimentalmente si las secuencias de direccionamiento NES y NLS presentes en las proteínas 24K y 54K, respectivamente, podrían ser funcionales *in vivo* se realizaron los experimentos de expresión transitoria de las proteínas virales fusionadas a proteínas fluorescentes que se detallan en los siguientes apartados.

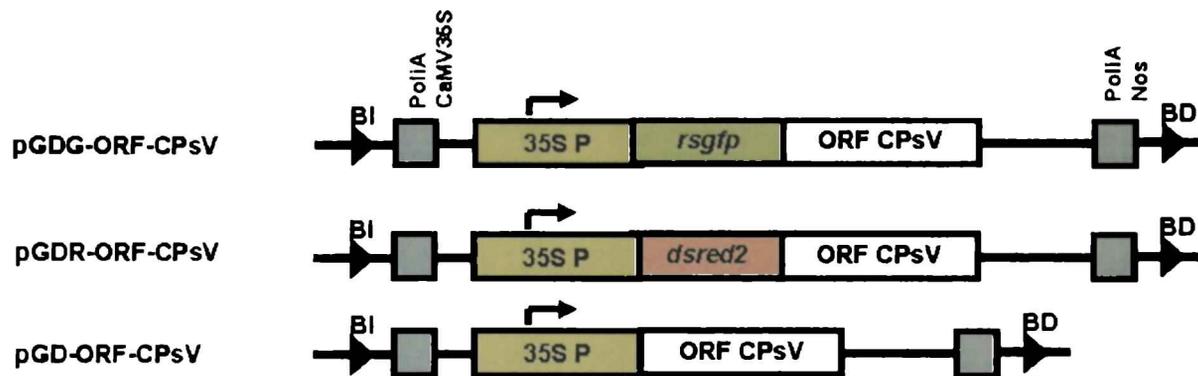
III. Expresión transitoria de las proteínas 24K, 48K y 54K fusionadas a GFP y dsRed en hojas de *Nicotiana benthamiana*

Al inicio de la tesis, la obtención de anticuerpos contra las proteínas 24K, 48K y 54K, se pensaron como herramientas, entre otras, para experimentos de inmunolocalización de dichas proteínas en tejidos infectados, expresiones transitorias y plantas transgénicas. Los resultados obtenidos con los antisueros policlonales obtenidos y las dificultades encontradas en la detección de las proteínas 24K, 48K y 54K determinaron que se emprendiera la localización celular de estas proteínas mediante la fusión a proteínas marcadoras GFP y dsRed, su expresión transitoria mediante agroinfiltración y visualización por microscopía confocal. En los siguientes apartados se describen los experimentos realizados a fin de confirmar la expresión de las proteínas virales fusionadas y sin fusionar en hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas.

III. A. Análisis mediante *western blot* de la expresión transitoria de las proteínas 24K, 48K y 54K en agroinfiltraciones de hojas de *N. benthamiana*.

Los plásmidos binarios que contienen los ORF para las proteínas 24K, 48K y 54K fusionadas a GFP y dsRed (Esquema 1), y de las proteínas sin fusionar introducidos en *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Ver punto III en el Capítulo 1) fueron usados en ensayos de agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* (ver Materiales y Métodos). Se realizaron extracciones de proteínas totales del material foliar agroinfiltrado a 2, 3 y 4 dpi

(días post-infiltración). A continuación se detallan los resultados obtenidos para el análisis de expresión de las proteínas virales y sus respectivas fusiones.



Esquema 1. Arriba, diagrama del T-DNA de las construcciones de la serie pGD utilizadas para la expresión transitoria de las proteínas virales de CPsV. Abajo, agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* utilizando *A. tumefaciens* LBA4404 conteniendo los plásmidos binarios que expresan las proteínas 24K, 48K y 54K fusionados a GFP y dsRed (Foto: gentileza del Lic. Eduardo Peña, IBBM).

III. A. 1) Proteína 48K

En la figura 5 se muestra el *Western blot* que permitió confirmar la expresión de la proteína 48K en las muestras provenientes de hojas agroinfiltradas con el plásmido binario pGD-48K y las fusiones expresadas de los plásmidos pGDG-48K y pGDR-48K utilizando el suero específico anti-48K. También fueron detectadas las proteínas de fusión cuando se efectuó el revelado utilizando un suero comercial anti-GFP (Figura 6) y anti-DsRed (Figura 7).

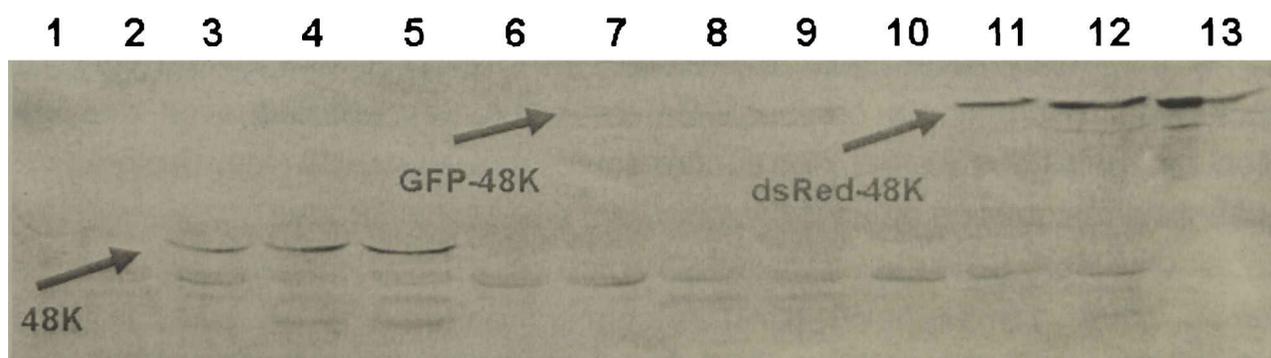


Figura 5. *Western blot* de muestras de *N. benthamiana* agroinfiltradas con los cultivos que llevan los plásmidos binarios pGD-48K, pGDG-48K, pGDR-48K, revelado con el suero anti-48K. Calle 1, *C. quinoa* infectada. Calle 2, hojas agroinfiltradas con el plásmido pGD. Calles 3 a 5: agroinfiltradas con el plásmido pGD-48K recolectadas a 2, 3 y 4 dpi, respectivamente. Calle 6, hojas agroinfiltradas con el plásmido pGDG. Calles 7 a 9, agroinfiltradas con pGDG-48K recolectadas a 2, 3 y 4 dpi, respectivamente. Calle 10, hojas agroinfiltradas con el plásmido pGDR. Calles 11 a 13, agroinfiltradas con el plásmido pGDR-48K recolectadas a 2, 3 y 4 dpi, respectivamente.

III. A. 2) Proteínas 24K y 54K

En el caso de las proteínas 24K y 54K, y sus respectivas fusiones, no pudieron detectarse por *Western blot* usando tanto los sueros específicos para cada proteína (datos no mostrados) como con los sueros comerciales (Figuras 6 y 7). Dado que los plásmidos obtenidos fueron secuenciados a fin de determinar el correcto clonado de los ORF de CPsV (ver punto IV del Capítulo 1), la posibilidad que los péptidos no se expresen o generen la terminación temprana de la traducción por la presencia de codones *stop* debería ser descartada.

Otra causa que justifique este resultado podría ser atribuida a la inestabilidad de la expresión de las proteínas 24K y 54K en estos ensayos transitorios, lo cual podría llevar a la degradación de los péptidos GFP o DsRed, o a la inestabilidad de los mRNA correspondientes.

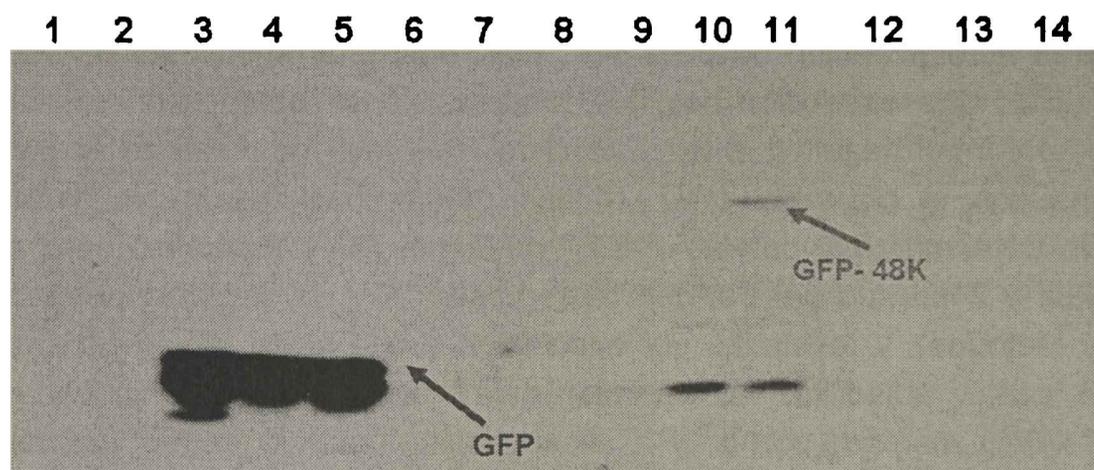


Figura 6. *Western blot* de muestras de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con los cultivos que llevan los plásmidos pGDG, pGDG-24K, pGDG-48K y pGDG-54K. Calles 1 y 2, hojas agroinfiltradas con *buffer* recolectadas a 2 y 3 dpi, respectivamente. Calles 3 a 5, hojas agroinfiltradas con el plásmido pGDG recolectadas a 2, 3 y 4 dpi, respectivamente. Calles 6 a 8, hojas agroinfiltradas con el plásmido pGDG-24K recolectadas a 2, 3 y 4 dpi, respectivamente. Calles 9 a 11, hojas agroinfiltradas con el plásmido pGDG-48K recolectadas a 2, 3 y 4 dpi, respectivamente. Calles 12 a 14, hojas agroinfiltradas con el plásmido pGDG-54K recolectadas a 2, 3 y 4 dpi, respectivamente. La membrana fue incubada con el suero anti-GFP y revelada con luminol.

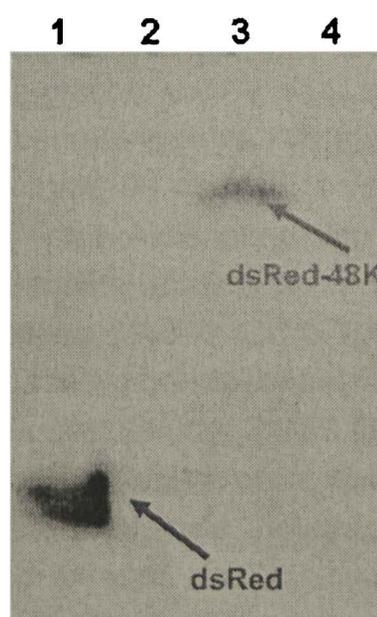


Figura 7. *Western blot* de muestras de hojas *N. benthamiana* agroinfiltradas con los cultivos que llevan los plásmidos pGDR, pGDR-24K, pGDR-48K y pGDR-54. Calle 1, hojas agroinfiltradas con el plásmido pGDR recolectadas a 3 dpi. Calle 2, hojas agroinfiltradas con el plásmido pGDR-24K recolectada a 3 dpi. Calle 3, hojas agroinfiltradas con el plásmido pGDR-48K recolectadas a 3 dpi. Calle 4, hojas agroinfiltradas con el plásmido pGDG-54K recolectadas a 3 dpi. La membrana fue incubada con suero anti dsRed y revelada con cuminol

III. B. Análisis de la expresión de los RNA mensajeros 24k y 54k en agroinfiltraciones de hojas de *N. benthamiana*.

Se analizó mediante *Northern blot* la presencia de los mRNAs 24K, 48K y 54K de muestras de agroinfiltraciones de los plásmidos binarios pGD-24k, pGD-48K y pGD-54K y la co-infiltración de los tres plásmidos, como se detalla en Materiales y Métodos. Dado que se había confirmado la expresión de la proteína 48K en las agroinfiltraciones con el plásmido pGD-48K, dichas muestras fueron incluidas como control del experimento. Se colectaron las hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana* a 3 dpi y se realizó la extracción del RNA total (ver Materiales y Métodos) el cual se resolvió en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes. Dos geles fueron transferidos por capilaridad a membranas de nylon, uno conteniendo las muestras provenientes de la agroinfiltración de pGD-24K, pGD-48K y la co-infiltración con los tres plásmidos y otro gel conteniendo las muestras de la agroinfiltración de pGD-54K, pGD-48K y la co-infiltración. Como control positivo se utilizó una extracción de RNA total realizada sobre lesiones locales de *C. quinoa* y como control negativo la extracción de RNA total de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con el plásmido pGD. Dichas membranas fueron hibridadas con un fragmento de DNA marcado con α^{32} -P-CTP mediante PCR específico para el gen 24k (*primers* 24kdir y 24krev) o para el gen 54k (*primers* A y B), según correspondiera (ver Materiales y Métodos), y reveladas por exposición a una placa radiográfica. Luego que decayera la señal radiactiva, las mismas membranas fueron re-hibridadas con un fragmento de DNA marcado con α^{32} -P-CTP específico para el gen 48k (*primers* CPV1 y CPV2).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8. Cuando se reveló con las sonda 24K o 54K no se obtuvo señal en las muestras de RNAs de las agroinfiltraciones de pGD-24k o pG-54K o de la co-infiltración (Figura 8 A y C). Los controles de planta infectada resultaron positivos confirmando la especificidad de la sonda utilizada. Cuando las membranas fueron incubadas con la sonda 48K, se obtuvo señal positiva en las muestras de la agroinfiltración con el plásmido pGD-48K y en la co-infiltración, mostrando que el RNA mensajero para 48K estaba presente en dichas muestras (Figura 8 B y D)

Estos resultados parecen indicar que la expresión de los mRNAs 24k y 54k es nula o muy baja lo que reflejaría la dificultad en la detección de las proteínas mediante *western blot* y que la expresión conjunta del RNA mensajero 48k y, por consiguiente, de la proteína 48K no estabiliza la expresión de los RNAs 24k o 54k en expresiones transitorias en *N. benthamiana*.

Resultados preliminares de ensayos de RT-PCR utilizando RNA total tratado con DNAsa, extraído de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con los plásmidos binarios pGD-24K, pGDG-24K, pGDR-24K, pGD-54K, pGDG-54K o pGDR-54K, parecen mostrar que los mensajeros de las agroinfiltraciones están presentes (datos no mostrados).

En el 2003, Voinnet y colaboradores mostraron que el PTGS es una respuesta general de la planta que puede limitar la eficiencia de la expresión transitoria mediada por *Agrobacterium*. Además demostraron que la co-expresión transitoria de proteínas

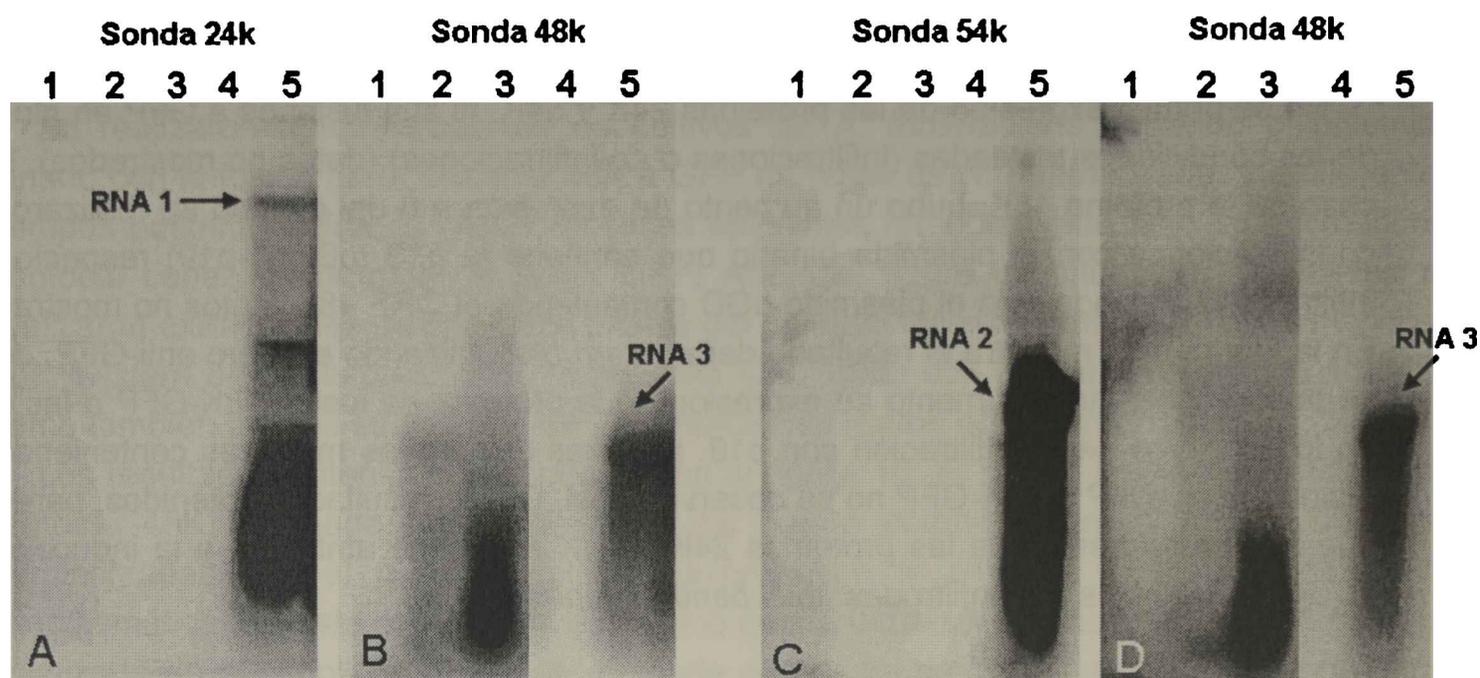


Figura 8. Detección mediante *Northern blot* del RNA mensajero expresados en tejido foliar de *N. benthamiana* agroinfiltrado con los cultivos que llevan los plásmidos pGD-24K, pGD-48K y pGD-54K. Panel A, membrana revelada con una sonda para 24k. Panel C, membrana revelada con una sonda para 54k. Panel B y D, rehibridación con una sonda para 48k de las membranas A y C, respectivamente. Calle 1: pGD-24K (A) y pGD-54K (C), calle 2: pGD-48K, calle 3: co-infiltración de pGD-24k, pGD-48K y pGD-54K, calle 4: pGD, calle 5: RNA total de *C. quinoa* infectada con CPsV. Los RNAs virales se indican con flechas.

supresoras de PTGS apaciguaba la respuesta de silenciamiento en *N. benthamiana*. De las proteínas supresoras que utilizaron, encontraron que la más eficiente para mediar esta respuesta fue la proteína p19 codificada por *Tomato bushy stunt virus* (TBSV). En dichos ensayos la expresión de proteínas de diferentes virus era incrementada con la expresión conjunta de p19, llegando a extenderse su expresión hasta la senescencia de la hoja agroinfiltrada.

Así, todos estos datos tomados en conjunto, podrían indicar que la baja expresión de las proteínas 24K y 54K y sus RNAs mensajeros podía atribuirse a la inducción de PTGS en las hojas agroinfiltradas con los plásmidos binarios. Por lo tanto, para evitar, si lo hubiera, un mecanismo de PTGS y, por lo tanto, la baja expresión de los RNA mensajeros de los ORFs 24K y 54K se realizaron los experimentos que se detallan en el siguiente apartado.

III. C. Ensayos de co-infiltración con la proteína supresora p19 de TBSV

Se hicieron ensayos de co-infiltración utilizando un plásmido binario conteniendo el ORF de la proteína p19 de TBSV (ver Materiales y Métodos) y los plásmidos binarios conteniendo las proteínas de CPsV y sus fusiones a GFP. Para ello se co-agroinfiltraron hojas de 3 plantas por cada construcción utilizada, como se detalla en Materiales y Métodos. A los 3 y 6 dpi se colectaron muestras de cada planta y se realizó la extracción de proteínas como se detalla previamente. Las muestras fueron cuantificadas por observación en gel de poliacrilamida. Mediante *western blot* y utilizando los sueros

específicos anti-24K, anti-48K, anti-54K y anti-GFP se realizó el análisis de las proteínas virales y sus respectivas fusiones.

No se obtuvo expresión de las proteínas 24K y 54K, ni sus fusiones a GFP en ninguna de las condiciones testeadas (infiltraciones o co-infiltraciones) (datos no mostrados). En el caso de la proteína 48K, hubo un aumento de expresión a 6 dpi cuando se realizaron las co-infiltraciones con el plásmido binario que contiene la p19 (pBin61-p19) respecto a la infiltración utilizando solo el plásmido pGD conteniendo el ORF 48K (datos no mostrados). En la Figura 9 se muestra el resultado del *western blot* utilizando el suero anti-GFP, donde se puede observar el aumento de expresión de la proteína de fusión 48K-GFP a las 6 dpi en los ensayos de co-infiltración con p19, mientras que en las muestras conteniendo las fusiones 24K-GFP o 54K-GFP no se observa señal. De los resultados obtenidos, parecería que la baja expresión de las proteínas 24K y 54K no puede atribuirse a la inducción de PTGS en las hojas agroinfiltradas de *N.benthamiana*.

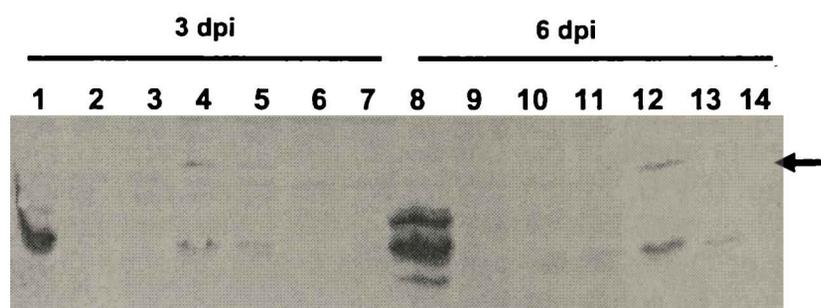


Figura 9. *Western blot* de muestras co-agroinfiltradas con los plásmidos pGDG-24K, pGDG-48K y pGDG-54K y pBin61-p19 utilizando un suero anti-GFP a 3 dpi y 6 dpi. Calles 1 y 8: pBin61-p19. Calles 2 y 9: pGDG-24. Calles 3 y 10: pGDG-24K y pBin61-p19. Calles 4 y 11: pGDG-48K. Calles 5 y 12: pGDG-48K y pBin61-p19. Calles 6 y 13: pGDG-54K. Calles 7 y 14: pGDG-54K y pBin61-p19. La flecha indica la proteína de fusión GFP-48K.

IV. Localización sub-celular de la proteína 48K en hojas de *N. benthamiana* mediante microscopía confocal.

El estudio de la localización de las proteínas virales permite, no solo conocer la ubicación de dichas proteína en la célula sino inferir la función que puede cumplir dicha proteína durante la replicación viral. Así mismo, herramientas que permiten analizar la interacción *in vivo* entre diferentes proteínas del virus y su re-localización, o su interacción con proteínas del huésped, han sido útiles para el estudio del ciclo viral (Goodin *et al.*, 2001, Ren *et al.*, 2005, Tsai *et al.*, 2005, Kumar *et al.* 2006).

En el 2001, Goodin y colaboradores desarrollaron la serie de plásmidos binarios pGD, los cuales utilizaron para generar fusiones de proteínas virales de SYNIV a proteínas reporteras con el objetivo de estudiar la expresión y co-localización de dichas proteínas en hojas agroinfiltradas:

En el siguiente apartado se describen los resultados obtenidos aplicando esta metodología al estudio de la localización subcelular de la proteína 48K de CPsV.

IV. A. Observación de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas mediante microscopía confocal

Se realizaron agroinfiltraciones de cultivos de *A. tumefaciens* portando el plásmido binario con la fusión de la proteína 48K a GFP en hojas de *N. benthamiana*, y a diferentes tiempos post-infiltración, la capa de células epiteliales fue observada bajo un microscopio confocal capaz de detectar la señal GFP. Además, sobre las muestras analizadas se realizaron extracciones de proteínas totales del material foliar agroinfiltrado, confirmándose por *Western blot* la expresión de la proteína 48K, tanto con el suero específico anti-48K como también con los sueros anti-GFP y anti-DsRed (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 10. El patrón de fluorescencia de la proteína 48K fusionada es indistinguible del patrón obtenido para el control de hojas agroinfiltradas con el plásmido pGDG, expresando la proteína GFP de localización citoplasmática. De esta manera, se determinó que la proteína 48K fusionada a GFP estaba localizada en el citoplasma, lo cual, indicaría que dicha proteína no posee ninguna señal de direccionamiento subcelular que no haya sido detectada por el análisis de su secuencia aminoacídica. Asimismo, otro integrante del grupo de trabajo de Virus Vegetales del IBBM continuó el estudio de la localización de la proteína de cubierta viral mediante fraccionamiento subcelular confirmando su localización citoplasmática en hojas infectadas con CPsV (Eduardo Peña, comunicación personal).

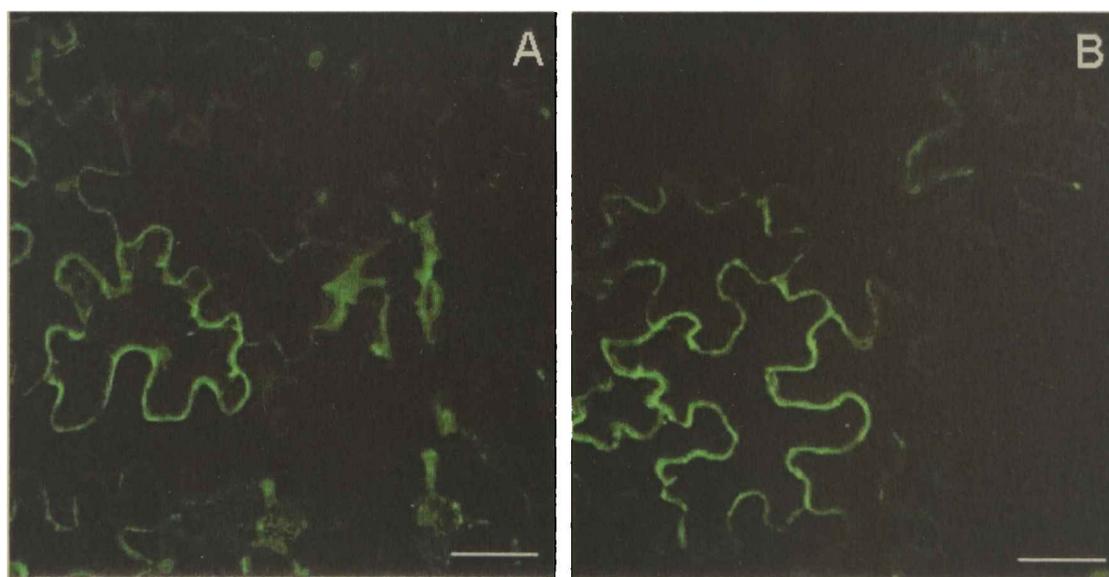


Figura 10. Expresión de proteínas de fusión en hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con el plásmido pGDG (A) y con el plásmido pGDG-48K (B) 2dpi. Las observaciones fueron realizadas con un microscopio confocal de escaneo laser (Nikon C1). La barra equivalente a 50 micrones.

CONCLUSIONES

Se determinó que la proteína 48K en las hojas de *G. globosa* inoculadas es expresada antes de la aparición de los síntomas locales y que el virus se movilizó a hojas superiores antes de manifestar síntomas. En cambio, en *C. quinoa*, hospedante local, la proteína se detectó al mismo tiempo que aparecían los síntomas.

El método ELISA competitivo secuencial no permitió detectar las proteínas 24K y 54K durante el período de infección analizado, sugiriendo que dichas proteínas podrían ser no estructurales y expresarse en muy bajas concentraciones durante el ciclo de infección de CPsV.

El análisis de la secuencia del ORF 24K de CPsV determinó la presencia de una secuencia de exportación nuclear (NES). Cuando se extendió el análisis a otros ORF de virus del género *Ophiovirus* también se encontró una NES en la proteína 10,6 de MiLV. Dichas secuencias poseen similitud con otras NES bien caracterizadas sugiriendo una localización nuclear de alguna de estas proteínas.

Mediante agroinfiltraciones con plásmidos binarios desarrollados en esta tesis, se pudo expresar la proteína 48K de CPsV, así como sus fusiones a las proteínas marcadoras GFP y DsRed. Tanto para la proteína 24K como la proteína 54K y sus fusiones no se detectaron en ensayos de expresión transitoria. Aunque resultados preliminares mediante RT-PCR resultaron positivos, no pudieron detectarse sus RNA mensajeros correspondientes mediante *Northern blot*. La expresión conjunta de una proteína supresora del PTGS, la proteína p19 de TBSV, no favoreció la expresión de dichos péptidos.

Mediante visualización por microscopia confocal, se determinó que la proteína 48K de CPsV fusionada a GFP y expresada transitoriamente en hojas de *N. benthamiana*, se localiza en el citoplasma. Esto indicaría que dicha proteína no posee ninguna señal de direccionamiento subcelular.

CAPÍTULO 5. Detección de CPsV aplicando el TAS-ELISA -HRP

- I. Ensayo de dilución a punto final para la detección de CPsV**
- II. Comparación de los ensayos TAS-ELISA aplicados a muestras de campo**
- III. Presencia de CPsV en la región citrícola del Noroeste Argentino**

INTRODUCCIÓN

En Argentina, los cítricos son producidos principalmente en las regiones del NEA y del NOA del país. Estas dos áreas tienen diferentes climas y tipos de suelo, y por lo tanto, son cultivadas diferentes especies de cítricos y variedades. En la región del NEA se cultivan principalmente mandarinas y naranjas mientras que en la región del NOA la producción de pomelo es importante en el norte (Provincias de Salta y Jujuy) y una gran área de producción de limones ha sido desarrollada en la Provincia de Tucumán. Argentina es el país que exporta más limones en el mundo y el 95% de la producción proviene de la provincia de Tucumán (Ing. Agr. Víctor Juan Luppiz. Dirección de Agricultura, SAGPYA).

En la región del NEA, la psorosis es epidémica, y en la región del NOA, la enfermedad está presente pero no es comúnmente observada en los huertos. Esto último ha sido reportado en la provincia de Tucumán y en la región del NOA por diferentes investigadores desde 1938 (Fawcett, 1938; Fawcett, 1939; Fernández Valiela, 1961; Foguet, 1966). Al inicio, el diagnóstico en el campo era realizado solamente por la visualización de los síntomas y los árboles enfermos eran eliminados, limitando la dispersión de la enfermedad en la región de Tucumán. Recientemente, unos pocos árboles aislados con síntomas de psorosis fueron observados en huertos comerciales de naranja en la provincia de Tucumán, mientras que en la provincia de Salta los síntomas son más frecuentemente observados en huertos de naranjo antiguos.

Durante los últimos años, se han desarrollado diferentes métodos inmunológicos aplicados a cítricos infectados con CPsV en búsqueda de un procedimiento rápido de detección del agente causal de psorosis (Martín *et al.*, 2004). El *indexing* biológico es realizado por inoculación de plantas de cítrico indicadoras y luego testeadas por protección cruzada con un aislamiento severo (Roistacher y Calavan, 1965; Roistacher 1991, Roistacher *et al.*, 1993). Varios primers han sido diseñados para la detección de CPsV por RT-PCR generando un método alternativo para el diagnóstico (Barthe *et al.*, 1998; Legarreta *et al.*, 2000). En 1997, García y colaboradores desarrollaron un ELISA doble sándwich (DAS-ELISA) para la detección de CPsV. Para ello, obtuvieron un anticuerpo policlonal (A322) a partir de la inyección de conejos con virus parcialmente purificado. Luego, este anticuerpo, fue utilizado en un inmunoensayo desarrollado por Alioto *et al.*, 1999, el ELISA triple sándwich (TAS-ELISA) en el cual también se usó un anticuerpo monoclonal, el MAbs 13C5 (IgG) desarrollado por Alioto. Martín *et al.*, en 2002, reportó la comparación del TAS-ELISA desarrollado por Alioto con otros métodos incluyendo *indexing* biológico, hibridación molecular y RT-PCR. Usando el policlonal A322 y el antisuero MAbs 13C5, el TAS-ELISA es muy sensible resultando en niveles de detección comparables a los obtenidos por RT-PCR.

Actualmente, el TAS-ELISA y la RT-PCR son los métodos más rápidos y confiables para detectar la presencia del virus en árboles presumiblemente infectados proveniente del campo (Martín *et al.*, 2004).

En este trabajo se ha desarrollado un nuevo TAS-ELISA (TAS-ELISA-HRP) más rápido aplicado a muestras con baja concentración de proteína 48K, el cual presenta un límite de detección menor que el TAS-ELISA tradicional (TAS-ELISA-AP) descrito por Alioto (ver punto IV del Capítulo 2).

En los siguientes apartados se describen los resultados obtenidos de la comparación del método TAS-ELISA-AP con el TAS-ELISA-HRP, utilizando el anticuerpo policlonal A376 aplicados a extracto de cítrico infectado proveniente del invernáculo y a muestras de campo provenientes de huertos de cítricos de la región del NOA.

Por último se compara el TAS-ELISA-HRP con los métodos comúnmente utilizados para la detección de CPsV (desarrollo de síntomas en plantas indicadoras, Protección cruzada y RT-PCR) en muestras extraídas de árboles sintomáticos presentes en huertos de las provincias de Tucumán y Salta.

I. Ensayo de dilución a punto final para la detección de CPsV

Los dos métodos de TAS-ELISA fueron comparados realizando una dilución seriada de extracto de cítrico infectado con CPsV en buffer PBS-T. En la figura 1 se muestran los resultados obtenidos para las lecturas de densidad óptica del método TAS-ELISA-AP a 2 horas y a 24 horas de agregado del sustrato y a 30 minutos de agregado del reactivo para el TAS-ELISA-HRP, normalizadas por el valor de absorbancia obtenido para el extracto de cítrico sano (I/S). Todas las determinaciones se realizaron en la misma microplaca de ELISA. A altas concentraciones de antígeno (diluciones por encima de 1:80) tanto el TAS-ELISA-HRP como el TAS-ELISA-AP medido a 2 y 24 hs detectan la proteína de la cápside con el mismo nivel de sensibilidad. Sin embargo, a diluciones mayores del extracto (1:320), el TAS-ELISA-HRP muestra una relación de I/S de 3 (considerada como muestra positiva, ver Capítulo 2) mientras que el TAS-ELISA-AP presenta una relación de 2,3 (considerada como muestra negativa). En el caso de los valores obtenidos para el TAS-ELISA-AP medido a 2 hs las diferencias se hacen todavía más notorias, siendo la relación I/S menor a 3 usando diluciones menores a 1:40 (datos no mostrados).

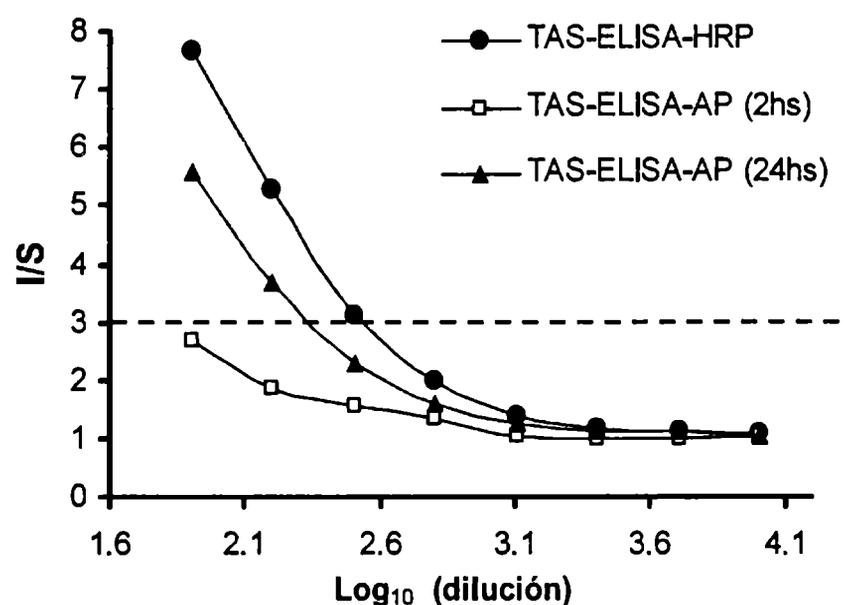


Figura 1. Comparación del punto final para la detección de CPsV mediante TAS-ELISA en plantas de cítrico infectadas. I/S: relación del valor de DO infectado (I) sobre el valor de DO sano (S). (—□—) TAS-ELISA-AP (2hs); (—▲—) TAS-ELISA-AP (24hs) y (—●—) TAS-ELISA-HRP.

II. Comparación de los ensayos TAS-ELISA aplicados a muestras de campo

Los resultados obtenidos cuando ambos métodos de TAS-ELISA fueron aplicados a muestras de campo y de invernadero se muestran en la Tabla 1. Tanto para el TAS-ELISA-HRP como para el TAS-ELISA-AP incubado a 24hs, presentaron resultados coincidentes para todas las muestras analizadas, detectando la presencia del virus. Sin embargo, es claro que las relaciones I/S entre HRP/AP fueron mayores a 2 hs de incubación en todas las muestras positivas (entre 2,5 y 5,1 veces mayores para el TAS-ELISA-HRP).

Como se mostró anteriormente, al comparar ambos métodos en la misma microplaca en la dilución seriada de extracto de cítrico infectado, claramente se incrementa la sensibilidad del TAS-ELISA-HRP respecto al TAS-ELISA-AP. Esta diferencia puede ser importante cuando una muestra es dudosa, es decir, cuando se encuentra en el límite de detección del método. En el caso de muestras de campo, el TAS-ELISA-HRP detecta con esencialmente la misma sensibilidad que el TAS-ELISA-AP a 24h. Después de 30 minutos de incubación con el sustrato, las lecturas del TAS-ELISA-HRP resultan al menos dos veces mayores que las lecturas obtenidas con el método TAS-ELISA-AP después de 2 hs de incubación.

En 1999, usando el TAS-ELISA-AP, Alioto analizó 119 muestras de campo encontrando dos grupos de muestras. Una, claramente positiva con valores de I/S entre 12 y 3000, y otra claramente negativa ($I/S \leq 2$). Aunque las muestras de campo analizadas en esta tesis también resultaron en valores de I/S muy altos, podrían llegar a dar negativas cuando se analizan por el método TAS-ELISA-AP si la concentración viral presente en dichas muestras fuera mucho menor. Para el caso de las plantas transgénicas 48K el nivel de expresión resultó muy bajo y solo aplicando el TAS-ELISA-HRP se lograron encontrar diferencias significativas con la muestra de planta no transgénica.

III. Presencia de CPsV en la región citrícola del Noroeste Argentino

El *indexing* biológico, expresión de síntomas en plantas indicadoras, ha sido aplicado de rutina en el diagnóstico de psorosis. Este método requiere de habilidad para el manejo de las plantas indicadoras y para la observación de los síntomas, siendo además, un procedimiento lento y costoso. A fin de aplicar y comparar el TAS-ELISA-HRP con el antiguo método TAS-ELISA-AP en muestras de campo, se desarrolló el *indexing* biológico (ver Materiales y Métodos) junto con el análisis molecular por RT-PCR (usando los *primers* CPV1 y CPV2) de 26 muestras extraídas de árboles con severos síntomas presentes en huertos de las provincias de Tucumán y Salta.

Los cuatro métodos aplicados (desarrollo de síntomas en plantas indicadoras, protección cruzada, TAS-ELISA-HRP y RT-PCR) han dado los mismos resultados para todas las muestras analizadas. En la Tabla 2 se muestran los resultados de las muestras 1 a 16 (experimento 1). Las muestras 17 a 31 (experimento 2) fueron negativos (datos no mostrados) aunque todas ellas han mostrado síntomas de descamación del tronco (*bark scaling*) en el campo.

Varias de estas muestras han manifestado síntomas de psorosis B (1, 4 y 7), mientras que las muestras 10 y 11 manifestaron síntomas de hoja de roble, el cual ha sido descrito

como un síntoma asociado a *concave gum*, enfermedad que antiguamente era considerada del “grupo psorosis”. El ensayo de protección cruzada contra el aislamiento de psorosis B fue negativo para ambas muestras, indicando que estos árboles no estaban infectados con CPsV. Las muestras de invernadero (15, 16, 12 y 14) tomadas del *indexing* biológico de los aislamientos 2, 3, 7 y 8 respectivamente, dan los mismos resultados, confirmando los obtenidos para las plantas originales y demostrando la especificidad de los métodos para detectar CPsV.

La presencia de CPsV también fue analizada en muestras extraídas de árboles asintomáticos vecinos a los árboles 1, 4 y 7 (muestras 2-3, 5-6 y 9, respectivamente) y además se analizó tejido extraído de plántulas provenientes del *indexing* biológico (muestras 12, 15 y 16). Todas las muestras resultaron negativas para CPsV. Notablemente, en el caso de la muestra 8 (tomada de un árbol vecino del árbol de donde se tomó la muestra 7) y la muestra 14 (tomada del *indexing* biológico de la muestra 8), los ensayos biológicos y moleculares fueron negativos aun cuando habían sido observados síntomas de descamación del tronco, como así también en las muestras 17 a 31, revelando que estos síntomas, similares a los producidos por psorosis, parecen ser causados por un agente no determinado, diferente a CPsV. En España se ha reportado la aparición de árboles con síntomas de descamado similares a los producidos por psorosis, que han resultado negativos cuando se realizó el análisis para CPsV mediante *indexing* biológico y los métodos serológicos TAS-ELISA y DTBIA (*Direct tissue blot immunoassay*) (Martín *et al.*, 2002a) y/o RT-PCR, hibridación molecular y microscopía electrónica (Martín *et al.*, 2002b, 2004). Más aún, se han reportado casos similares en India, Florida, República Dominicana, Brasil, Sudáfrica y en la Polinesia (Martín *et al.* 2004).

En la región del NEA la psorosis es una enfermedad epidémica y árboles con descamación en el tronco son encontrados frecuentemente. Varios reportes sugieren que esta enfermedad puede ser transmitida en la región del NEA por un vector desconocido (Beñatena y Portillo, 1984; Danós, 1990). Un artículo reciente han sido publicado describiendo la presencia de psorosis en Texas, USA (Palle *et al.*, 2004), otra región del mundo donde psorosis parece dispersarse naturalmente por un vector de suelo (*Olpidium brassicae*); sin embargo, se trata de un artículo preliminar y deberán realizarse más estudios a fin de identificar el vector asociado a esta dispersión natural. Los resultados de esta tesis confirman que psorosis esta presente en la región cítrica de Tucumán, aunque su incidencia es menor que en la región del NEA. Los árboles vecinos a muestras positivas (1, 4 y 7) también han sido analizados y produjeron resultados negativos para CPsV indicando que, hasta ahora, en estos huertos la enfermedad no ha sido transmitida de árbol a árbol.

Tabla 1

Comparación del TAS-ELISA para la detección de la proteína de cubierta de CPsV en cítricos de campo y muestras de plantines provenientes de invernadero.

Experimento 1								
Muestra	TAS-ELISA-AP 2 hs		TAS-ELISA-AP 24 hs		TAS-ELISA-HRP		(I/S HRP)/(I/S AP)	
	OD	I/S	OD	I/S	OD	I/S	2 hs	24 hs
1	0.170 (0.010)	1.4	1.447 (0.030)	5.5	0.364 (0.002)	5.6	4	1
2	0.133 (0.011)	1.1	0.257 (0.005)	1	0.060 (0.005)	0.9	0.8	0.9
3	0.126 (0.011)	1	0.248 (0.012)	0.9	0.067 (0.006)	1	1	1.1
4	0.170 (0.015)	1.4	1.898 (0.552)	7.2	0.386 (0.010)	6	4.3	0.8
5	0.115 (0.003)	0.9	0.246 (0.007)	0.9	0.058 (0.002)	0.9	1	1
6	0.136 (0.029)	1.1	0.271 (0.030)	1	0.061 (0.002)	0.9	0.8	0.9
7	0.146 (0.008)	1.2	1.076 (0.320)	4.1	0.197 (0.014)	3	2.5	0.7
8	0.117 (0.005)	0.9	0.268 (0.025)	1	0.063 (0.003)	1	1.1	1
9	0.115 (0.003)	0.9	0.246 (0.002)	0.9	0.058 (0.003)	0.9	1	1
10	0.120 (0.004)	1	0.253 (0.008)	1	0.061 (0.006)	0.9	0.9	0.9
11	0.117 (0.007)	1	0.254 (0.030)	1	0.063 (0.006)	1	1	1
12	0.190 (0.018)	1.6	2.265 (0.663)	8.6	0.435 (0.006)	6.7	4.2	0.8
13	0.171 (0.004)	1.4	1.471 (0.046)	5.6	0.466 (0.015)	7.2	5.1	1.3
14	0.118 (0.004)	1	0.251 (0.001)	1	0.060 (0.002)	0.9	0.9	0.9
15	0.114 (0.006)	1	0.267 (0.022)	1	0.066 (0.008)	1	1	1
16	0.118 (0.008)	1	0.258 (0.016)	1	0.064 (0.002)	1	1	1
PBS	0.123 (0.005)	1	0.276 (0.009)	1	0.060 (0.004)	0.9	1.1	1.1
Cítrico Sano ^a	0.120 (0.012)		0.263 (0.012)		0.065 (0.002)			
Experimento 2								
17	0.110 (0.003)	0.9	0.280 (0.006)	1	0.108 (0.008)	1.1	1.2	1.1
18	0.132 (0.040)	1.1	0.283 (0.009)	1	0.114 (0.013)	1.2	1.1	1.2
19 ^a	0.110 (0.009)	0.9	0.293 (0.028)	1.1	0.103 (0.004)	1	1.1	0.9
20	0.112 (0.006)	0.9	0.281 (0.009)	1	0.103 (0.005)	1.1	1.2	1.1
21	0.108 (0.004)	0.9	0.271 (0.007)	1	0.099 (0.002)	1	1.1	1
22	0.111 (0.005)	0.9	0.278 (0.011)	1	0.099 (0.003)	1	1.1	1
23	0.109 (0.008)	0.9	0.270 (0.009)	1	0.098 (0.005)	1	1.1	1
24	0.108 (0.003)	0.9	0.272 (0.013)	1	0.101 (0.005)	1	1.1	1
25	0.105 (0.002)	0.8	0.268 (0.008)	1	0.098 (0.002)	1	1.2	1
26	0.107 (0.003)	0.9	0.270 (0.003)	1	0.095 (0.004)	1	1.1	1
27	0.107 (0.006)	0.8	0.270 (0.006)	1	0.099 (0.006)	1	1.2	1
28	0.137 (0.034)	1.1	0.282 (0.004)	1	0.099 (0.006)	1	0.9	1
29	0.108 (0.006)	0.9	0.284 (0.018)	1	0.098 (0.004)	1	1.1	1
30	0.109 (0.004)	0.93	0.280 (0.010)	1	0.096 (0.002)	1	1.1	1
31	0.118 (0.014)	0.9	0.277 (0.007)	1	0.097 (0.007)	1	1.1	1
32 ^b	0.293 (0.018)	2.3	3.028 (0.062) ^c	11.1	0.395 (0.009)	4.1	1.8	ND
33 ^b	0.320 (0.020)	2.5	3.527 (0.029) ^c	12.9	0.441 (0.009)	4.6	1.8	ND
PBS	0.114 (0.007)	0.9	0.293 (0.009)	1.1	0.102 (0.006)	1.1	0.8	1
Cítrico Sano ^a	0.126 (0.024)		0.273 (0.013)		0.096 (0.005)			

Los experimentos 1 y 2 fueron realizados en paralelo pero en microplacas diferentes. Los valores de DO corresponden a la media de las densidades ópticas del triplicado de la muestra (en paréntesis se indica la desviación estándar)

^a Control negativo.

^b Control positivo.

^c Los valores de DO obtenidos no correspondían a lecturas lineales.

ND: No determinado

Tabla 2

Diagnóstico de psorosis en la región citrícola del NOA. Comparación del *Indexing* biológico, TAS-ELISA-HRP y RT-PCR para la detección de CPsV en cítricos de campo.

Muestra	Origen	Síntomas en el campo	Síntomas en la planta indicadora	Protección cruzada	TAS-ELISA HRP	RT-PCR
1	Campo (Tucumán)	Bs, PsB, Fc, S, G	Fc, S, PsB	ND	+	+
2	Campo (Tucumán) vecino de 1	Sin síntomas	Negativo	Negativo	-	-
3	Campo (Tucumán) vecino de 1	Sin síntomas	Negativo	Negativo	-	-
4	Campo (Tucumán)	Bs, PsB, Fc, G	Fc, S, PsB	ND	+	+
5	Campo (Tucumán) vecino de 4	Sin síntomas	Negativo	Negativo	-	-
6	Campo (Tucumán) vecino de 4	Sin síntomas	Negativo	Negativo	-	-
7	Campo (Tucumán)	Bs, PsB, Fc, G	Fc, S, PsB	ND	+	+
8	Campo (Tucumán) vecino de 7	Bs	Negativo	Negativo	-	-
9	Campo (Tucumán) vecino de 7	Sin síntomas	Negativo	Negativo	-	-
10	Campo (Tucumán)	Bs	Fc, síntomas de hoja de roble	Negativo	-	-
11	Campo (Orán, Salta)	Bs, G	Fc, síntomas de hoja de roble	Negativo	-	-
12	Invernadero (muestra 7)	Bs, PsB, Fc, S, G	Fc, S, PsB	ND	+	+
13	Campo (Tucumán)	Bs	Fc, S	Positive	+	+
14	Invernadero (muestra 8)	Bs	Negativo	Negativo	-	-
15	Invernadero (muestra 2)	Sin síntomas	Negativo	Negativo	-	-
16	Invernadero (muestra 3)	Sin síntomas	Negativo	Negativo	-	-

Bs: descamación del tronco (*Bark scaling*)

PsB: ampollas en ramas pequeñas, manchas amarillas en hojas viejas con goma en el envés de la hoja

Fc: flecos cloróticos o manchas en hojas jóvenes

G: goma en la sección transversal del tronco

S: reacción de *shock* (pérdida de hojas y necrosis en brotes jóvenes)

ND: No determinado

La protección cruzada negativa indica que el aislado de psorosis ensayado (primer injerto) no fue capaz de proteger contra el aislado de psorosis B (segundo injerto).

Las muestras 1 a 9 fueron recolectadas de árboles de Naranja dulce Westin, la muestra 10 de un árbol de mandarina Cleopatra, todos de la Provincia de Tucumán. La muestra 11 es de un árbol de naranja Valencia y la muestra 13 de un árbol de naranja dulce de la provincia de Salta. Las muestras 12, 14, 15 y 16 fueron recolectadas de plantines inoculados de invernáculo.

CONCLUSIONES

Se han comparado el método TAS-ELISA optimizado en la presente tesis con el método tradicional TAS-ELISA-AP en muestra de extracto de cítrico infectado y en muestras de cítricos de campo demostrando que el método mejorado es más sensible, tiene un límite de detección menor y es más rápido que el TAS-ELISA-AP

Se ha aplicado el método TAS-ELISA-HRP, a muestras provenientes de árboles de huertos de la Provincia de Tucumán en la región citrícola del NOA y comparado con los métodos utilizados en la detección de CPsV (desarrollo de síntomas en plantas indicadoras, protección cruzada y RT-PCR) confirmado la presencia de psorosis y demostrando la especificidad del TAS-ELISA-HRP.

El análisis de muestras provenientes de plantas vecinas a los árboles infectados resultó negativo indicando que la enfermedad en los huertos analizados no se ha transmitido de árbol a árbol hasta el momento.

De los resultados obtenidos, surge la presencia de un agente desconocido en los cítricos en los huertos analizados que produce síntomas similares a psorosis (*bark scaling*), observaciones que coinciden con las reportadas por investigadores en otros países con producción citrícola.

CONCLUSIONES GENERALES

Las proteínas virales 24K, 48K y 54K de CPsV se han expresado en diferentes sistemas (*E. coli* y/o células de insecto), purificándolas y utilizándolas como antígenos para la inoculación de conejos y ratones. Los sueros obtenidos anti-24K, anti-48K y anti-54K han presentado especificidad hacia los antígenos ensayados. El desarrollo de ELISA competitivo secuencial para la detección de las proteínas virales 24K y 54K ha permitido una detección del antígeno en un rango lineal de 100 – 1000 ng ml⁻¹.

Se ha optimizado el método TAS-ELISA tradicional (TAS-ELISA-AP) utilizando un nuevo suero policlonal y se han modificado las últimas etapas del procedimiento a fin de aumentar el límite de detección y la rapidez del método (TAS-ELISA-HRP).

Se ha aplicado la estrategia de resistencia derivada del patógeno a CPsV. Para ello se han obtenido 75 líneas transgénicas de *Citrus sinensis* (naranja dulce Pineapple) utilizando como genes marcadores *uidA* (GUS) o *sgfp* (sGFP). De estas líneas, nueve, conteniendo el gen *48k* y expresando GUS, han sido analizadas mediante *Southern blot*, *Northern blot* y TAS-ELISA-HRP. No se encontró correlación entre el número de copias del transgén (entre 1 y 3 copias), la expresión de mensajero y de la proteína.

La línea 23CP, conteniendo 3 copias del transgén, ha presentado muy baja expresión de RNA mensajero y proteína; presenta metilación de citocinas en la región codificante, por lo que podría presentar inducción de PTGS.

Diez de las líneas 24K, expresando GFP y 10 líneas 54K, expresando GUS, se evaluaron por *Southern blot*. Las líneas 24K presentaron entre 1 y 3 copias mientras que en las líneas 54K se encontraron entre 1 y 4 copias integradas del transgén. Se confirmó la presencia y la integridad del RNA mensajero en 4 de las líneas 24K y 4 de las líneas 54K mediante RT-PCR. El análisis mediante ELISA competitivo secuencial determinó que la expresión de la proteína 24K y 54K en las líneas transgénicas estaría por debajo del límite de detección del ensayo. Este resultado se correlaciona con los resultados negativos para la detección de los mRNAs correspondientes mediante *Northern blot*.

Cuatro líneas 48K desafiadas con CPsV en condiciones similares al *Indexing* biológico, presentaron sintomatología indistinguible de los controles no transgénicos confirmándose la presencia del virus mediante TAS-ELISA y RT-PCR. La tolerancia o resistencia adquirida por las líneas transgénicas podría no haberse manifestado debido a la fuerte carga viral del inóculo, por lo cual, se realizó el experimento de carga viral acortando el tiempo de contacto entre el tejido infectado y el tejido sano a fin de disminuir la cantidad de virus transmitido, determinándose que 16 días de contacto fueron suficientes para infectar el 100% de las plantas inoculadas. Utilizando dicha condición, 3 líneas 48K, 4 líneas 24K y 4 líneas 54K fueron desafiadas con CPsV. Aunque algunas pocas propagaciones de algunas líneas 24K presentaron un retraso en la aparición de síntomas, todas las líneas transgénicas analizadas presentaron síntomas de psorosis y resultaron positivas por TAS-ELISA a lo largo de 6 meses de observaciones.

Se determinó que la proteína 48K en las hojas de *G. globosa* inoculadas con CPsV es expresada antes de la aparición de los síntomas locales y que el virus se movilizó a hojas superiores antes de manifestar los síntomas. En *C. quinoa*, hospedante local, la proteína se detectó al mismo tiempo que aparecían los síntomas. Mediante el ELISA competitivo secuencial no se pudo detectar las proteínas 24K y 54K durante el período de infección analizado, sugiriendo que dichas proteínas podrían ser no estructurales y expresarse en muy bajas concentraciones durante el ciclo de infección de CPsV.

A partir del análisis de la secuencia del ORF 24K de CPsV se determinó la presencia de una secuencia de exportación nuclear (NES). Dicha secuencia posee similitud con otras NES bien caracterizadas. El ORF 54K de CPsV posee una señal de localización nuclear (NLS) bipartita. Por lo tanto, dichas proteínas podrían localizarse en el núcleo de la célula infectada. En ensayos de expresión transitoria, mediante agroinfiltración, no se detectaron las proteínas 24K y 54K, ni sus fusiones a las proteínas marcadoras GFP y dsRed. Por el contrario, se pudo expresar la proteína 48K transitoriamente en hojas de *N. benthamiana* así como sus fusiones a GFP y DsRed, determinándose que su localización es citoplasmática.

Se han comparado el método TAS-ELISA-HRP con el método tradicional TAS-ELISA-AP en muestras de extracto de cítrico infectado, en muestras de plantas transgénicas con baja concentración de proteína 48K y en muestras de cítricos de campo demostrando que el método es más confiable, sensible y rápido que el TAS-ELISA-AP.

Se ha aplicado el método TAS-ELISA-HRP a muestras provenientes de árboles de huertos de la Provincia de Tucumán y Salta, en la región citrícola del NOA, y comparado con los métodos usados en la detección de CPsV (*indexing* biológico, protección cruzada y RT-PCR) confirmado la presencia de psorosis y demostrando la especificidad del método inmunológico.

El análisis de muestras provenientes de plantas vecinas a los árboles infectados resultó negativo indicando que la enfermedad, hasta el momento, no se ha transmitido de árbol a árbol. De los resultados obtenidos, surge la presencia de un agente desconocido en los cítricos de los huertos analizados que produce síntomas similares a psorosis, como ocurre en otras partes del mundo.

BIBLIOGRAFÍA

Abel PP, Nelson RS, De B, Hoffmann N, Rogers SG, Fraley RT, Beachy RN (1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232:738-743

Ailor E, Betenbaugh MJ (1999) Modifying secretion and post-translational processing in insect cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 142–145

Alioto D, Gangemi M, Deaglio S, Sposato S, Noris E, Luisoni E, Milne RG (1999) Improved detection of citrus psorosis virus using polyclonal and monoclonal antibodies. *Plant Pathology*. 48: 735-741.

Anderson JM, Palukaitis P, Zaitlin M (1992) A defective replicase gene induces resistance to cucumber mosaic virus in transgenic tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8759-8763.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1989) *En: Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley y Sons, New York, USA.

Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-297

Barthe GA, Ceccardi TL, Manjunath KL, Derrick KS (1998) Citrus psorosis virus: Nucleotide sequencing of the coat protein gene and detection by hybridisation and RT-PCR. *J Gen Virol* 79:1531-1537

Baughman GA, Jacobs JD, Howell SH (1988) Cailiflower mosaic virus gene VI produces a symptomatic phenotype in transgenic tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 85:733-737

Baulcombe DC (1994) Replicase-mediated resistance: a novel type of virus resistance in transgenic plants. *Trends Microbiol.* 2: 60-63.

Baulcombe DC, Chapman S, Santa Cruz S (1995) Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *The Plant Journal.* 7(6): 1045-1053

Baulcombe DC (1996) Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* 8 (10): 1833-1844.

Baulcombe DC (1999) Fast forward genetics based on virus induced gene silencing. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 109-113

Beachy RN (1994) Introduction: transgenic resistance to plant viruses. *Semin. Virol.* 4: 327-328

Bekesiova I, Nap J-P, Mlynarova L (1999) Isolation of high Quality DNA and RNA from leaves of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia*. *Plant Mol Biol Rep* 17:269-277

Bendahmane A, Querci M, Kanyuka K, Baulcombe DC (2000) *Agrobacterium* transient expression system as a tool for isolation of disease resistente genes: application to the Rx2 locus in potato. *Plant J.* 21: 73-81

Beñatena HN, Portillo MM (1984) Natural spread of psorosis in sweet orange seedlings. *En: Garnsey SM, Timmer LW and Dodds JA (eds) Proc. 9th Conf. of IOCV. IOCV, Riverside, CA, pp 159-164.*

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513.

Bond JE, Roose ML (1998) *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange. *Plant Cell Rep.* 18. 229-234

Bos L, Huijberts N (1996) Lettuce ring necrosis, caused by a chytrid-borne agent distinct from lettuce big-vein 'virus'. *European Journal of Plant Pathology* 102: 867-873.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anl. Biochem.* 72:248-254

Brodersen P, Voinnet O (2006) The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics.* 22(5):268-80

Bucher E, Lohuis D, van Poppel PM, Geerts-Dimitriadou C, Goldbach R, Prins M (2006) Multiple virus resistance at a high frequency using a single transgene construct. *J Gen Virol.* 87:3697-3701

Carstens C-P, Waesche A (1999). Codon bias-adjusted BL21 derivatives for protein expression. *Strategies* 12: 49-51

Cervera M (2005) Histochemical and fluorometric assays for *uidA* (GUS) gene detection. *Methods Mol Biol* 286:203-214.

Cervera M, Juárez JA, Navarro A, Pina JA, Durán- Vila N, Navarro L, Peña L (1998a) Genetic transformation and regeneration of mature tissues of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. *Transgenic Res.* 7: 51-59

Cervera M, Ortega C, Navarro L, NavarroA, Peña L (2000) Generation of transgenic citrus plants with the tolerance-to-salinity gene HAL2 from yeast. *J. Hortic Sci Biotech* 75: 30

Cervera M, Pina JA, Juárez JA, Navarro L, Peña L (1998b) *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Rep.* 18:271-278

Cervera M, Lopez MM, Navarro L, Peña L (1998c) Virulence and supervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* in woody fruit plants. *Physiol Molec Plant Pathol.* 52:67-78

Ciccarone V C, Polayes D, Luckow VA (1997) Generation of Recombinant Baculovirus DNA in *E. coli* Using Baculovirus Shuttle Vector, Volume 13, U. Reischt, ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc.

Costa MGC, Otoni WC, Moore GC (2002) An evaluation of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus paradise* (Macf.) and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic genes. *Plant Cell Rep.* 21: 365-373

Costa N, Plata MI, Anderson C (2004) VIII-Capítulo 7. Plantas cítricas libres de enfermedades. En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Eds: Echenique V, Rubinstein C, Mroginski L. Buenos Aires. Ediciones INTA. p. 317-318

Chiu W, Niwa Y, Zeng W, Hirano T, Kobayashi H, Sheen J (1996) Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr Biol* 6 (3):325-330.

da Graça JV, Lee RF, Moreno P, Civerolo EL, Derrick KS (1991) Comparison of citrus ringspot, psorosis, and other virus like agents of citrus. *Plant Dis.* 75:613-616

Danós E (1990) La psorosis de los cítricos: la epidemia en curso en Argentina y el desafío de su control. En: *International Foundation for Science (IFS) e Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) (Eds.), Revista de Investigaciones Agropecuarias.* 22: 265-277.

Derrick KS, Brlansky RH, da Graça JV, Lee RF, Timmer LW, Nguyen TK (1988) Partial characterization of a virus associated with citrus ringspot. *Phytopathology* 78: 1293-1301

Derrick KS, Bransky RH, Lee RF, Timmer LW, Nguyen TK (1988) Two components associated with the citrus ringspot virus. En: Proc. 10 th Conf. IOCV. IOCV, Riverside, California, USA. p. 340-342

Diamandis EP, Christopoulos TK (1996) Immunoassay. Eds. Diamandis EP, Christopoulos TK. Academic Press.

Di Nicola-Negri E, Brunetti A, Tavazza M, Ilardi V (2005) Hairpin RNA-mediated silencing of Plum pox virus P1 and HC-Pro genes for efficient and predictable resistance to the virus. Transgenic Res. 14(6):989-994

Domínguez A, Guerri J, Cambra M, Navarro L, Moreno P, Peña L. (2000) Efficient production of citrus transgenic plants expressing the coat protein gene of *Citrus Tristeza Virus*. Plant Cell Rep. 19: 427-433

Domínguez A, Hermoso de Mendoza A, Guerri J, Cambra M, Navarro L, Moreno P, Peña L (2002) Pathogen-derived resistance to *Citrus tristeza virus* (CTV) in transgenic Mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) plants expressing its p25 coat protein gene. Mol. Breed. 10: 1-10

Domínguez A, Cervera M, Pérez RM, Romero J, Fagoaga C, Cubero J, López MM, Juárez JA, Navarro L, Peña L (2004) Characterisation of regenerants obtained under selective conditions after Agrobacterium-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. Mol. Breed. 14: 171-183

Donahue RA (1996) Use of PCR to identify recombinant bacmid clones from the Bac-to-Bac™ system. Focus 17, 3:101-102

Dong X, van Wezel R, Stanley J, Hong Y (2003) Functional characterization of the nuclear localization signal for a suppressor of posttranscriptional gene silencing. J. Virol. 77: 7026-7033

Dower WJ, Miller JF, Rasgdale CW (1988). High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. Nucleic Acids Research 16 (13): 6127-6145

Duan YP, Powell CA, Purcifull DE, Broglio P, Hiebert E (1997) Phenotypic variation in transgenic tabaco expressing mutated geminivirus movement/pathogenicity (BC1) proteins. Mol. Plant-Microbe Interact. 10: 1065-1074

Dunbar BS, Schwoebel ED (1990) XI. 49. Preparation of Polyclonal Antibodies. En: Methods in Enzymology. Volumen 182. Guide to Protein Purification. Ed. Deutscher MP. p. 663-670

Dunoyer P, Voinnet O (2005) The complex interplay between plant viruses and host RNA-silencing pathways. Current Opinion in Plant Biology. 8: 415-423

Fagoaga C, López C, Hermoso de Mendoza A, Moreno P, Navarro L, Flores R, Peña L (2006) Post-transcriptional gene silencing of the p23 silencing supresor of *Citrus tristeza virus* confers resistance to the virus in transgenic Mexican lime. Plant Molecular Biology. 60: 153-165

Fagoaga C, Rodrigo I, Conejero V, Hinarejos C, Tuset JJ, Arnau J, Pina JA, Navarro L, Peña L (2001) Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomate pathogenesis related protein PR-5. Mol Breeding. 7: 175-185

Fawcett HS (1932) New angles on treatment of bark diseases of citrus. Calif. Citograph 17: 406-408

Fawcett HS, Klotz LJ (1938) Types and symptoms of psorosis and psorosis-like diseases of citrus. Phytopathology 32: 22.

Fawcett GL (1938) La psorosis en los naranjos de Tucumán. Rev. Ind. y Agric. de Tucumán. 27 (4-6), 101-103.

Fawcett GL (1939) Observaciones sobre algunas de las enfermedades presentes en los cítricos de Tucumán. Est. Exp. Agric. Tuc., Circular. 77, 1-5

Fernández Valiela MV (1961) Citrus virus diseases in Argentina. En: Proc. 2nd Conf. of the IOCV. IOCV, Univ. Fla. Press, Gainesville, USA, p. 231-237

Fischer U, Huber J, Boelens WC, Mattaj LW, Luhrmann R (1995) The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. Cell 82: 475-483

Foguet JL (1966) Enfermedades de los citrus reconocidas en Tucumán. Est. Exp. Agric. Tuc., Bol. Informativo. 2, 24-28.

Fridell RA, Fischer U, Luhrmann R, Meyer BE, Meinkoth JL, Malim MH, Cullen BR (1996) Amphibian transcription factor IIIA proteins contain a sequence element functionally equivalent to the nuclear export signal of human immunodeficiency virus type 1 Rev. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 2936-2940.

Fuglsang A (2003) Codon optimizer: a freeware tool for codon optimization, Protein Expr Purif 31: 247-249.

Futterer J, Gisel A, Iglesias V, Kloti A, Kost B, Mittelsten Sced O, Neuhaus-Url G, Schrott M, Shillito R, Spangenberg G, Wang ZY (1995) Standard molecular techniques for analysis of transgenic plants. In: Potrykus I, Spangenberg G (eds) Gene transfer to plants, Springer Lab manual, 25, p. 215

Gambino G, Gribaudo I, Stephan L, Scharf A, Laimer M (2005) Molecular characterization of grapevine plants transformed with GFLV resistance genes. I. Plant Cell Rep 24:665-662

García ML, Costa NB, Casafús CM, Sarachu AN (1991b) Evaluation of different citrus as psorosis indicators and as psorosis propagation hosts. En: Proc. of the 11th Conf. of IOCV. IOCV, Riverside, California, USA.

García ML, Dal Bo E, Grau O, Milne R (1994) The closely related citrus ringspot and citrus psorosis viruses have particles of novel filamentous morphology. J Gen Virol 75:3585-3590

García ML, Grau O, Sarachu AN (1991a) Citrus psorosis is probably caused by a bipartite ssRNA virus. Res. Virol. 142: 303-311

García ML, Sanchez de la Torre ME, Dal Bo E, Djelouah K, Rouag N, Luisoni E, Milne RG, Grau O (1997) Detection of citrus psorosis-ringspot virus using RT-PCR and DAS-ELISA. Plant Pathology 46: 830-836

Garnsey SM, Timmer LW (1988) Local lesion isolate of ringspot virus induces psorosis bark scaling. En: Proc. 10 th Conf. IOCV. IOCV, Riverside, California, USA. p. 334-339

Garnsey SM, Timmer LW (1980) Mechanical transmissibility of citrus ringspot virus isolates from Florida, Texas, and California. In: Calavan EC, Garnsey SM, Timmer LW (eds) Proc. of the 8 th Conf. of the IOCV. IOCV. Riverside, California, USA, p. 174-179.

Garnsey SM, Youtsey CO, Bridges GD, Burnett HC (1976) A necrotic ringspot-like virus found in a "Star Ruby" grapefruit tree imported without authorization from Texas. Proc. of the Florida State Horticultural Society 89, p. 63-67.

Gaskins, C.J., Smith, J.F., Ogilvie, M.K. and Hanas, J.S. (1992) Comparison of the sequence and structure of transcription factor IIIA from *Bufo americanus* and *Rana pipiens*. Gene 120 (2): 197-206

Ghorbel R, Dominguez A, Navarro L, Peña L (2000) High efficiency genetic transformation of sour orange (*Citrus aurantium*) and production of transgenic trees containing the coat protein gene of *Citrus Tristeza Virus*. *Tree Physiol* 20: 1183-1189

Ghorbel R, Juarez J, Navarro L, Peña L (1999) Green fluorescent protein as a screenable marker to increase the efficiency of generating transgenic woody fruit plants. *Theoretical and Applied Genetics*. 99:350-358

Ghorbel R, La-Malfa S, Lopez MM, Petit A, Navarro L, Peña L (2001a) Additional copies of *virG* from pTiBo542 provide a super-transformation ability to *Agrobacterium tumefaciens* in citrus. *Physiol Molec Plant Pathol* 58:103-110

Ghorbel R, López C, Fagoaga C, Moreno P, Navarro L, Flores R, Peña L (2001b) Transgenic citrus plants expressing the citrus tristeza virus p23 protein exhibit viral-like symptoms. *Mol. Plant Pathol*. 2:27-36

Ginsberg AM, King BO, Roeder RG (1984) *Xenopus* 5S gene transcription factor, TFIIIA: characterization of a cDNA clone and measurement of RNA levels throughout development. *Cell* 39: 479-489

Goldbach R, Bucher, Prins M (2003) Resistance mechanisms to plant viruses: an overview. *Virus Res* 92(2): 207-212.

Goodin MM, Austin J, Tobias R, Fujita M, Morales C, Jackson AO (2001) Interactions and nuclear import of the a N and P proteins of *Sonchus* yellow net virus, a plant nucleorhabdovirus. *J Virol*. 75: 9393-9406

Goodin MM, Dietzgen RG, Schichnes D, Ruzin S, Jackson A O (2002) pGD vectors: versatile tools for the expression of green and red fluorescent protein fusions in agroinfiltrated plant leaves. *The Plant Journal* 31 (3), 375-383

Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J (2004) Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol* 22:346–353.

Gutiérrez MA, Luth DE, Moore GA (1997) Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in *Citrus* and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of *Citrus Tristeza Virus*. *Plant Cell Rep*. 16: 745-753

Hajdukiewicz P, Svab Z, Maliga P (1994) The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol. Biol*. 25, 989-994

Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-952

Helliwell CA, Waterhouse PM (2005) Constructs and methods for hairpin RNA-mediated gene silencing in plants. *Methods Enzymol*. 392: 24-35

Hidaka T, Omura M (1993) Transformation of *Citrus* protoplasts by electroporation. *J. Japan Soc Hort Sci* 62: 371-376

Higgins D, Thompson J, Gibson T, Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 22 : 4673-4680

Hily JH, Scorza R, Malinowski T, Zawadzka B, Ravelonandro M (2004) Stability of gene silencing-based resistance to *Plum pox virus* in transgenic plum (*Prunus domestica* L.) under field conditions. *Transgenic Res* 13(5):427-436.

- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas, Schiperoort RA (1983) A binary plant vector based on separation of vir and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*. 303: 179-180
- Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekema A (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res.* 2: 208-218
- Hood EE, Helmer GL, Fraley RT, Chilton MD (1986) The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J Bacteriol.* 168(3):1291-1301
- Jose J, Usha R (2003) Bendi yellow vein mosaic disease in India is caused by association of a DNA Beta satellite with a begomovirus. *Virology* 305 (2): 310-317
- Kalantidis K, Psaradakis S, Tabler M, Tsagris M (2002) The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus. *Mol Plant Microbe Interact* 15:826-833
- Kaneyoshi J, Kobayashi S, Nakamura Y, Shigemoto N, Doi Y (1994) A simple and efficient gene transfer system of trifoliolate orange. *Plant Cell Rep.* 13: 541-545
- Kawazu Y, Fujiyama R (2006) A transgenic lettuce line with resistance to both Lettuce big-vein associated virus and Mirafiori lettuce virus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 131(6): 760-763
- Kawazu Y, Sasaya T, Morikawa T, Sugiyama K, Natsuaki T (2003) Nucleotide sequence of the coat protein gene of mirafiori lettuce virus. *Journal of General Plant Pathology* 69: 55-60
- Kayim M, Koc NK, Tor M (1996) Gene transfer into citrus (*Citrus limon* L.) nucellar cells by particle bombardment and expresión of GUS activity. *Turkish J Agric Forest* 20: 349-352
- Kim HG, Yang SM, Lee YC, Do SI, Chung IS, Yang JM (2003) High-level expression of human glycosyltransferases in insect cells as biochemically active form. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305 (3): 488-493
- Kleber-Janke T, Becker W-M (2000) Use of modified BL21(DE3) *Escherichia coli* cells for high-level expression of recombinant peanut allergens affected by poor codon usage. *Protein Expression and Purification.* 19:419-424
- Kobayashi S, Uchimiya H (1989) Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts by direct DNA transfer. *Jap J Genet* 2: 91-97
- Kormelink R, Storms M, van Lent J, Peters D, Golbach R (1994) Expression and subcellular location of the NS_M protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative viral movement protein. *Virology.* 200: 56-65
- Krichevsky A, Kozlovsky SV, Gafni Y, Citovsky (2006) Nuclear import and export of plant virus proteins and genomes. *Molecular Plant Pathology.* 7(2): 131-146
- Kumar P, Usha R, Zrachya A, Levy Y, Spanov H, Gafni Y (2006) Protein-protein interactions and nuclear trafficking of coat protein and β C1 protein associated with Bendi yellow vein mosaic disease. *Virus Research* 122: 127-136
- la Cour T, Kierner L, Molgaard A, Gupta R, Skriver K, Brunak S (2004) Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng. Des. Sel.* 17(6): 527-536
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685

Lapidot M, Gafny R, Ding B, Wolf S, Lucas WJ, Beachy RN (1993) A dysfunctional movement protein of tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in transgenic plants. *Plant J.* 4: 959-970

Larocca LH (1985) La citricultura en la provincia de Entre Ríos. En: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), eds., *Actas de la XVI, Jornadas Técnicas de Citricultura*, pp. 42-51

Lazarowitz SG, Lazdins IB (1991) Infectivity and complete nucleotide sequence of the cloned genomic components of a bipartite squash leaf curl geminivirus with a broad host range phenotype. *Virology* 180 (1): 58-69

Lazarowitz SG, Beachy RN (1999) Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell.* 11: 535-548

Legarreta GG, García ML, Costa N, Grau O (2000) A highly sensitive heminested RT-PCR assay for the detection of citrus psorosis virus targeted to a conserved region of the genome. *J Virol Methods* 84:15-22

Lee N, Zhang S-Q, Cozzitorto J, Yang J-S, Testa D (1987) Modification of mRNA secondary structure and alteration of the expression of human interferon alpha 1 in *Escherichia coli*. *Gene.* 58:77-86

Levin JS, Thompson WF, Csinos AS, Stephenson MG, Weissinger AK (2005) Matrix attachment regions increase the efficiency and stability of RNA-mediated resistance to Tomato Spotted Wilt Virus in transgenic tobacco. *Transgenic Res* 14:193-206

Lindbo JA, Silva-Rosales L, Proebsting WM, Dougherty WG (1993) Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 5: 1749-1759

Llave C, Kaschau KD, Carrington JC (2000) Virus encoded suppressor of transcriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 13401-13406

Lomonosoff GP (1995) Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33: 323-343

Looman AC, Bodlaender J, De Gruyter M, Vogelaar A, Van Knippenberg PH (1986) Influence of the codon following the AUG initiation codon on the expression of a modified lacZ gene in *Escherichia coli*. *Nucl. Acids Res.* 14: 5481-5496

Lot H, Campbell RN, Souche S, Milne RG, Roggero P (2002) Transmission by *Olpidium brassicae* of mirafiore lettuce virus and lettuce big-vein virus, and their roles in lettuce big-vein etiology. *Phytopathology* 92: 288-293

Luckow VA, Lee CS, Barry GF, Olins PO (1993) Efficient Generation of Infectious Recombinant Baculoviruses by Site-Specific Transposon-Mediated Insertion of Foreign Genes into a Baculovirus Genome Propagated in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 67: 4566-4579.

Lucy AP, Guo HS, Li WX, Ding SW (2000) Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J.* 19:1672-1680

Luth D, Moore G (1999) Transgenic grapefruit plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Cell Tiss Org Cult* 57:219-222

Maciel RJ (1985) Standard curve fitting in immunodiagnosics: A primer. *J. of Clin. Immunoassay.* 8: 98-106

Maghuly F, Stephan L, da Câmara Machado A, Borroto Fernandez E, Mahmood AK, Gambino G, Gribaudo I, Schari A, Laimer M (2005) Molecular characterization of grapevine plants transformed with GFLV resistance genes: II. *Plant Cell Rep* 25 (6): 546-553

Maliandi MV, Busi MV, Clemente M, Zabaleta EJ, Araya A, Gomez-Casati DF (2006) Expression and one-step purification of recombinant *Arabidopsis thaliana* frataxin homolog (AtFH). *Protein Expr Purif.* 48(6):873-882

Mallory AC, Vaucheret H (2006) Functions of microRNAs and related small RNAs in plants *Nature Genetics*, 38: 531-536

Martín S, Alioto D, Milne RG, Guerri J, Moreno P (2002a) Detection of Citrus psorosis virus in field trees by direct tissue blot immunoassay in comparison with ELISA, symptomatology, biological indexing and cross-protection tests. *Plant Pathology*. 51: 134-141

Martín S, Alioto D, Milne RG, Garnsey SM, García ML, Grau O, Guerri J, Moreno P (2004) Detection of Citrus psorosis virus by ELISA, molecular hybridization, RT-PCR and immunosorbent electron microscopy and its association with citrus psorosis disease. *European Journal of Plant Pathology*. 110, 747-757

Martín S, Milne RG, Alioto D, Guerri J, Moreno P (2002b) Psorosis-like symptoms induced by causes other than Citrus psorosis virus. En: Proc. 15th Conf. IOCV. IOCV, Riverside, California, USA. p. 197-204

Martins CRF, Jonson JA, Lawrence DM, Choi T, Pisi AM, Tobin SL, Lapidus D, Wagner DOL, Ruzin S, McDonal K, Jackson AO (1998). *Sonchus* yellow net rhabdovirus nuclear viroplasm contain polymerase-associated proteins. *Journal of Virology*. 72: 5669-5679

Matthews REF (1991). Capítulo 15. Methods depending on properties of viral proteins: Methods for assay, detection and Diagnosis. En: *Plant virology*. Academic Press, Inc. San Diego, California, USA. p.641-645

Matthews REF (1991). Capítulo 3. Disease symptoms and host range. En: *Plant virology*. Academic Press, Inc. San Diego, California, USA. p. 47-49

Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML, Lukyanov SA (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *Nature Biotech.* 17: 969-973

Mayers CN, Palukaitis P, Carr JP (2000) Subcellular distribution analysis of the cucumber mosaic virus 2b protein. *Journal of General Virology*. 81: 219-226

McGarvey PB, Kaper JM (1991) A simple and rapid method for screening transgenic plants using PCR. *Biotechniques*, 11:428-432.

Miki B, McHugh S (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *Journal of Biotechnology*. 107: 193-232

Miki D, Shimamoto K (2004) Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. *Plant Cell Physiol*. 45: 490-495

Milne RG, García ML, Grau O (2000) Virus Taxonomy. Sevent Report of the International Committee on Taxonomy of Virus. Academic Press. MVH van Regenmortel, CM Fauquet, DHL Bishop, EB Carstens, MK Estes, SM Lemon, J. Maniloff, MA Mayo, DJ Mc Geoch, CR Pringle, and RB Wickner. p.627-631

Milne RG, Garcia ML, Moreno P (2003) Citrus Psorosis virus. Association of Applied Biologists (AAB) Descriptions of Plant Viruses. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=401>

Moore G (2001) Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. *Trends in Genetic* 17 (9): 536-540

Moore GA, Jacono CC, Neidigh JL, Lawrence SD, Cline K (1992) *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 11: 238-242

Moreno P, Roistacher CN (1990) Las enfermedades de los citrus transmisibles por injerto: una puesta al día. I. Tristeza. *Phytoma* 20: 29-37, España.

Morikawa T, Nomura Y, Yamamoto T, Natsuaki T (1995) Partial characterization of virus-like particles associated with tulip mild mottle mosaic. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 61: 578-581

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-479

Nakai K, Horton P (1999) PSORT: a program for detecting the sorting signals of proteins and predicting their sub-cellular localization. *Trends Biochem. Sci.* 24(1), 34-35

Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2: 279-289

Naum-Ongania G, Gago-Zachert S, Pena E, Grau O, Garcia ML (2003) Citrus psorosis virus RNA 1 is of negative polarity and potentially encodes in its complementary strand a 24K protein of unknown function and 280K putative RNA dependent RNA polymerase. *Virus Res.* 96 (1-2): 49-61

Navarro L, Juárez J, Ballester JF, Pina JA (1980) Elimination of some citrus pathogens producing psorosis-like leaf symptoms by shoot-tip grafting *in vitro*. En: *Proc. 8th Conf. IOCV*. IOCV, Riverside, California, USA. p. 162-166

Navarro L, Roistacher CN and Murashige T (1975). Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 100: 471-479

Navas-Castillo J, Moreno P (1993) Partial purificación of a virus associated with a Spanish isolate of citrus ringspot. *Plant Pathol.* 42: 339-346

Navas-Castillo J, Moreno P (1995) Filamentous flexuous particles and serologically related proteins of variable size associated with citrus psorosis and ringspot diseases. *European Journal of Plant Pathology* 101: 343-348

Niedz RP, Sussman MR, Satterlee JS (1995) Green fluorescent protein: an *in vivo* reporter of plant gene expresión. *Plant Cell Rep.* 14: 403-406

Niu QW, Lin SS, Reyes JL, Chen KC, Wu HW, Yeh SD, Chua NH (2006) Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. *Nature Biotechnology* 24(11):1420-1428

Novy R, Drott D, Yaeger K, Mierendorf R (2001) Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. *Innovations Newsletter of Novagen* 12: 1-4

Olivares-Trejo JJ, Bueno-Martinez JG, Guarneros G, Hernandez-Sanchez J (2003) The pair of arginine codons AGA AGG close to the initiation codon of the lambda int gene inhibits cell growth and protein synthesis by accumulating peptidyl-tRNA Arg4. *Mol Microbiol* 49:1043-1049.

Palle SR, Miao H, Seyran M, Louzada ES, da Graça JV, Skaria M (2004) Preliminary Evidence for Natural Transmission of Citrus psorosis virus by an Olpidium-Like Fungus. En: 16th Conf. of the IOCV, 2004. Abstract. IOCV Conference, Mexico.

- Palukaitis P, Zaitlin M (1997) Replicase-mediated resistance to plant virus diseases. *Adv. Virus Res.* 48: 349-377
- Pandolfini T, Molesini B, Avesani L, Spena A, Polverari A (2003) Expression of self-complementary hairpin RNA under the control of the rolC promoter confers systemic disease resistance to plum pox virus without preventing local infection. *BMC Biotechnol.* 3:7-10
- Pang SZ., Nagpala P, Wang M, Slightom JL, Gonsalves D (1992) Resistance to heterologous isolates of tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco expressing its nucleocapsid protein gene. *Phytopathology* 82:1223-1229.
- Pascal E, Goodlove PE, Wu LC, Lazarowitz SG (1993) Transgenic tobacco plants expressing the geminivirus BL1 protein exhibit symptoms of viral disease. *Plant Cell.* 5: 795-807
- Peña L, Cervera M, Juárez J, Navarro A, Pina JA, Durán-Vila N, Navarro L (1995b) *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plant. *Plant Cell Rep* 14:616-619
- Peña L, Cervera M, Juárez J, Ortega C, Pina JA, Navarro L (1995a) High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. *Plant Sci.* 104: 183-191
- Peña L, Cervera M, Juárez J, Navarro A, Pina JA, Navarro L (1997) Genetic transformation of lime (*Citrus aurantifoliata* Swing.): factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Rep.* 16: 731-737
- Peña L, Martín-Trillo M, Juárez J, Pina JA, Navarro L, Martínez-Zapater JM (2001) Constitutive expression of Arabidopsis LEAFY and APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. *Nature Biotech.* 19:263-267
- Peña L, Pérez RM, Cervera M, Juárez JA, Navarro L (2004) Early events in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of citrus explants. *Annals of Botany.* 94: 67-74
- Petri C, Burgos L (2005) Transformation of fruit trees. Useful breeding tool or continued future prospect?. *Transgenic Research.* 14: 15-26
- Pollard VW, Malim MH (1998) The HIV-1 Rev protein. *Ann. Rev. Microb.* 52:491-532
- Pooggin M, Shivaprasad PV, Veluthambi K, Hohn T (2003) RNAi targeting of DNA virus in plants. *Nat. Biotechnol.* 21: 131-132
- Possee RD (1997) Baculoviruses as expression vectors. *Curr Opin Biotechnol.* 8(5):569-72.
- Potrykus I (1991) Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* 42: 205-225
- Prins M (2003) Broad virus resistance in transgenic plants. *Trends in Biotechnology.* 21 (9): 373-375
- Prins M, de Haan P, Luyten R, van Veller M, van Grinsven MQ, Goldbach R (1995) Broad resistance to tospoviruses in transgenic tobacco plants expressing three tospoviral nucleoprotein gene sequences. *Mol Plant Microbe Interact* 8(1):85-91.
- Pujol AR, Beñatena HN (1965) Study of psorosis in Concordia, Argentina. En: *Proc. of the 3rd Conf. of IOCV.* IOCV, Univ. Fla. Press, Gainesville, USA, pp. 170-174
- Pyper JM, Gartner AE (1997) Molecular basis for the differential subcellular localization of the 38- and 39-kilodalton structural proteins of borna disease virus. *Journal of Virology.* 71: 5133-5139

Ravelonandro M, Scorza R, Bachelier JC, Labonne G, Levy L, Damsteegt V (1997) Resistance of *Prunus domestica* L. to plum pox virus infection. *Plant Dis.* 81: 1231-1235

Reis Figueira A, Golem S, Goregaoker SP, Culver JN (2002) A nuclear localization signal and a membrane association domain contribute to the cellular localization of the *Tobacco mosaic virus* 126-kDa replicase protein. *Virology* 301: 81-89

Ren T, Qu F, Morris J (2005) The nuclear localization of the Arabidopsis transcription factor TIP is blocked by its interaction with the coat protein of *Turnip crinkle virus*. *Virology.* 331: 316-324

Rey-Cuille MA, Galabru J, Laurent-Crawford A, Krust B, Montagnier L, Hovanessian AG (1994) HIV-2 EHO isolate has a divergent envelope gene and induces single cell killing by apoptosis. *Virology* 202 (1): 471-476

Rhee Y, Gurel F, Gafni Y, Dingwall C, Citovsky V (2000) A genetic system for detection of protein nuclear import and export. *Net. Biotech.* 18: 433-437

Ritzenthaler C (2005) Resistance to plant viruses: old issue, news answers?. *Current Opinion in Biotechnology.* 16:118-122

Roggero P, Ciuffo M, Vaira AM, Accotto GP, Masenga , Milne RG (2000) An *Ophiovirus* isolated from lettuce with big-vein symptoms. *Archives of Virology* 145: 2629-2642

Roistacher CN (1991) Graft-Transmissible Diseases of Citrus. En: Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO (ed.). Handbook for detection and diagnosis, Rome, Italy, pp. 115-126

Roistacher CN (1993) Psorosis-A review. En: Moreno, P., da Graça, J.V., Timmer, L.W., eds. Proc. of the 12th Conf. of IOCV. IOCV, Riverside, California, USA, p. 139-154

Roistacher CN, Calavan EC (1965) Cross protection studies with strains of concave gum and Psorosis virus. En: Proc. 3rd Conf. of the IOCV. IOCV, Univ. Fla. Press, Gainesville, USA, p. 154-161.

Sambrook J, Fritsch EJ, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sánchez de la Torre E, López C, Grau O, García ML (2002) RNA2 of Citrus psorosis virus is of negative polarity and has a single open reading frame in its complementary strand. *J Gen Virol* 83: 1777-1781

Sánchez de la Torre ME, Riva O, Zandomeni R, Grau O, García ML (1998) The top component of citrus psorosis virus contains two ssRNAs, the smaller encodes the coat protein. *Molecular Plant Pathology On-line*, <http://www.bspp.org.uk/mppol/1998/1019sanchez>.

Sanford JC, Johnston SA (1985) The concept of parasite-derived resistance – deriving resistance genes from the parasite's own genome. *J Theor Biol* 113:395-405

Sasaki D, Mitchell RA (2005) How to obtain reproducible quantitative ELISA results. *Oxford Biomedical Research.* <http://www.oxfordbiomed.com/artqelis.html>

Schein CH, Noteborn MHM (1988) Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *BioTechnology* 6:291–294

Scorza R, Callahan A, Levy L, Damsteegt V, Webb K, Revelonandro M (2001). Post-transcriptional gene silencing in plum pox virus resistant transgenic European plum containing the plum potyvirus coat protein gene. *Transgenic Res* 10:201-209.

Sekimoto J, Katahira J, Yoneda Y (2005) Nuclear import and export signals. En: Tzfira T, Citovsky V (Eds.). Nuclear Import and Export in Plants and Animals. Kluwer Academic/Plenum Publishers, NY, USA

Shao J, Shi, G, Song M, Jiang G (2005) Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for vitellogenin in Chinese loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Env. Inter.* 31:763-770

Sheen J, Hwang S, Niwa Y, Kobayashi H, Galbraith DW (1995) Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant J.* 8:777-784

Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk PA, Graan AG, Waterhouse PM (2000) Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407: 319-320

Sommer CA (2000) Ensayo de anticuerpos monoclonales para revelar epitopes de la proteína de cubierta del virus de la psorosis de los cítricos. Tesina para optar al grado de Licenciado en Genética. Univ. Nac. de Misiones, Fac. Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Posadas, Misiones.

Sorensen MA, Kurland CG, Pedersen S (1989) Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 207: 365-377

Sorensen HP, Mortensen KK (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expresión in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 115: 113-128.

Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of Bacteriophage T-7 RNA Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes. *J Molecular Biology* 189(1):113-130

Swingle WT, Webber HJ (1896) The principal diseases of citrus fruits in Florida. *USDA Div. Veg. Physiol. Pathol. Bull.* 8.

Szittyá G, Silhavy D, Molnár A, Habedla Z, Lovas A, Lakatos L, Bánfalvi Z, Burgyán J (2003) Low temperatura inhibits RNA silencing-mediated defense by the control of siRNA generation. *EMBO* 22(2): 633-640

Timmer LW (1974) A necrotic strain of citrus ringspot virus and its relationship to citrus psorosis virus. *Phytopathology* 64: 389-394

Timmer LW, Garnsey SM (1980) Natural spread of citrus ringspot virus in Texas and its association with psorosis-like diseases in Florida and Texas. En: Calavan, E. C., Garnsey, S. M., Timmer L.W., eds. Proc. of the 8th Conf. of IOCV. IOCV, Riverside, California, USA. p. 167-193

Torok VA, Vetten HJ (2002) International Working Groups on Legume Viruses and Vegetable Viruses, Abstracts. p. 4

Tsai CW, Redinbaugh MG, Willie KJ, Reed S, Goodin M, Hogenhout SA (2005) Complete genome sequence and in planta subcellular localization of maize fine streak virus proteins. *J. Virol.* 79: 5304-5314

Vaira AM (2006) A new Ophiovirus species infecting ornamentals. Publicación de la secuencia en NCBI, Enviado el 3 de agosto. Istituto di Virologia Vegetale-CNR, Strada delle Cacce 73, Torino 10135, Italy

Vaira AM, Accotto GP, Costantini, Milne RG (2003) The partial sequence of RNA 1 of the ophiovirus *Ranunculus white mottle virus* indicates its relationship to rhabdoviruses and provides candidate primers for an ophiovirus-specific RT-PCR test. *Arch Virol.* 148(6):1037-50

Vaira AM, Milne RG, Accotto GP, Luisoni E, Masenga V, Lisa V (1997) Partial characterization of a new virus from ranunculus with a divided RNA genome and circular supercoiled thread-like particles. *Archives of Virology*.142(11):2131-2146

Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Sanchez L, Willmitzer L, Rocha-Sosa M (1990) Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol Gen Genet* 220:245-250.

van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JNM, Stuitje A (1990) Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2: 291-299

van der Wilk F, Houterman P, Molthoff J, Hans F, Dekker B, van den Heuvel J, Huttinga H, Golbach R (1997) Expression of the potato leafroll virus ORF0 induces viral-disease-like symptoms in transgenic potato plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 153-159

van der Wilk F, Dullemans AM, Verbeek M, van den Heuvel JF (2002) Nucleotide sequence and genomic organization of an *ophiovirus* associated with lettuce big-vein disease. *Journal of General Virology* 83: 2869-2877

van Wezel R, Liu H, Tien P, Stanley J, Hong Y (2001) Gene C2 of the monopartite geminivirus *Tomato yellow leaf curl virus China* encodes a pathogenicity determinant that is localized in the nucleus. *Mol. Plant-Microbe Interac.* 14: 1125-1134

Vardi A, Bleichman S, Aviv D (1990) Genetic transformation of *Citrus* protoplasts and regeneration of transgenic plants. *Plant Sci.* 69:199-206

Vaucheret H (2006) Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes and Development.* 20: 759-771

Voinnet O (2005) Induction and suppression of RNA silencing: Insights from viral infections. *Nature.* 6: 206-220

Voinnet, O (2001) RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.* 17: 449-459

Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe DC (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33:949-956

von Armin AG, Deng XW, Stacey MG (1998) Cloning vectors for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants. *Gene* 221: 35-43

Wallace JM (1945) Technique for hastening foliage symptoms of psorosis of citrus. *Phytopathology* 35: 535-541

Wallace JM (1957) Virus-strain interference in relation to symptoms of psorosis disease of citrus. *Hilgardia* 27: 223-246

Wallace JM (1978) Virus and virus like diseases. En: Reuther W, Calavan EC, Carman GW (eds.) *The Citrus Industry*, Vol 4, Univ. Calif. Div. Agr. Sci., Richmond. p. 67-184

Wallace JM, Drake RJ (1968) Citrange stunt and ringspot, two previously undescribed virus diseases of citrus. En: *Proc. 4th Conf. IOCV*. Univ. Florida Press, Gainesville. p. 177-183

Ward BM, Lazarowitz SG (1999) Nuclear export in plants: use of geminivirus movement proteins for a cell-based export assay. *Plant Cell.* 11: 1267-1276

Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 13959-13964

Waterhouse PM, Helliwell CA (2003) Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat. Rev. Genet.* 4: 29-38

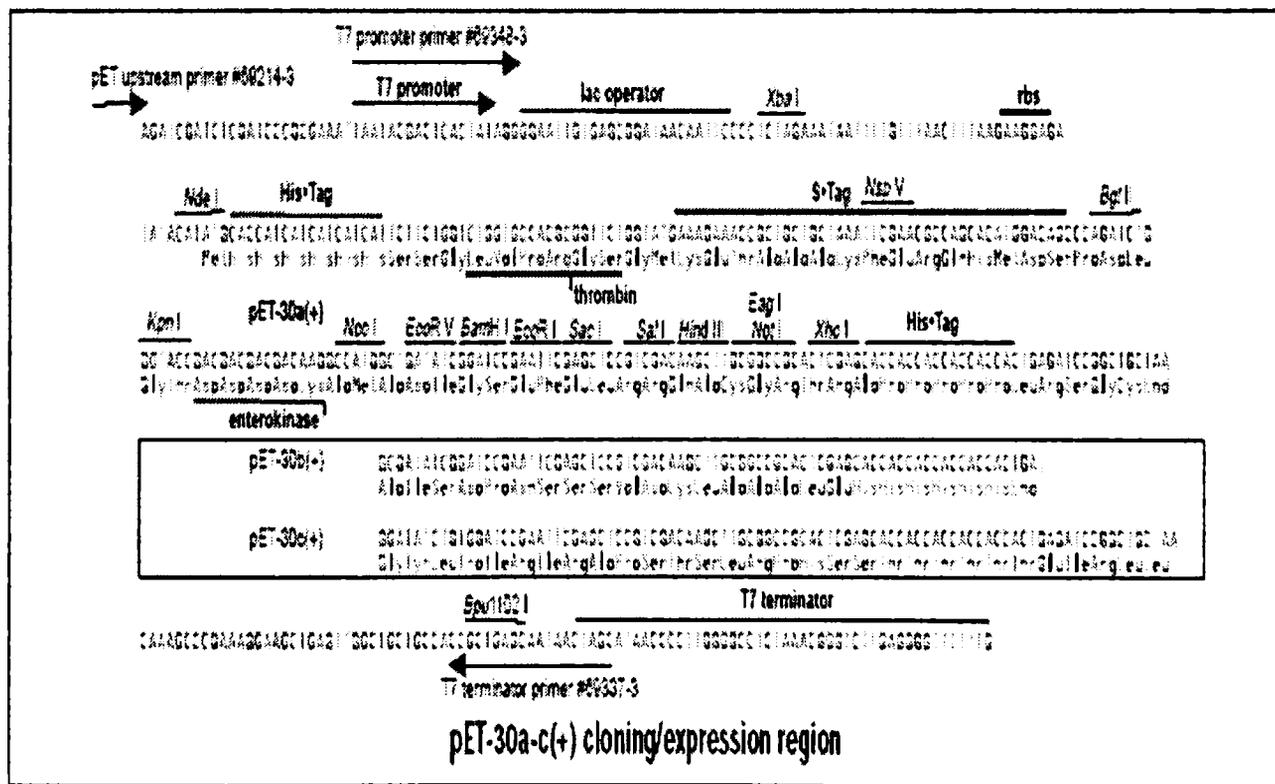
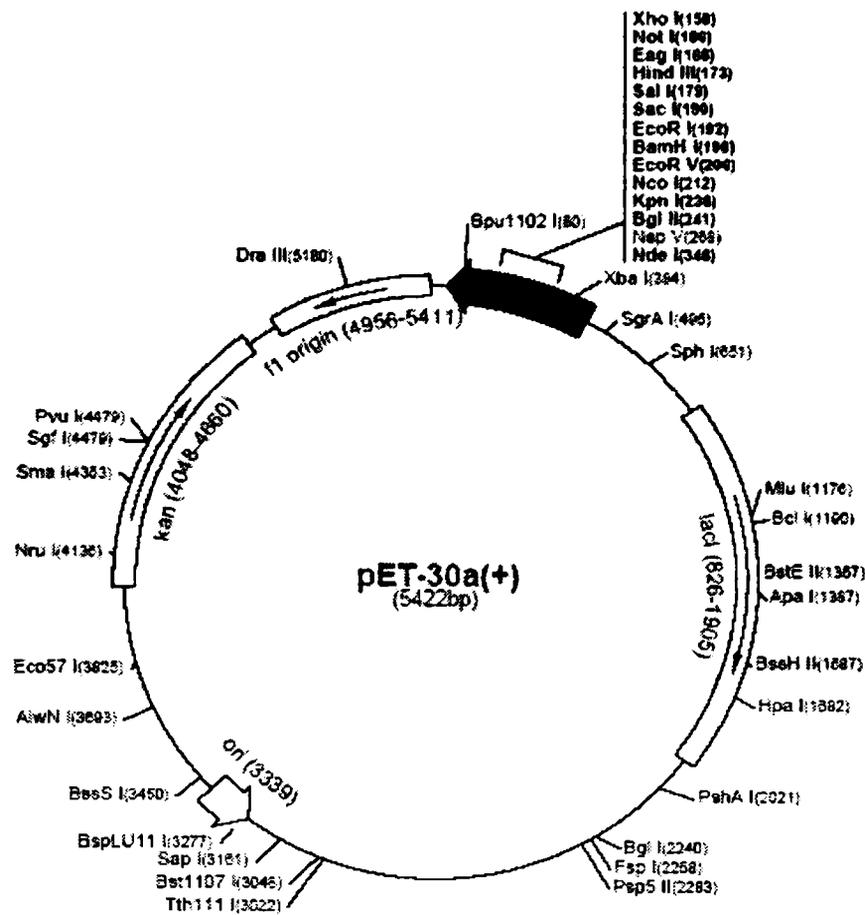
Wen W, Taylor SS, Meinkoth JL (1995) The expression and intracellular distribution of the heat-stable protein kinase inhibitor is cell cycle regulated. *J. Biol. Chem.* 270 (5): 2041-2046

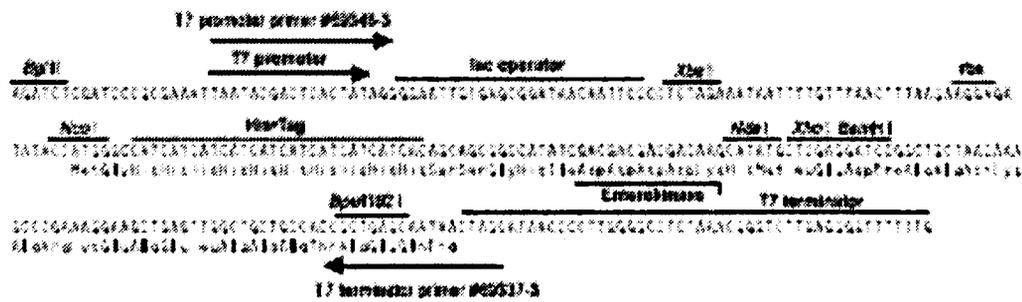
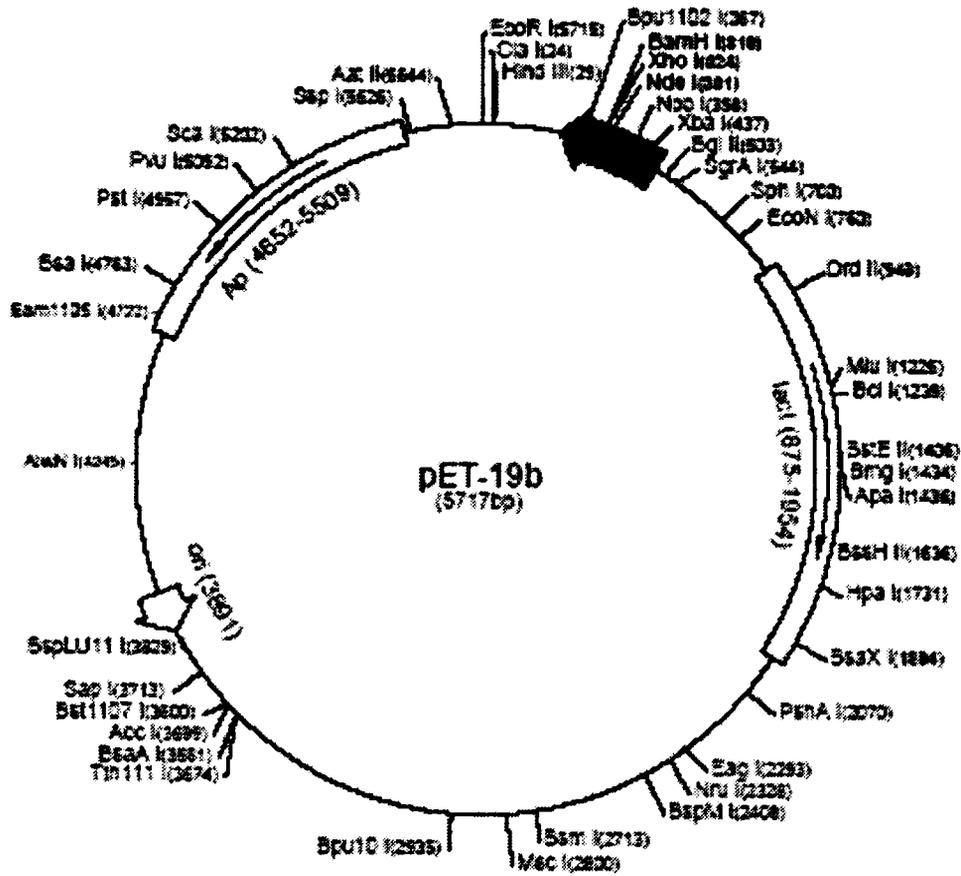
Yang ZN, Ingelbrecht IL, Louzada E, Skaria M, Mirkov TE (2000) *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red (*Citrus paradisi* Macf.) *Plant Cell Rep* 19:1203-1211

Yan HL, Wang WT, He Y, Zhao ZY, Gao YJ, Zhang Y, Sun SH (2004) Construction, expression and characterization of a recombinant annexin B1-low molecular weight urokinase chimera in *Escherichia coli*. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 36: 184-190

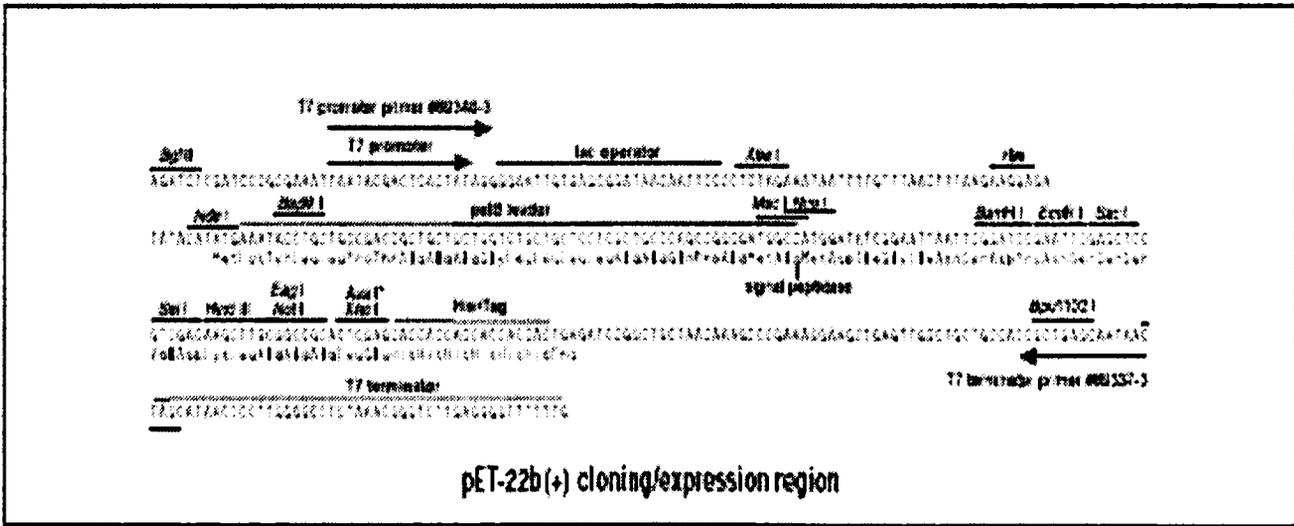
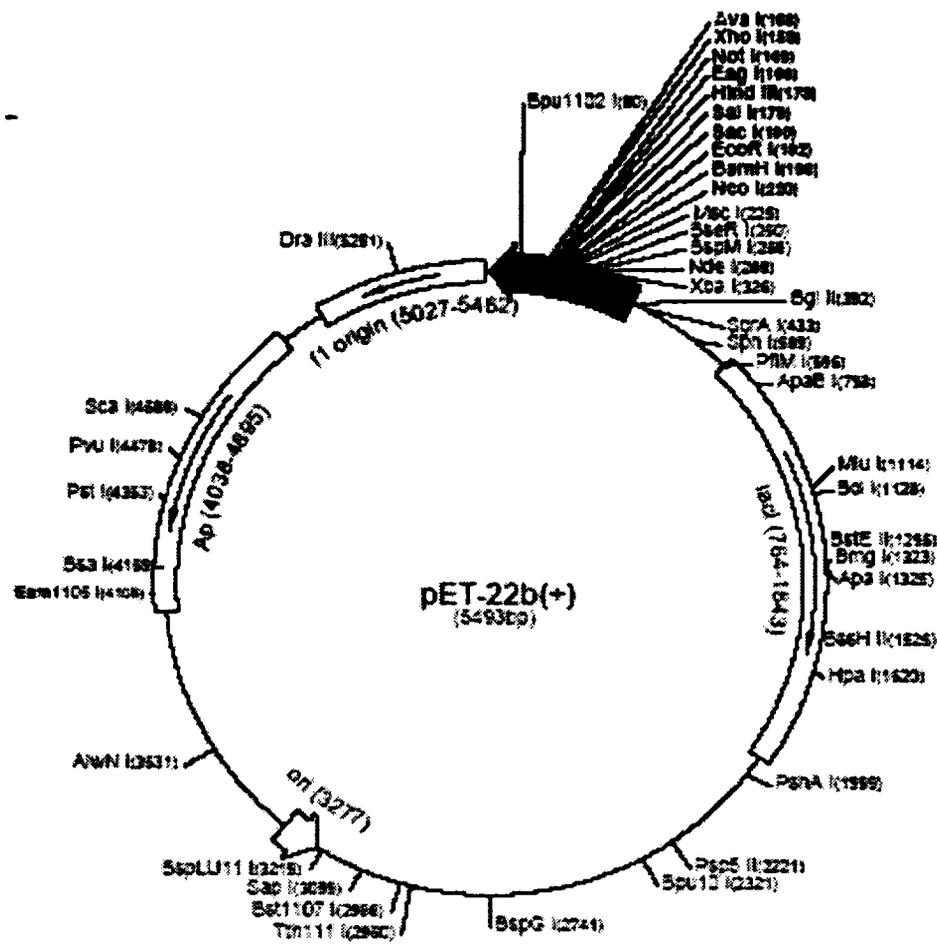
Zanek MC, Peña EJ, Reyes CA, Figueroa J, Stein B, Grau O, García ML (2006) Detection of Citrus psorosis virus in the northwestern citrus production area of Argentina by using an improved TAS-ELISA. *J Virol Methods* 137: 245-251

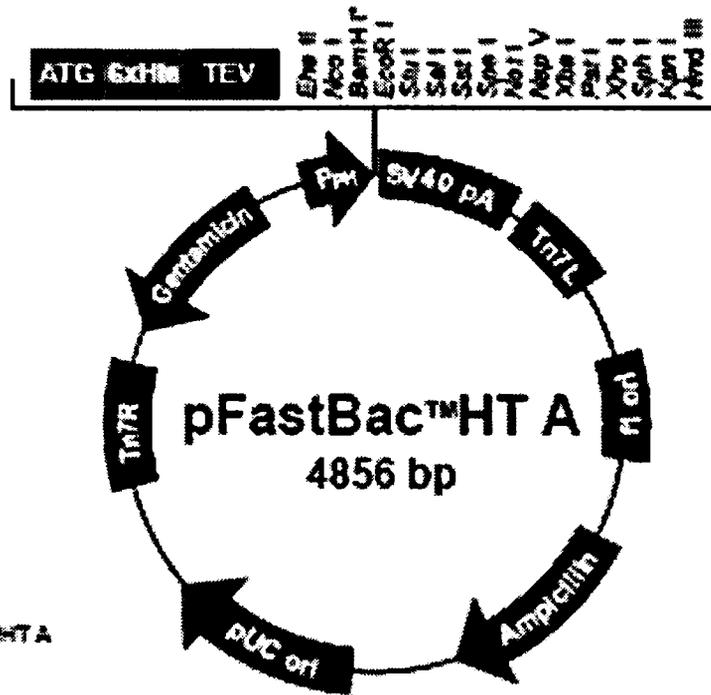
Zwirner NW (1996) ELISA. En: Margni RA, *Inmunología e Inmunoquímica*. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana, Argentina, p. 798-820.





pET-19b cloning/expression region





Comment: for pFastBac™ HT A
4856 nucleotides

- N origin: bases 2-457
- Ampicillin resistance gene: bases 589-1449
- PUC origin: bases 1594-2267
- Tn7R: bases 2511-2736
- Gentamicin resistance gene: bases 2802-3335 (complementary strand)
- Polyhedrin promoter (P_{ph}): bases 3504-4032
- Initiation ATG: bases 4053-4062
- 6xHis tag: bases 4062-4079
- TEV recognition site: bases 4101-4121
- Multiple cloning site: bases 4119-4222
- SV40 polyadenylation signal: bases 4240-4480
- Tn7L: bases 4626-4674

*Frameshift occurs at the BamHI site in each vector

Start of Transcription

Polyhedrin promoter

1901 TAGATCAATGG AGATAATTAA AATGATAACC ATCTCGCAAA TAAATAAGTA
wild-type ATG mutated to ATT

1951 TTTTACTGTT TDCGTRACAG ITTGTGAATA AAAAACCCTA TAAATATTC

1001 GGATTAATICA TACCGTCCCA CCATCGGGCG CGGATCTCGG TCGGAAACC

6xHis tag

1050 ATG TCG TAC TAC CAT CAC CAT CAC CAT CAC GAT TAC GAT ATC
 Met Ser Tyr Tyr His His His His His His Asp Tyr Asp Ile

TEV recognition site

1092 CCA ACG ACC GAA AAC CTG TAT ITT CAG GGC GGC ATG GGA TCC
 Pro Thr Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ala Met Gly Ser
TEV cleavage site

EcoRI StuI SalI SalI SpeI NotI

1134 GGA ATT CAA AGG CCT ACG TCG ACG AGC TCA CIA GIC GCG GCC
 Gly Ile Glu Arg Pro Thr Ser Thr Ser Ser Leu Val Ala Ala

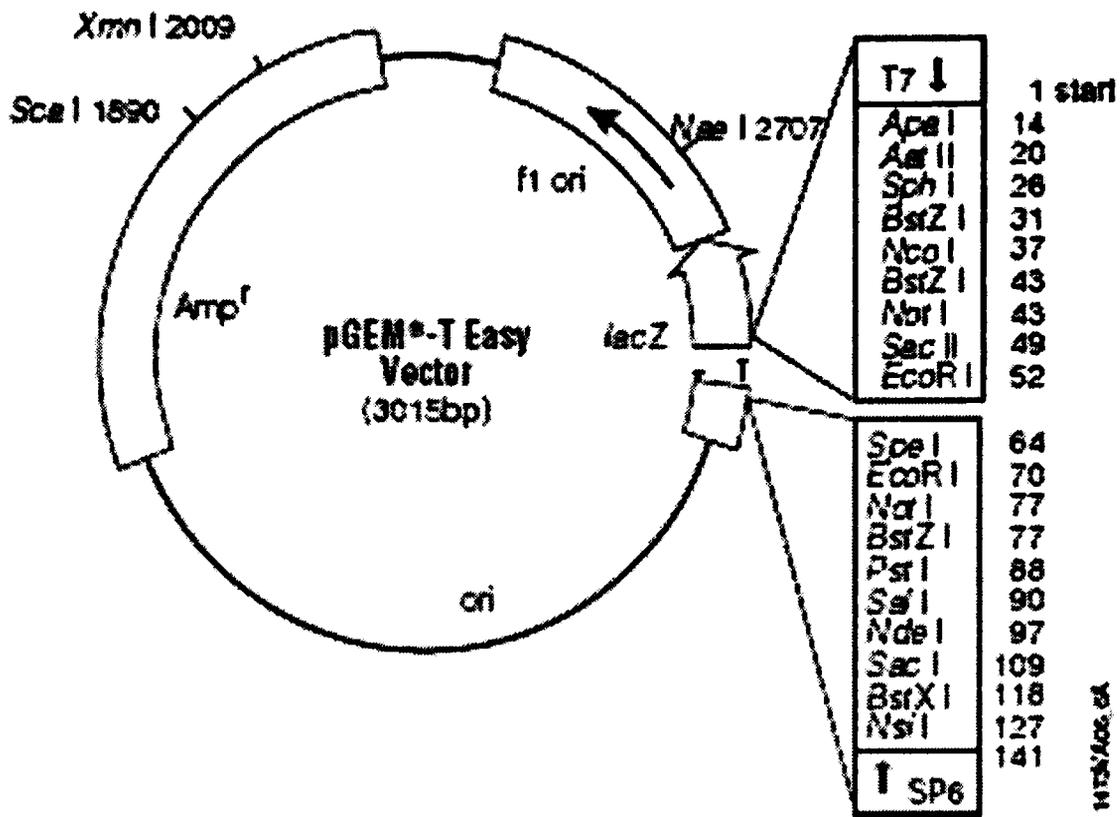
NspV XbaI PstI XhoI SphI KpnI

176 GCT ITC GAA TCT AGA GGC TGC AGT CTC GAG GCA TGC GGT ACC
 Ala Phe Glu Ser Arg Ala Cys Ser Leu Glu Ala Cys Gly Thr

HindIII

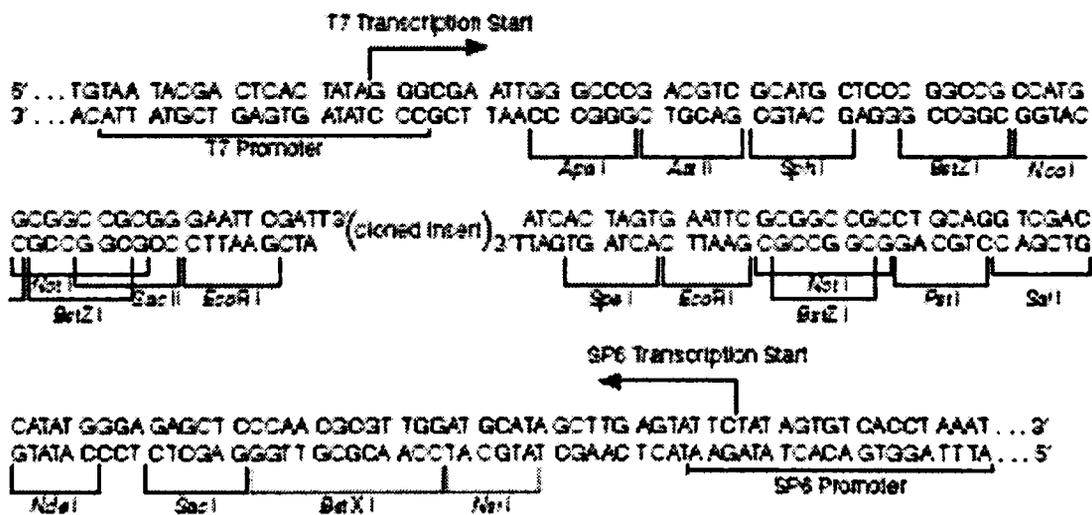
SV40 polyadenylation signal

1218 AAG CTT GTC GAG AAG TAC TAG AG GATCATAATC AGCCATACCA ...
 Lys Leu Val Glu Lys Tyr ***



WTS/Doc. 04

pGEM[®]-T Easy Vector



WTS/Doc. 04

Primers y condiciones utilizadas en las reacciones de PCR desarrolladas en el trabajo de tesis

Primers	Tm (°C)	Tiempo de extensión (seg.)[§]
CPV1 – CPV2	48	50
24kdir – 24krev	50	50
100Pdir – 100Pprev	50	25
100Pdir – T7term	50	40
54k9011dir – 54k9011rev	50	90
1GUS – 2GUS	60	50
1NPT – 2NPT	55	50
1GFP – 2GFP	60	50
25 - p1569	50	90
25 - B	50	40
A – B	50	30
M13dir – M13rev	55	150
SP6 – T7prom	50	*
T7prom – T7term	50	*
T7prom – A	50	90
T7term – B	50	40
SP6 – 24krev	50	50
CPV3 – C2	50	40
C2 – NC2	50	30
54k9011rev – B	50	40
54k9011dir – A	50	80
24kdir2 – 24krev	50	50
54kdir – 54k9011rev	50	90
48kdir – 48krev	50	90
54kdir – A	50	80

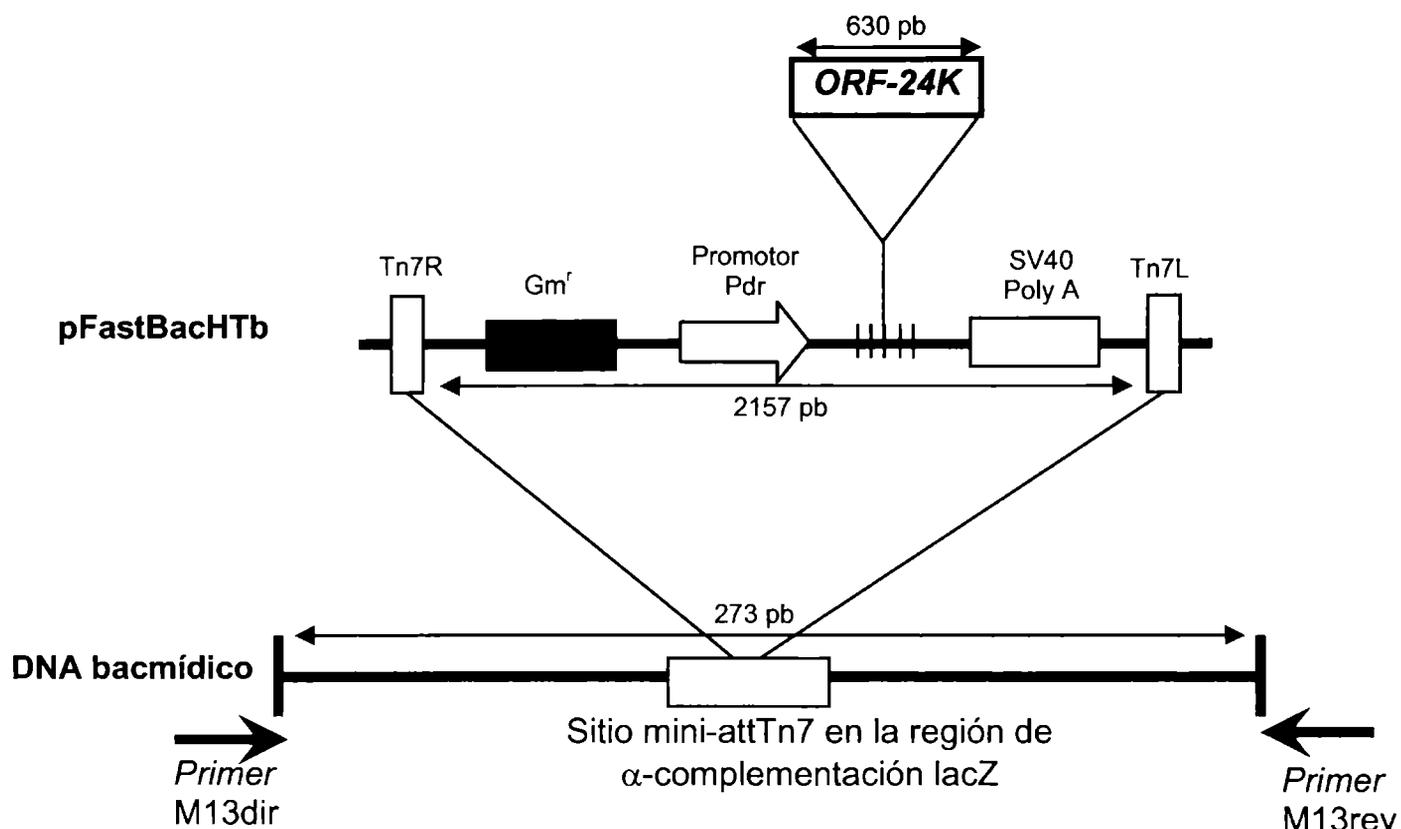
[§]Tiempo de extensión cuando se utilizó Taq DNA polimerasa considerando la procesibilidad de la enzima (1 min por cada 1 Kb amplificado). Cuando se utilizó Pfu polimerasa (Promega) se duplicó el tiempo de extensión.

* Depende del tamaño del fragmento introducido en el plásmido.

Los primers descritos en Materiales y Métodos no incluidos en esta tabla solamente fueron usados para secuenciación.

Equipamiento utilizado: *Gene Amp PCR System 2400 (PERKIN ELMER)*

Región de transposición del DNA del Bámido en el sistema Bac-to-Bac™



Región de transposición de bámido contenido en la cepa DH10Bac. Una vez ocurrida la transposición entre el fragmento del plásmido pFastBacHT-24K y el plásmido parental, utilizando los primers M13dir y M13rev en una reacción de PCR, resulta en la amplificación de un fragmento de 3060 pb.

Detection of *Citrus psorosis virus* in the northwestern citrus production area of Argentina by using an improved TAS-ELISA

Zanek MC, Peña EJ, Reyes CA, Figueroa J, Stein B, Grau O, García ML (2006)

Journal of Virological Methods 137: 245-251



Detection of *Citrus psorosis virus* in the northwestern citrus production area of Argentina by using an improved TAS-ELISA

Maria Cecilia Zaneck^a, Eduardo Peña^a, Carina Andrea Reyes^a, Julia Figueroa^b,
Beatriz Stein^b, Oscar Grau^{a,c}, Maria Laura Garcia^{a,*}

^a Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM), Facultad de Ciencias Exactas, Calles 47 y 115, 1900 La Plata, Argentina

^b Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, Tucumán, Argentina

^c CICBA, Argentina

Received 12 April 2006; received in revised form 12 June 2006; accepted 15 June 2006

Available online 26 July 2006

Abstract

Citrus Psorosis in Argentina is a serious disease. Citrus is produced in two regions located in the northeast (NE) and northwest (NW) area of the country. These two areas have different climates and soil types, and therefore different citrus species and varieties are cultivated. In the NE region, Psorosis is epidemic, and in the NW region, the disease was described on several occasions since 1938, but it is not observed commonly in the orchards. Recently, trees with symptoms of Psorosis were observed in the Tucumán and Salta Provinces located in the NW region. Epidemiological studies in Argentina and Texas suggested that the disease is spread naturally by an unknown vector. The causal agent of the disease is the *Citrus psorosis virus* (CPsV), which can be detected by TAS-ELISA, RT-PCR and indicator plants.

A new more rapid TAS-ELISA-HRP (horseradish peroxidase) is described which is more reliable, faster and more sensitive than the currently used for this virus, the TAS-ELISA-AP (alkaline phosphatase). Psorosis was detected by this improved method in few trees in the orchards of the Tucumán Province, in the NW citrus region, although natural spread does not seem to occur.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Psorosis; CPsV detection; TAS-ELISA

1. Introduction

Citrus Psorosis has been observed in many countries, but in Argentina and Uruguay, it is a serious disease causing important economical losses (Larocca, 1985; Danós, 1990).

Citrus Psorosis is propagated mainly by infected budwood, however, a certification program carried out in the NE of Argentina has not been sufficient to control the disease. Epidemiological observations in Argentina and Texas suggested that the disease is spread naturally (Pujol and Beñatena, 1965; Timmer, 1974; Timmer and Beñatena, 1977; Timmer and Garnsey, 1980; Beñatena and Portillo, 1984; Danós, 1990; Palle et al., 2004; Gottwald et al., 2004). Disease development is slow; it may take several years to manifest symptoms, which include bark scaling of the trunk, and chlorotic flecks and spots on young leaves. Gum may accumulate below the bark scales and may impreg-

nate the xylem producing wood staining and vessel occlusion. These symptoms have been used for field diagnosis of Psorosis (Roistacher, 1991, 1993).

In Argentina, citrus is produced in two regions located in the NE and NW regions of the country. These two areas have different climates and soil types, and therefore different citrus species and varieties are cultivated. Tangerine and orange are grown in the NE region, whereas in the NW region grapefruit is important in the north (Salta and Jujuy Provinces) and a large lemon producing area has been developed in the Tucumán Province. Argentina is the major lemon producing country in the world and 90% of the production comes from the Tucumán Province (1.25 million tonnes) (Federcitrus, 2005). CPsV infects lemons, but does not cause the bark scaling symptoms and is not important economically in that species.

In the NE region, Psorosis is epidemic, and in the NW region, the disease is present but it is not observed commonly in the orchards. It has been described in the Tucumán Province and NW region by different investigators since 1938 (Fawcett, 1938, 1939; Fernández Valiela, 1961; Foguet, 1966). At first,

* Corresponding author. Tel.: +54 221 4259223; fax: +54 221 4259223.

E-mail address: garcia_m@biol.unlp.edu.ar (M.L. Garcia).

diagnosis was done in the field only by visual symptoms and diseased trees were eliminated, limiting the dispersal of the disease in Tucumán. Recently, a few isolated trees with symptoms of Psorosis were observed in a commercial orange orchard in the Tucumán Province, whereas in the Salta Province symptoms are observed more frequently in old orange orchards.

The causal agent of the disease is the *Citrus psorosis virus* (CPsV) and its genome consists of three ssRNAs of negative polarity. Several methods are available for the detection of Psorosis (Martín et al., 2004). The RNA 3 of CPsV codes for the coat protein (CP or 48 K protein) (Sánchez de la Torre et al., 1998) and it has been used for detection of the virus. Biological indexing is undertaken by graft inoculating citrus indicator plants and then testing for cross-protection with a severe isolate (Roistacher and Calavan, 1965; Roistacher, 1991, 1993). DAS-ELISA (García et al., 1997) and TAS-ELISA (Alioto et al., 1999) are methods developed and applied for Psorosis diagnosis in field trees. Several primers have been designed for the CPsV detection by the RT-PCR providing an alternative method for diagnosis (Barthe et al., 1998; Legarreta et al., 2000). Nowadays, TAS-ELISA and RT-PCR are the most reliable and rapid methods for detecting the presence of the virus in presumed infected-trees in the field (Martín et al., 2002).

A new more rapid TAS-ELISA (TAS-ELISA-HRP) is described which is more precise and has a lower detection limit. This method was applied to field samples from the NW citrus orchards, and to transgenic sweet oranges expressing very low amounts of viral coat protein (Zanek et al., 2005). Biological indexing, RT-PCR and the TAS-ELISA methods were compared.

2. Materials and methods

2.1. Citrus transgenic samples

Transgenic lines were obtained by Agro-transformation using a construct carrying the coat protein gene under the 35S promoter. Leaf tissue from the transgenic CP-lines 1, 18, 20, 21, 23, 28, 29, 34, 96 were taken from the greenhouse, together with healthy and virus-infected controls.

2.2. Field Psorosis samples

Samples from 26 field trees of Westin and Valencia sweet oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osb.), and Cleopatra mandarin (*Citrus reshni* Hort. ex Tan) presumed to be Psorosis-infected were collected in several orchards in the Tucumán and Salta Provinces (Argentina). Some of the symptomless neighbor trees near the symptomatic plants and samples from the greenhouse, produced during the biological indexing on the Pineapple sweet orange indicator, were also collected and examined.

2.3. Biological indexing

Biological indexing using Pineapple sweet orange seedlings was carried out according to standard protocols (Roistacher, 1991). Briefly, four 15-month-old seedlings were graft-

inoculated with three bark chips taken from each Psorosis sample. Symptoms (flecking, spots and shock) on the new flush were recorded periodically, during five flushes post-inoculation. Since the characteristic symptoms expressed in indicator plants are also manifested by other diseases, a cross-protection assay, as a more specific test, was applied (Roistacher and Calavan, 1965; Roistacher, 1991). For this assay, the Ps 189-34 (Experimental Station INTA-Concordia collection) a Psorosis B isolate was chosen to challenge seedlings inoculated previously with the presumed Psorosis-infected tissue (Table 2).

2.4. TAS-ELISA procedure

Two antisera were used for immunological methods. The first was that described by García et al. (1997) and then used in the TAS-ELISA developed by Alioto et al. (1999). That polyclonal antiserum (A322) was obtained by injecting rabbits with partially purified virus. After this polyclonal antiserum was exhausted, a new polyclonal antiserum was produced by P. Roggero (IVA, Torino, Italy), by injecting rabbits with partially purified virus particles and a recombinant coat protein expressed in *E. coli* donated by Pedro Moreno (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Valencia, Spain). This antiserum A376 has been kindly provided by Pedro Moreno. The monoclonal antibody used in these assays was the MAbs 13C5 (IgG) (Alioto et al., 1999), kindly provided by Robert Milne (Istituto di Virologia Vegetale, Torino, Italy).

2.4.1. TAS-ELISA-AP (AP, alkaline phosphatase)

Triple sandwich immunoassay (TAS-ELISA-AP) was carried out essentially as described by Alioto et al. (1999). Briefly, total protein was extracted from 200 mg of leaf tissue frozen in liquid nitrogen by grinding with 10 volumes of PBS buffer containing 0.1% (v/v) of Tween 20 (PBS-T), 2% (w/v) polyvinyl pyrrolidone (PVP-40000), and 2.5% (w/v) of nonfat milk powder. Wells were first coated with the A376 polyclonal antiserum 1/2500 dilution and the plates incubated for 4 h at 37 °C. After washing, aliquots of total protein preparations were added and incubated overnight at 4 °C. Each sample was tested in triplicate. After the wells were washed, incubation for 90 min at 37 °C was done with the MAbs 13C5, and later with the goat anti-mouse IgG (H + L) alkaline phosphatase (GIBCO BRL). Readings were done after incubations of 2 and 24 h with the substrate at room temperature. The overall time of this method is 24–48 h. Mean experimental readings at least three times the mean reading of the negative controls were considered positive. Optical density (OD) at 405 nm was measured in a Tecan Spectra (Austria).

2.4.2. TAS-ELISA-HRP (HRP, horseradish peroxidase)

This test was performed as TAS-ELISA-AP with modifications, using the same polyclonal antiserum A376, but the second antiserum was the goat anti-mouse IgG (H + L) horseradish peroxidase (PIERCE). The substrate was incubated for 30 min at room temperature and the reaction stopped with 0.7 M H₂SO₄. Optical density was measured at 492 nm. The overall time of this method is 22–23 h.

2.5. Detection by RT-PCR

After grinding 200 mg of leaf tissue with liquid nitrogen, RNA was extracted following the manufacturer instructions of TRIZOL[®] Life Technologies. Total RNA was used for reverse transcription and PCR using the primers CPV1 and CPV2, designed in the coat protein gene by Barthe et al. (1998).

3. Results

The OD values obtained from the PBS buffer (control) and the healthy samples are very similar to each other by the TAS-ELISA (Fig. 1 and Table 1). Therefore, the subtractions H minus PBS were as low as 0.001, or negative. In these cases, the OD ratios between the unknown and the healthy values were extremely high (hundreds and thousands) or negative, which are of no biological significance. For these reasons, we have used the OD readings of the samples without subtracting the PBS value. Values of OD three times the average of the healthy control have been considered as positive for the detection of CPsV (García et al., 1997; Alioto et al., 1999).

3.1. Comparison of TAS-ELISA methods

TAS-ELISA was optimized with the polyclonal A376, which was used to compare the modified TAS-ELISA (TAS-ELISA-HRP) with the former phosphatase procedure (TAS-ELISA-AP). Fig. 1A shows the optical density (OD) values obtained in nine transgenic lines with different levels of coat protein expression. According to the threshold considered above (T/H ratio of 3, indicated by the broken lines), all samples were negative by TAS-ELISA-AP, 2 and 24 h of incubation. However, the TAS-ELISA-HRP detected the coat protein in six of the nine transgenic lines. The standard deviations (indicated by the bars) in the TAS-ELISA-AP are higher after 24 h than at 2 h, and in general, they are higher than those obtained in the HRP (Fig. 1A).

A quantitative analysis (ANOVA) of absorbance values (T/H) obtained with both methods revealed significantly higher values ($P < 0.001$) using the TAS-ELISA-HRP than the TAS-ELISA-AP. The TAS-ELISA-HRP was 1.9–5.1 times more sensitive than TAS-ELISA-AP at 2 h, and 1.5–3.3 times at 24 h of incubation (Fig. 1B).

Fig. 2 shows a comparison of the methods when applied to a serial dilution of extract of the infected plant in PBS-T buffer. At

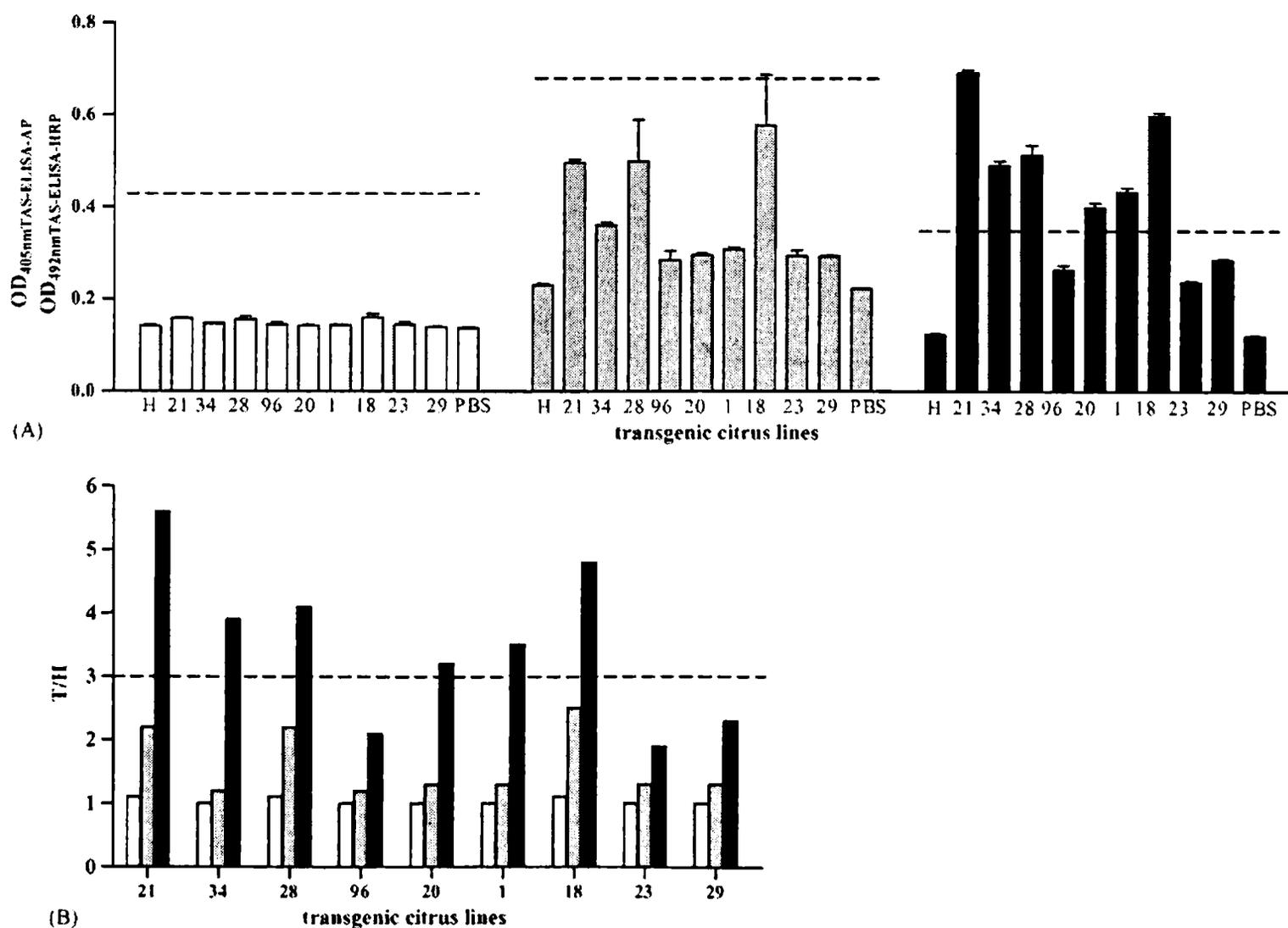


Fig. 1. Comparison of the TAS-ELISA for the detection of CPsV coat protein in transgenic citrus plants. (A) OD values are the average of triplicate samples, and the bars indicate the standard deviation. The broken lines indicate the value of three times the OD of healthy citrus. (B) T/H : rate of transgenic OD value (T) on the healthy OD value (H). T/H ratio of 3 is indicated by the broken line. The OD values were obtained in the same plate with the same extracts. Empty bars: TAS-ELISA-AP (2 h); grey bars: TAS-ELISA-AP (24 h) and black bars: TAS-ELISA-HRP.

Table 1
Comparison of the TAS-ELISA for the detection of CPsV coat protein in field citrus and greenhouse-seedling samples

Sample	TAS-ELISA-AP (2 h)		TAS-ELISA-AP (24 h)		TAS-ELISA-HRP		(I/H HRP)/(I/H AP)	
	OD	I/H	OD	I/H	OD	I/H	2 h	24 h
Experiment 1								
1	0.170 (0.010)	1.4	1.447 (0.030)	5.5	0.364 (0.002)	5.6	4	1
2	0.133 (0.011)	1.1	0.257 (0.005)	1	0.060 (0.005)	0.9	0.8	0.9
3	0.126 (0.011)	1	0.248 (0.012)	0.9	0.067 (0.006)	1	1	1.1
4	0.170 (0.015)	1.4	1.898 (0.552)	7.2	0.386 (0.010)	6	4.3	0.8
5	0.115 (0.003)	0.9	0.246 (0.007)	0.9	0.058 (0.002)	0.9	1	1
6	0.136 (0.029)	1.1	0.271 (0.030)	1	0.061 (0.002)	0.9	0.8	0.9
7	0.146 (0.008)	1.2	1.076 (0.320)	4.1	0.197 (0.014)	3	2.5	0.7
8	0.117 (0.005)	0.9	0.268 (0.025)	1	0.063 (0.003)	1	1.1	1
9	0.115 (0.003)	0.9	0.246 (0.002)	0.9	0.058 (0.003)	0.9	1	1
10	0.120 (0.004)	1	0.253 (0.008)	1	0.061 (0.006)	0.9	0.9	0.9
11	0.117 (0.007)	1	0.254 (0.030)	1	0.063 (0.006)	1	1	1
12	0.190 (0.018)	1.6	2.265 (0.663)	8.6	0.435 (0.006)	6.7	4.2	0.8
13	0.171 (0.004)	1.4	1.471 (0.046)	5.6	0.466 (0.015)	7.2	5.1	1.3
14	0.118 (0.004)	1	0.251 (0.001)	1	0.060 (0.002)	0.9	0.9	0.9
15	0.114 (0.006)	1	0.267 (0.022)	1	0.066 (0.008)	1	1	1
16	0.118 (0.008)	1	0.258 (0.016)	1	0.064 (0.002)	1	1	1
PBS	0.123 (0.005)	1	0.276 (0.009)	1	0.060 (0.004)	0.9	1.1	1.1
Healthy citrus ^a	0.120 (0.012)		0.263 (0.012)		0.065 (0.002)			
Experiment 2								
17	0.110 (0.003)	0.9	0.280 (0.006)	1	0.108 (0.008)	1.1	1.2	1.1
18	0.132 (0.040)	1.1	0.283 (0.009)	1	0.114 (0.013)	1.2	1.1	1.2
19 ^a	0.110 (0.009)	0.9	0.293 (0.028)	1.1	0.103 (0.004)	1	1.1	0.9
20	0.112 (0.006)	0.9	0.281 (0.009)	1	0.103 (0.005)	1.1	1.2	1.1
21	0.108 (0.004)	0.9	0.271 (0.007)	1	0.099 (0.002)	1	1.1	1
22	0.111 (0.005)	0.9	0.278 (0.011)	1	0.099 (0.003)	1	1.1	1
23	0.109 (0.008)	0.9	0.270 (0.009)	1	0.098 (0.005)	1	1.1	1
24	0.108 (0.003)	0.9	0.272 (0.013)	1	0.101 (0.005)	1	1.1	1
25	0.105 (0.002)	0.8	0.268 (0.008)	1	0.098 (0.002)	1	1.2	1
26	0.107 (0.003)	0.9	0.270 (0.003)	1	0.095 (0.004)	1	1.1	1
27	0.107 (0.006)	0.8	0.270 (0.006)	1	0.099 (0.006)	1	1.2	1
28	0.137 (0.034)	1.1	0.282 (0.004)	1	0.099 (0.006)	1	0.9	1
29	0.108 (0.006)	0.9	0.284 (0.018)	1	0.098 (0.004)	1	1.1	1
30	0.109 (0.004)	0.93	0.280 (0.010)	1	0.096 (0.002)	1	1.1	1
31	0.118 (0.014)	0.9	0.277 (0.007)	1	0.097 (0.007)	1	1.1	1
32 ^b	0.293 (0.018)	2.3	3.028 (0.062) ^c	11.1	0.395 (0.009)	4.1	1.8	ND
33 ^b	0.320 (0.020)	2.5	3.527 (0.029) ^c	12.9	0.441 (0.009)	4.6	1.8	ND
PBS	0.114 (0.007)	0.9	0.293 (0.009)	1.1	0.102 (0.006)	1.1	0.8	1
Healthy citrus ^a	0.126 (0.024)		0.273 (0.013)		0.096 (0.005)			

Experiments 1 and 2 were done in parallel but in different plates. The OD values refer to mean optical densities for three wells (standard deviation are in brackets). ND: not done.

^a Negative control.

^b Positive control.

^c The OD values were not linear readings.

24 h, both TAS-ELISA procedures detect the coat protein when the sample contains a high level of antigen (dilutions up to 1/40) with the same level of sensitivity (data not shown). However, the TAS-ELISA-HRP can clearly show a I/H of 3 (positive sample) when the TAS-ELISA-AP gave a rate of 2.3 (negative sample) in the more dilute extract.

Table 1 shows the results of both TAS-ELISA methods applied to field and greenhouse samples. The results of TAS-ELISA-AP at 24 h of incubation were coincident with the TAS-ELISA-HRP in all samples, detecting the presence of the virus. However, it is clear that I/H ratio between HRP/AP were higher at 2 h in all positive samples.

3.2. Presence of CPsV in the NW region

The expression of the symptoms in indicator plants and the molecular analysis are important for a precise diagnosis of Psorosis. Special skills are necessary for the indexing, and it is slow and costly, but it has been carried out in order to confirm and to compare it with the molecular analysis, RT-PCR and ELISA. The four methods gave the same results when applied to all samples, taken from different citrus orchards of the NW region. Results of samples 1–16 (experiment 1) are shown in Table 2. Samples 17–31 (experiment 2) were negative (data not shown) although all of them showed bark-scaling symptoms in

Table 2
Diagnosis of Psorosis in the NW citrus region

Sample	Origin	Symptoms in the field	Symptoms in indicator plants	Cross-protection	TAS-ELISA-HRP	RT-PCR
1	Field (Tucumán)	Bs, PsB, Ls, S, G	Ls, S, PsB	ND	+	+
2	Field (Tucumán) neighbor of 1	No symptoms	Negative	Negative	–	–
3	Field (Tucumán) neighbor of 1	No symptoms	Negative	Negative	–	–
4	Field (Tucumán)	Bs, PsB, Ls, G	Ls, S, PsB	ND	+	+
5	Field (Tucumán) neighbor of 4	No symptoms	Negative	Negative	–	–
6	Field (Tucumán) neighbor of 4	No symptoms	Negative	Negative	–	–
7	Field (Tucumán)	Bs, PsB, Ls, G	Ls, S, PsB	ND	+	+
8	Field (Tucumán) neighbor of 7	Bs	Negative	Negative	–	–
9	Field (Tucumán) neighbor of 7	No symptoms	Negative	Negative	–	–
10	Field (Tucumán)	Bs	Ls, oak leaf symptoms	Negative	–	–
11	Field (from Orán, Salta)	Bs, G	Ls, oak leaf symptoms	Negative	–	–
12	Greenhouse (sample 7)	Bs, PsB, Ls, S, G	Ls, S, PsB	ND	+	+
13	Field (Tucumán)	Bs	Ls, S	Positive	+	+
14	Greenhouse (sample 8)	Bs	Negative	Negative	–	–
15	Greenhouse (sample 2)	No symptoms	Negative	Negative	–	–
16	Greenhouse (sample 3)	No symptoms	Negative	Negative	–	–

Comparison of the indexing, TAS-ELISA-HRP, and RT-PCR for the detection of CPsV in field citrus. Bs: bark scaling; PsB: blister in twigs, yellow blotches in old leaves with gummy pustules in the leaf underside; LS: chlorotic flecking or spotting in young leaves; G: gum in a transversal section of the trunk; S: shock reaction (leaf shedding and necrosis of young shoots); ND: not done. Negative cross-protection indicates that the Psorosis isolate assayed (first grafting) was not able to protect against the Psorosis B isolate (second grafting). Samples 1–9 were taken from Westin sweet orange trees, sample 10 from a Cleopatra mandarin, all from the Tucumán Province. Sample 11 is from a Valencia orange from the Salta Province, and sample 13 is from a sweet orange. Samples 12, 14, 15 and 16 were taken from the graft-inoculated seedlings in the greenhouse.

the field. Several of those samples (1, 4 and 7) manifested Psorosis B symptoms, a more aggressive Psorosis found in the field, and samples 10 and 11 manifested oak leaf symptom, which has been described as a concave gum symptom. The cross-protection against the Psorosis B isolate was negative for both samples, indicating that these candidate trees were not Psorosis-infected. greenhouse samples (15, 16, 12 and 14) taken from the biological test of isolates 2, 3, 7 and 8, respectively, gave the same results confirming those of the original plants.

The presence of the virus was also investigated in the symptomless neighbor trees of samples 1, 4 and 7 (2–3, 5–6 and 9, respectively) and in tissue taken from the seedlings of the biological indexing (samples 12, 15 and 16) and all were negative for CPsV. In the case of sample 8 (a neighbor of sample 7) and

sample 14 (taken from the biological indexing of the 8), the tests were negative even though bark-scaling symptoms were observed, as well as in the samples 17–31, probably produced by unknown cause different from the CPsV agent.

4. Discussion

In recent years, Alioto et al. (1999) developed a TAS-ELISA method to detect CPsV, and Martín et al. (2002) have compared it with other methods including biological indexing, molecular hybridization, and RT-PCR. Using the polyclonal A322 and the MAbs 13C5 antisera, TAS-ELISA is very highly sensitive and comparable to the level of the RT-PCR.

In our experience and that of other researchers in Italy and Spain (Alioto and Martín, personal communication), the high specificity of the TAS-ELISA in non-infected samples always gives OD values as low as the PBS OD values, resulting in I/H ratios with no real biological meaning. For this reason, the PBS values were not subtracted from the sample values. Moreover, when OD values higher than the blank were taken, the differences obtained by TAS-ELISA-HRP were higher than those from the TAS-ELISA-AP.

The polyclonal A322 is still used in many laboratories around the world to detect CPsV by TAS-ELISA-AP, but it has been almost exhausted. Although the A322 and the A376 polyclonal antisera were not compared in the same plate with the same samples, the TAS-ELISA-AP was carried out with both antisera and they seem to have similar levels of detection (data not shown).

In the present investigations, transgenic citrus, carrying the coat protein gene, were obtained, in order to develop pathogen-derived resistance. Analyzing nine transgenic lines, the CP was not detected in Western blot due to the low amount of protein expressed from the transgene. For this reason, the TAS-ELISA-HRP was used for the detection of the CP in these samples.

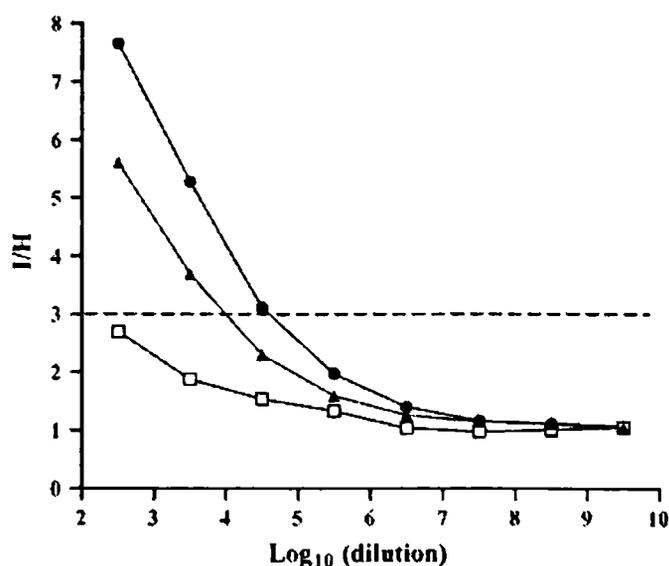


Fig. 2. Comparison of the end point of the TAS-ELISA detection for CPsV in infected citrus plants. I/H : rate of infected OD value (I) on the healthy OD value (H). (□) TAS-ELISA-AP (2 h); (▲) TAS-ELISA-AP (24 h) and (●) TAS-ELISA-HRP.

In order to compare both methods in the same plate, serial dilution of an infected extract also clearly showed the increased sensitivity of TAS-ELISA-HRP by a factor of 8 after 2 h of incubation, or a factor of 2 if compared 24 h later. That difference can be definitive when the sample is in doubt. In the case of field samples, the TAS-ELISA-HRP detects with essentially the same sensitivity than TAS-ELISA-AP at 24 h. After 30 min of incubation with the substrate, the TAS-ELISA-HRP readings have been at least twice as high as the TAS-ELISA-AP readings after 2 h of incubation. In 1999, using TAS-ELISA-AP, Alioto et al. tested 119 samples finding two groups of samples. One, clearly positive, with values of I/H between 12 and 3000, and other clearly negative ($I/H \leq 2$). Although our positive field samples also produced very high I/H values, they were negative by the TAS-ELISA-AP if the viral concentration were as low as the amount of coat protein produced by the transgenic plants.

With the TAS-ELISA-AP, there is great variability of readings (higher standard deviation) depending on the position of the sample in the plate (“border effect”) probably because it is more sensitive to the temperature gradient, since the AP reaction takes from 17 to 24 h. In contrast, the TAS-ELISA-HRP takes 30 min to show the results and it has no significant variability.

Using this method the presence of Psorosis in the NW citrus region was confirmed. Symptomatic orange trees with severe symptoms from both the Salta and Tucumán Provinces were found, and they were examined by four different methods: biological indexing in indicator plants, cross-protection, TAS-ELISA-HRP and RT-PCR. Some of the samples, showing bark-scaling and gummosis in the trunk, were negative by all methods, demonstrating their specificity for the *Citrus psorosis virus*, and showing that some Psorosis-like symptoms are caused by unknown agent, not CPsV. In the NE of Argentina, Psorosis is epidemic and field trees with bark-scaling on the trunk, are found frequently. Several reports suggested that this disease can be transmitted in the NE region by an unknown vector (Beñatena and Portillo, 1984; Danós, 1990). New reports have been published describing the presence of Psorosis in Texas, USA (Palle et al., 2004), which is the other region of the world where Psorosis seems to be spread naturally, but further studies are necessary to clarify this matter and to identify the natural vector. The results of this study confirmed that Psorosis is also present in the citrus region of Tucumán, although its incidence is less than in the NE region. The neighbor trees of positive samples (1, 4 and 7) also were analyzed producing negative results for CPsV indicating that so far, in those orchards the disease has not been tree-to-tree transmitted.

In conclusion, the TAS-ELISA-HRP has been shown to be more reliable, rapid and sensitive method than the TAS-ELISA-AP. Using this improved method, in the NW citrus region Psorosis has been confirmed in few trees in the orchards of the Tucumán Province although no natural spread seems to occur.

Acknowledgements

We thank Chet Roistacher for his observations in the field, Ing. G. Chiarrome for greenhouse work and Guillermo Docena for his helpful suggestions. M.L. Garcia and M.C. Zanek belong

to the staff of Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, O.G. is recipient of the research career award from CICBA, and MLG from CONICET. Lic. Zanek and Reyes are fellows of CONICET. This work was supported by grants BID802 OC-AR PICT 6198 SECyT-CONICET, and CICBA.

References

- Alioto, D., Gangemi, M., Deaglio, S., Sposato, S., Noris, E., Luisoni, E., Milne, R.G., 1999. Improved detection of citrus psorosis virus using polyclonal and monoclonal antibodies. *Plant Pathol.* 48, 735–741.
- Barthe, G.A., Ceccardi, T.L., Manjunath, K.L., Derrick, K.S., 1998. Citrus psorosis virus: nucleotide sequencing of the coat protein gene and detection by hybridisation and RT-PCR. *J. Gen. Virol.* 79, 1531–1537.
- Beñatena, H.N., Portillo, M.M., 1984. Natural spread of psorosis in sweet orange seedlings. In: Garnsey, S.M., Timmer, L.W., Doods, J.A. (Eds.), *Proceedings of the Ninth Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, IOCV, Riverside, CA, USA, pp. 159–164.
- Danós, E., 1990. La psorosis de los cítricos: la epidemia en curso en Argentina y el desafío de su control. In: *International Foundation for Science (IFS) e Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) (Eds.), Revista de Investigaciones Agropecuarias* 22, 265–277.
- Fawcett, G.L., 1938. La psorosis en los naranjos de Tucumán. *Rev. Ind. y Agric. de Tucumán* 27 (4–6), 101–103.
- Fawcett, G.L., 1939. Observaciones sobre algunas de las enfermedades presentes en los cítricos de Tucumán. *Est. Exp. Agric. Tuc., Circular* 77, 1–5.
- Feder citrus (Federación Argentina del citrus), 2005. La actividad cítrica argentina, *Argentine Citrus Industry*, pp. 1–12.
- Fernández Valiela, M.V., 1961. Citrus virus diseases in Argentina. In: *Proceedings of the Second Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, IOCV, Univ. Fla. Press, Gainesville, USA, pp. 231–237.
- Foguet, J.L., 1966. Enfermedades de los cítricos reconocidas en Tucumán. *Est. Exp. Agric. Tuc., Bol. Informativo* 2, 24–28.
- García, M.L., Sánchez de la Torre, M.E., Dal Bo, E., Djelouah, K., Rouag, N., Luisoni, E., Milne, R.G., Grau, O., 1997. Detection of citrus psorosis-ringspot virus using RT-PCR and DAS-ELISA. *Plant Pathol.* 46, 830–836.
- Gottwald, T.R., Palle, S.R., Miao, H., Seyran, M., Skaria, M., da Graça, J.V., 2004. Assessment of the possibility of natural spread of Citrus Psorosis disease. In: *Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, 2004, Abstract, IOCV Conference, Mexico.
- Larocca, L.H., 1985. La citricultura en la provincia de Entre Ríos. In: *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) (Eds.), Actas de la XVI, Jornadas Técnicas de Citricultura*, pp. 42–51.
- Legarreta, G.G., García, M.L., Costa, N., Grau, O., 2000. A highly sensitive heminested RT-PCR assay for the detection of citrus psorosis virus targeted to a conserved region of the genome. *J. Virol. Methods* 84, 15–22.
- Martín, S., Alioto, D., Milne, R.G., Garnsey, S.M., García, M.L., Grau, O., Guerri, J., Moreno, P., 2004. Detection of citrus psorosis virus by ELISA, molecular hybridisation, RT-PCR and immunosorbent electron microscopy and its association with citrus psorosis disease. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 747–757.
- Martín, S., Alioto, D., Milne, R.G., Guerri, J., Moreno, P., 2002. Detection of citrus psorosis virus in field trees by direct tissue blot immunoassay in comparison with ELISA, symptomatology, biological indexing and cross-protection tests. *Plant Pathol.* 51, 134–141.
- Palle, S.R., Miao, H., Seyran, M., Louzada, E.S., da Graça, J.V., Skaria, M., 2004. Preliminary evidence for natural transmission of citrus psorosis virus by an ophioidium-like fungus. In: *Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, 2004, Abstract, IOCV Conference, Mexico.
- Pujol, A.R., Beñatena, H.N., 1965. Study of psorosis in Concordia, Argentina. In: *Proceedings of the Third Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, IOCV, Univ. Fla. Press, Gainesville, USA, pp. 170–174.
- Roistacher, C.N., 1991. Graft-Transmissible Diseases of Citrus. In: *Food, Agriculture Organization of the United Nations, FAO (Ed.), Handbook for Detection and Diagnosis*, Rome, Italy, pp. 115–126.

- Roistacher, C.N., 1993. Psorosis—a review. In: Moreno, P., da Graça, J.V., Timmer, L.W. (Eds.), Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside, CA, USA, pp. 139–154.
- Roistacher, C.N., Calavan, E.C., 1965. Cross protection studies with strains of concave gum and Psorosis virus. In: Proceedings of the 3rd Conference of the International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Univ. Fla. Press, Gainesville, USA, pp. 154–161.
- Sánchez de la Torre, M.E., Riva, O., Zandomeni, R., Grau, O., García, M.L., 1998. Molecular Plant Pathology, on-line: <http://www.bspp.org.uk/mppol/1998/1019sanchez>.
- Timmer, L.W., 1974. A necrotic strain of citrus ringspot virus and its relationship to citrus psorosis virus. *Phytopathology* 64, 389–394.
- Timmer, L.W., Beñatena, H.N., 1977. Comparison of psorosis and other viruses causing leaf flecking in citrus. In: Proceedings of the International Society of Citriculture, vol. 3, pp. 930–935.
- Timmer, L.W., Garnsey, S.M., 1980. Natural spread of citrus ringspot virus in Texas and its association with psorosis-like diseases in Florida and Texas. In: Calavan, E.C., Garnsey, S.M., Timmer, L.W. (Eds.), Proceedings of the Eighth Conference of the International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside, CA, USA, pp. 167–193.
- Zaneck, M.C., Reyes, C.A., Peña, E.J., Plata, M.I., Costa, N., Grau, O., García, M.L., 2005. Naranja Dulce Transgénico: búsqueda de resistencia al virus de la Psorosis de los cítricos mediada por proteína. In: International Congress of Biotechnology – REDBIO Argentina. Encuentro Trinacional REDBIO Argentina–Chile–Uruguay, pp. 303–304.

Genetic transformation of sweet orange with the coat protein gene of *Citrus psorosis virus* and evaluation of resistance against the virus

Zanek MC, Reyes CA, Cervera M, Peña EJ, Velázquez K, Costa N, Plata MI, Grau O, Peña L, García ML

Plant Cell Reports, enviado 12 de diciembre, 2006 (en revisión).

Genetic transformation of sweet orange with the coat protein gene of *Citrus psorosis* virus and evaluation of resistance against the virus

Maria Cecilia Zaneck, Carina Andrea Reyes, Magdalena Cervera, Eduardo José Peña, Karelia Velázquez, Norma Costa, Maria Inés Plata, Oscar Grau, Leandro Peña and María Laura Garcia.

M. C. Zaneck, C. A. Reyes, E. J. Peña, K. Velásquez O. Grau and M. L. García, Instituto de Bioquímica y Biología Molecular, Fac. Cs. Exactas, U.N.L.P., La Plata, Argentina;

M. I. Plata and N. Costa, EEA-INTA, Concordia, Argentina. E. J. Peña, ANPCyT, Argentina. O. Grau belongs to CIC-BA and M.L Garcia to the CONICET. M. Cervera and L. Peña, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Moncada, Valencia, España.

***Corresponding author:**

Maria Cecilia Zaneck
Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM), Facultad de Ciencias Exactas,
Calles 47 y 115
1900 La Plata
Argentina
mczaneck@biol.unlp.edu.ar
Te/Fax: 54-221-4259223

Abstract

Citrus Psorosis is a serious viral disease affecting citrus trees in many countries. Its causal agent is *Citrus psorosis virus* (CPsV), the type member of genus *Ophiovirus*. The virus is tripartite and its genome consists of three ssRNAs of negative polarity. *Citrus psorosis virus* infects most important citrus varieties, including oranges, mandarins and grapefruits, and has also been found in the rootstock *Poncirus trifoliata*. Certification programs have not been enough to control the disease in these countries, probably because Psorosis is spread by an unknown vector. Moreover, no sources of natural resistance have been found. Pathogen-derived resistance (PDR) has been applied to many viruses and plant systems, providing a usually efficient alternative to control viral diseases in their hosts. For this purpose, we have produced 21 independent lines of sweet orange expressing the coat protein gene of CPsV. Lines expressing different levels of mRNA and coat protein were challenged with the homologous CPsV 4 isolate, but none of them showed resistance or symptoms delay. Line 23 contains 3 copies of the transgene expressing non detectable mRNA and coat protein levels. Moreover, the ORF of the coat protein gene has been found cytosine-methylated in this line, suggesting post-transcriptional gene silencing of the transgene. Possible causes for the failure of this PDR strategy to provide resistance against CPsV are discussed.

Keywords

Citrus psorosis virus – PDR – Post-transcriptional gene silencing - citrus - transgenic trees

Abbreviations

CPsV, *Citrus psorosis virus*; CP, coat protein; TAS-ELISA, Triple sandwich immunoassay; PDR, Pathogen-derived resistance; CaMV, *Cauliflower mosaic virus*; AMV, *Alfalfa mosaic virus*; nos, nopaline synthase gene; OD, optical density; dot, days of transmission; IC, infected control; NIC, non-infected control; PTGS. Post-

transcriptional gene silencing; CTV, *Citrus tristeza virus*; GFLV, *Grapevine fan-leaf virus*; TSWV, *Tomato spotted wild virus*.

Introduction

Citrus Psorosis, first described by Swingle and Webber (1896), is a serious viral disease affecting citrus trees in many countries (Roistacher 1993). The distribution of the disease is well documented and confirmed in America, Africa and the Mediterranean basin. In Argentina, a certification program has not been enough to control the disease which is causing important losses (Danós 1990). It seems that the causal agent is spread probably by an unknown vector (Beñatena and Portillo, 1984). New reports have been published describing the presence of Psorosis in Texas, USA (Palle et al. 2004), which is another region of the world where Psorosis seems to be spread naturally.

The disease is long and the symptoms appear on 10-15 years old trees, when they are at their maximum fruit production stage. In the field, the characteristic symptoms in sweet orange, mandarin and grapefruit are bark-scaling in the trunk, and chlorotic flecks and spots in young leaves (Roistacher 1991, 1993). These foliar symptoms are also manifested in experimentally graft-inoculated sweet orange seedlings, which are commonly used as biological indicators for the indexing of Psorosis (Roistacher 1991). In this test, a shock reaction with shoot necrosis can be observed in the first flush, followed by chlorotic leaf flecking and spotting in successive flushes.

The causal agent of the disease is *Citrus psorosis virus* (CPsV), the type member of genus *Ophiovirus* (Garcia et al. 1994; Milne et al. 2003). The particles are circular naked nucleocapsids, 3 nm in diameter, adopting conformations of variable lengths (short and long particles). The virus is tripartite and its genome consists of three ssRNAs of negative polarity.

CPsV RNA 1 is the largest one and codifies for two ORFs. Downstream the 5'-UTR, the first ORF encodes a 24kDa polypeptide of unknown function (24K), and separated by an intergenic region, a second ORF codes for the putative RNA polymerase (280kDa) (Naum-Onganía et al. 2003). RNA 2 contains one ORF coding for a polypeptide of 54.7 kDa of unknown function (54K), and RNA 3 codes for the coat protein (CP) of 48.6 kDa (48K protein) (Sánchez de la Torre et al. 1998, 2002).

At present, CPsV diagnosis is performed by a triple sandwich immunoassay (TAS-ELISA) detecting the coat protein (Alioto et al. 1999, Zaneck et al. 2006) and by an optimised RT-PCR for viral RNA detection (Barthe et al. 1998, Legarreta et al. 2000). *Citrus psorosis virus* infects most *Citrus* varieties and has been also found in *Poncirus trifoliata* and Troyer and Carrizo citrange hybrids (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*), which are used as rootstocks in many citrus countries, including Argentina and Uruguay. There are no known sources of natural resistance or tolerance to the disease.

Pathogen-derived resistance (PDR) has been used as a means to control viral diseases through incorporation of viral-derived sequences into transgenic plants (Sanford & Johnston, 1985, Powell-Abel et al. 1986; Beachy et al. 1990; Baulcombe, 1996; Goldbach et al. 2003). With this objective, we have undertaken a project aimed at obtaining sweet orange transgenic plants expressing the coat protein (*cp*) gene of CPsV.

We have obtained 21 independent lines and 5 of them were challenged using the citrus Psorosis isolate from which the transgene was derived. Two different viral charges were assayed to challenge the transgenic plants, but so far, no resistance or tolerance has been found in any case after one year of observations. The transgenic lines express the *cp* gene at low but variable amounts, and no correlation was found between copy number and transgene expression. In order to assess the causes of the low expression of the *cp* gene, transgene

methylation was studied in two lines. Possible causes for the failed protection against the CPsV are discussed in this paper.

Materials and methods

Virus isolates, plasmid constructs and bacterial strain

In this work, isolate CPV-4 was used. It is probably of Texan origin (Garnsey et al., 1976) but is considered from Florida (USA), where it was isolated (Garnsey and Timmer 1980).

The full-length ORF of *cp* gene from CPV-4 isolate was amplified by RT-PCR using the CPV3 (5' CCTAACGCTAGCATGTGCGATTCCTATTAAAG 3') and the CPV4 (5' GACGAATTCTTAAAAGCATAACATGCAAGC 3') primers (Barthe et al. 1998) and it was cloned in the pGEM-T vector. The resultant plasmid was digested with *NheI* and *EcoRI* to obtain the ORF of *cp* gene. The protruding end thus formed was filled and inserted between the *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S promoter, with double enhancer plus *Alfalfa mosaic virus* (AMV) RNA 4 leader sequence and the nopaline synthase gene (*nos*) terminator sequence of plasmid pMOG180 (Mogen International). Correct cloning and insert orientation were confirmed by sequencing. The resulting expression cassette was then subcloned into the binary vector p35SGUSINT (Vancanneyt et al. 1990) at the *EcoRI* site, generating p35SGUSINT/CP (see figure 1A). This plasmid was transferred to *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA 105 by electroporation.

Transformation and regeneration

Internodal stem segments from 6 to 12 month-old greenhouse-grown Pineapple sweet orange (*Citrus sinensis*) seedlings, were transformed by cocultivation with *A. tumefaciens* EHA 105

carrying the binary vector 35SGUSINT/CP. Selection of transformants was performed in a culture medium containing kanamycin (100 ug/ml) (Peña et al. 1995).

The basal part of the shoots regenerated from the stem segments was assayed for *uidA* gene expression (GUS) by overnight incubation in a 2mM X-Gluc solution at room temperature (Cervera et al. 2005). When the reaction was positive, shoot tips were grafted *in vitro* on decapitated and etiolated seedlings of Troyer citrange as previously described (Peña et al. 1995). After 3-4 weeks, scions had developed several leaves and then they were screened for the presence of the *cp* transgene by PCR. Positive transgenic plantlets were then side-grafted on vigorous 6-month-old seedlings of Rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush) and grown in a greenhouse maintained at 24-26 °C, with a 18 h day length provided by a mix of natural and supplemental light.

Presence of the *cp* and *uidA* genes in the GUS positive transgenic lines was performed by PCR using the CPV1 (5'-GCTTCCTGGAAAAGCTGATG-3') and the CPV2 (5'-TCTGTTTTTGTC AACACACTC-3') primers designed from the *cp* gene (Barthe et al. 1998) and GUS1 (5'-GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG-3') and GUS2 (5'-TGGATCCCGGCATAGTTAAA-3') from the *uidA* gene (Peña et al. 1995).

Southern and Northern blot analyses

Southern blot assays were performed to analyse the integrity of the *cp* expression cassette, to estimate the number of copies of the *cp* gene in the transgenic plant genome and to analyse the possibility of transgene methylation.

In order to analyse the integrity and the number of copies of the *cp* transgene, DNA was extracted from 0.75g of leaves according to Futterer et al. (1995), and aliquots of 20 µg were digested with *EcoRI*, which releases the *cp* expression cassette, or with *HindIII* cutting outside this cassette. The digestion products were fractionated in 0.8%-TAE agarose gel, and

then blotted onto positive charged nylon membranes (ROCHE) by capillarity using 20 x SSC buffer. After fixation through baking at 120°C, membranes were hybridised with a digoxigenin-labelled fragment of the *cp* gene (CPV1-CPV2) prepared by PCR according to the manufacturer's instructions (ROCHE applied Science) or probed with a [α -³²P-CTP]-labelled fragment from the *cp* gene (CPV1-CPV2).

For the analysis of transgene methylation, 20 µg of total DNA extracted from 0.75g of leaves from lines 23, 96 and non-transformed controls were digested with the restriction enzyme *EcoRI* and the methylation-sensitive restriction enzyme *DdeI*. After digestion, DNA fragments were fractionated in 1.5%-TAE agarose gel, and then blotted onto positive charged nylon membranes (ROCHE). Membranes were hybridised with two digoxigenin-labelled fragments of the *cp* gene, prepared by PCR using the CPV1-CPV2 primers and C2 (5'-TATTGAGCTCAGCATCTGGG-3') and 48Kdir (5'-TAAGCTCGAGCAATGTCGATTCC-3') primers (see Figure 4). Hybridisation with the digoxigenin-labelled probe was performed in 5 x SSC, 2% Blocking Reagent (ROCHE), 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.2% SDS and 50 mM Sodium Phosphate (pH7) overnight at 65°C. After 3 washing steps in 2 x SSC, 0.2 x SSC and 0.1 x SSC plus 0.1% SDS at 65°C, the detection was done by a chemiluminescent substrate according to the manufacturer's instructions (ROCHE applied Science) and exposed for 18 hours to X-ray film. Hybridisation with the [α -³²P-CTP]-labelled probe was performed in 5 x SSC, 5 x Denhardt, 0.2% SDS and 500µg/ml denatured herring sperm DNA (Invitrogen) overnight at 65°C. After 3 washing steps in 2 x SSC, 1 x SSC and 0.1 x SSC plus 0.1% SDS at 65°C, membranes were exposed for 30 days to X-ray film.

For Northern blot analysis, 40 µg of total RNA extracted from 1g of citrus leaves was isolated according to Bekesiova et al. (1999). The same procedures were applied in parallel to non-transgenic infected and uninfected plants used as controls. The samples were incubated for 5 minutes at 95°C in a mixture containing formamide and formaldehyde and then fractionated by

electrophoresis in 1 % agarose-formaldehyde denaturing gel in MOPS buffer. Nucleic acids were transferred to a positive charged nylon membrane (ROCHE) by capillarity using 20 x SSC buffer. After fixation through UV exposure, membranes were probed with a [α - 32 P-CTP]-labelled fragment from the *cp* gene by PCR with CPV1 and CPV2 primers. Hybridisation was performed in 5 x SSC, 2 x Denhardt, 0.1% SDS, 300 μ g/ml denatured herring sperm DNA (Invitrogen) and 3 mg/ml denatured yeast tRNA (SIGMA) overnight at 65°C. After 3 washing steps in 2 x SSC, 0.2 x SSC and 0.1 x SSC plus 0.1% SDS at 65°C, membranes were exposed for 30 days to X-ray film.

Accumulation of the coat protein in the transgenic lines

In order to determine the level of accumulation of the transgene-derived coat protein, triple sandwich immunoassay (TAS-ELISA-HRP) was performed as previously described by Zaneck et al. (2006). Briefly, total protein was extracted from 200mg of leaves tissue by grinding with liquid nitrogen, using PBS-Tween, 2 % w/v polyvinyl pyrrolidone (PVP-40000), and 2.5 % w/v of defatted milk powder. Plate coating, antibody incubations and washing conditions were performed as previously described, using 1/2500 dilution of polyclonal antiserum A376 (kindly provided by Pedro Moreno, IVIA, Spain) and Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Horseradish Peroxidase (PIERCE). The substrate was incubated for 30 min at room temperature and the reaction stopped with 0.7 M SO_4H_2 . Optical density (OD) at 492 nm was measured in a Titertek Multisca.

Samples were taken from six to seven times during four months and the data were subjected to statistical analysis using StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), version 6, was applied in order to find significant differences among the accumulation of CP in transgenic plants.

Propagation and graft-inoculation

In a first assay, buds from transgenic lines 21, 34, 28 and 96 were propagated by grafting onto 6-8 months old Rough lemon seedlings. After 10 months, 3-4 of 6 replicates were graft-inoculated on the scion with two pieces of infected tissue carrying the CPV-4 isolate, homologous to the *cp* transgene. The inoculum source remained in the plants along the challenge period.

The plants were maintained in a greenhouse set at 22-24 °C and light-controlled. They were observed for development of symptoms (rings, spots and flecking) in 4 successive flushes throughout 4 months. After each observation, leaf tissues were collected and analyzed by RT-PCR and TAS-ELISA as described later. Controls for these experiments were a non-infected non-transformed (NIC), an infected non-transformed (IC), and a regenerated non-transformed plant (3-control).

In order to test a viral charge lower than that used in the first assay, the number of chip pieces and the time needed to transmit the virus were assayed. For this purpose, 10 sweet orange seedlings were graft-inoculated with one piece of infected tissue carrying the CPV-4 isolate. After 10 days the chip was removed from 4 plants, and in 4 other plants the chip was kept for 6 days more (16 days post grafting) and then removed. In the other 2 plants, considered as positive controls, the chip was kept. After 25 days post inoculation, new flushes from all plants were observed for symptom development (chlorotic flecks, rings and spots). To confirm the presence of the virus, RT-PCR using CPV1 and CPV2 primers for detection of the *cp* gene (RNA 3) was applied on total RNA extracted from foliar tissue.

In a second assay, buds from transgenic lines 28, 96 and 23 were propagated by grafting onto 6-8 months Rough lemon seedlings. After 10 months, 6 of 8 replicates were graft-inoculated on the scion with one piece of infected tissue carrying the CPV-4 isolate and 16 days later the

piece was removed. The plants, maintained in the greenhouse, were individually analyzed for symptom development in 4 successive flushes throughout 6 months.

Virus detection

In order to test the progress of the CPsV infection in the challenged plants TAS-ELISA and RT-PCR were applied. TAS-ELISA was used to detect the expression raise of the CP in the infected plant as described above. For diagnosis, a sample is considered positive for CPsV when its OD is ≥ 3 times the healthy control (Alioto et al. 1999). For the RT-PCR, three primers designed from CPsV RNA 2 were used. For amplification, two forward primers, Pr A (5' TAGATCCATGCTCAGTCACC 3') and Pr 25 (5' AGGGGCACAATGCTTTGACC 3') were used, being Pr B (5' TTGACAATGATGGACACTGG 3') the reverse primer. Total RNA was extracted from 100 mg of fresh tissue with TRIZOL (Life Technologies), following the manufacturer's instructions. RNA samples were resuspended in 50 μ l of RNase-free water. One-step RT-PCR was conducted in a 15 μ l reaction mixture containing 1mM dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, 50mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0 (at room temperature) 0.1% triton X-100, 1 μ M of each primer, 16 units RNAsin® Ribonuclease Inhibitor (Promega), 12 units SuperScript™III Reverse Transcriptase (Gibco BRL) and 1 units of *Taq* DNA polymerase (Promega). The thermocycling conditions included 30 min at 48°C for RT, 4 min at 94°C for inactivation of reverse transcriptase and initial denaturation, 36 cycles of 10'' at 94°C, 10'' at 50°C and 50'' at 72°C and a final elongation step of 4 min at 72°C in Perkin-Elmer 2400 equipment. PCR products were analysed by electrophoresis on 2%-TAE agarose gel stained with ethidium bromide.

Results

Production of transgenic Sweet orange plants and their analysis.

Twenty-one independent transgenic plants carrying the *cp* gene were obtained by *A. tumefaciens*-mediated transformation with the plasmid p35SGUSINT/CP. After performing GUS assays from small pieces of kanamycin-resistant regenerated shoots, positive scions were grafted in vitro on decapitated seedlings and were tested by PCR in order to confirm the presence of the *cp* gene. Transformation efficiency (transgenic lines per inoculated explant) varied from 3.3 to 4.5 %.

Figures 1B and 1C show the integrity of the transgene and the number of copies inserted in each of nine transgenic lines, respectively, as corroborated by Southern blot. Most transformed plants had integrated one transgene copy (lines 1, 18, 20, 21, 28, 29 and 34). Lines 96 and 23 contained 2 and 3 copies, respectively.

Lines 18, 20, 21, 29, 34 and 96 presented higher transgene expression than lines 1, 23 and 28 in several northern blots. As examples, results from two Northern blots revealing different levels of *cp* expression are shown in figure 1D.

There was no correlation between transgene copy number and expression of the *cp* mRNA in these nine lines. The seven lines with one copy showed different levels of mRNA. For example, lines 34 and 96 containing one and two copies of the transgene, respectively, expressed a similar amount of *cp* mRNA. In line 23, *cp* mRNA detection was difficult, and in fact, only one of three Northern blots showed a faint band (Figure 1D).

Coat protein could not be detected by Western blot in any of the lines using the available antisera. However, TAS-ELISA-HRP, which is the most sensitive ELISA, was able to detect CP quantitatively. Figure 2 shows the optical density (OD), and the statistical values obtained in the 9 lines and a non-transgenic plant used as control. In general, most lines accumulated low amounts of CP, but significant differences were observed in lines 18, 20, 21, 28, 29, 34

($P < 0.01$), and line 1 ($P < 0.05$) compared with the non-transgenic control. All transgenic plants displayed normal growth and development, comparable to that shown by non-transgenic controls.

Challenge of transgenic lines with CPV 4 isolate.

To investigate the response of the transgenic plants against viral infection, lines 21, 23, 28, 34, and 96 were challenged with CPV-4 by graft-inoculation. In these experiments, the infected non-transgenic plants and infected 3-control were considered as the same control, since both showed the characteristic symptoms of Psorosis disease.

In a first experiment, 4 replicates of lines 21, 28, 34 and 96 were tested. Lines 21 and 34 manifested characteristic foliar symptoms throughout the 4 flushes investigated. Some replicates of lines 28 and 96 died or grew slowly, delaying the test with respect to the other clones, and for that reason were analyzed again in a second experiment. Virus multiplication, tested by TAS-ELISA in the new flushes, gave generally high values of OD, comparable to those of infected-controls. RT-PCR, applied to detect the viral RNA 2, correlated with TAS-ELISA results and symptom observations, confirming virus accumulation in the four lines throughout 4 months of observation (data not shown).

Results of this experiment might indicate that the 2 chips of infected tissue used for grafting-inoculation carried an excessive viral charge. For this reason, a less aggressive challenge assay was tested in non-transgenic sweet orange plants. One CPV 4-infected bark-chip was grafted and removed either 10 or 16 days after transmission (dot). Twenty-five days post inoculation, 3 out of 4 inoculated plants (10 dot) and 4 out of 4 plants (16 dot) developed symptoms of Psorosis disease. The presence of virus in the symptomatic plants was confirmed by RT-PCR using the *cp* primers. Therefore, the second challenge was performed grafting one chip for 16 dot. Lines 28, 96 and 23, containing 1, 2 and 3 copies of the *cp* gene, respectively,

developed characteristic symptoms of the Psorosis disease (rings, spot and flecking) throughout one year and no differences were noticed among lines or among replicates of the same line (data not shown). These plants were analyzed individually by TAS-ELISA in three successive flushes after inoculation (4 months). As shown in Figure 3A-D, the three lines gave OD values several times higher than those of the non-infected transgenic plants. In the first flush, the presence of the virus was determined by RT-PCR using the RNA 2 primers which confirmed the TAS-ELISA results. Figure 3E shows the OD values of the transgenic lines, which were similar to those of infected non-transgenic controls (IC), and increased through the time. Moreover, there was no recovery from symptoms several months later, indicating that plants were still infected.

Analysis of transgene methylation

Since lines 23 and 96 had 3 and 2 copies of the transgene, respectively, they showed a very low level of CP and mRNA and the challenge assay failed to obtain resistance to the virus, it was suspected that the transgene could be silenced in these lines. For that reason, methylation of the transgene in lines 23 and 96 was analyzed. Figure 4 shows the result of the Southern blot from total DNA digested with *EcoRI* to excise the cassette, and with *DdeI*, which is cytosine methylation-sensitive. Line 96 presented the same digestion bands as the binary plasmid p35SGUSINT/CP, suggesting the transgene was not methylated in this case. On the other hand, the pattern obtained in line 23 presented a band of about 2400 nt corresponding to the fragment digested by *EcoRI* and not by the *DdeI*, indicating methylation in the ORF region. Another faint band of about 2000 nt could be the product of partial methylation in the promoter.

Discussion

Psorosis is an important disease that has affected the economy of the citrus region in Argentina and Uruguay for a long time, and has also recently been reported in Texas (Palle et al. 2004). The causal agent is a tripartite virus of negative-stranded RNA, the type member of *Ophiovirus* genus, which is one of the few genus of negative viruses infecting plants. No natural resistance has been detected in citrus and citrus relatives used as rootstocks. We have attempted the PDR strategy through genetic transformation of sweet orange with the complete ORF of the coat protein of CPsV in order to get resistance to the virus.

Twenty-one transgenic lines containing the coat protein gene of *Citrus psorosis virus* (CPV-4 isolate) were obtained and nine were evaluated. The integrity of the transgene and mRNA expression were analyzed showing that the transgene was integrated and expressed in the plant genome as expected.

Transgenic lines grew normally and were morphologically indistinguishable from non-transgenic Pineapple sweet orange controls. This result is an indication the coat protein *per se* is not enough to develop the Psorosis symptoms as described for transgenic citrus lines expressing the p23 protein of *Citrus tristeza virus* (CTV) involved in the pathogenesis in its natural host (Ghorbel et al. 2001). It was also reported that in some cases the CP expressed from the transgene was able to help the virus accumulation or its interaction with the plant (Kouassi et al., 2006). In our case, in the first flush after inoculation, none of the lines showed more symptoms than those produced by the non-transgenic infected plants, indicating there was no enhanced susceptibility.

To detect the coat protein expressed in transgenic citrus plants, we used the improved ELISA (TAS-ELISA-HRP) which detects the virus in infected field trees with the same sensitivity as that of the RT-PCR (Zanek et al. 2006). Applying this method, some variability in the

expression of the transgene in the first 5 months of growth was observed, but it could be due to the sympodial growth pattern of citrus, and the physiological conditions of the plants. According to statistical analysis, all lines were low but positive expressers of the CP, except lines 23 and 96. The variable or non-detectable expression of the transgene has been also observed in transgenic citrus plants expressing the p25 of CTV (Domínguez et al. 2000) and in other woody transgenic plants like grapevines, where some lines transformed with the *cp* gene of the *Grapevine fan-leaf virus* (GFLV), showed non-detectable level of the protein by DAS-ELISA (Gambino et al. 2005, Maghuly et al. 2005).

Accumulation of the CPsV coat protein expressed in the transgenic citrus plants could not be determined by Western blot since the sensitivity of this technique with the available antisera were not enough to detect low CP levels. However, CP transient expression by agroinfiltration in *Nicotiana benthamiana* plants resulted in higher levels of CP accumulation than in stably transformed citrus plants. In *N. benthamiana* plants it was shown by western blot that the CP was expressed at the expected size, and no other products of lower molecular weight were detected (data not shown). This is an indication the whole protein might be stably accumulated in plants, and that its detection by TAS-ELISA did not reveal truncated proteins. Since the accumulation level of the CP is very low in all transgenic lines compared with infected plants, we used TAS-ELISA-HRP to follow the progress of the infection in the challenge experiments. The OD values of the infected transgenic plants increased through out the experiment to a level much higher than that expressed from the transgene. Moreover, the virus was detected by RT-PCR using primers designed for the RNA2, to confirm these results. Lines 21 and 34 were considered high expressers while lines 28 and 96 were low expressers and for that reason they were chosen in a first challenge experiment. Line 23 contained 3 copies of the transgene, expression of its mRNA was almost not detectable, and coat protein accumulation was negative, suggesting PTGS of the *cp* transgene. This made it a good

candidate to be challenged, since there has usually been a correlation between PTGS of the transgene and virus resistance in many transgenic plant-virus combinations (Kalantidis et al. 2002, Scorza et al. 2001, Fagoaga et al. 2006). Lines 28 and 96 contained different number of copies of the transgene, and for this reason, they were included in the second experiment. Before performing the second challenge the number of bark-chips and the time of contact with the plant were reconsidered because viral inoculum pressure used in the first challenge experiments was much higher than that transmitted in the field. Probably transmitted by a vector (Beñatena and Portillo, 1984; Palle et al. 2004), the virus could take years to multiply in a tree and to manifest symptoms. Furthermore, some former experiments indicated that the transmission of Psorosis agent could occur in a few days (Pedro Moreno and L. W. Timmer, personal communication). These observations suggested that in the greenhouse, the viral inoculum could be diminished in addition to the time of transmission. The viral charge assay revealed that one bark-chip in 16 days was enough to transmit the virus, and to insure 100% infection. However, we think that the viral inoculum dose was still high, since plants showed symptoms at the same time and with the same severity as controls in which the bark-chip was not taken out.

None of the evaluated lines were resistant to CPsV or showed any delay in the symptoms expression. Moreover, we have not found any significant differences in the response against the virus challenge among the lines or among the replicates as reported in transgenic citrus expressing the coat protein of CTV (Domínguez et al. 2002). In the CP-mediated PDR strategy, resistance might be provided either by transgene-derived CP over-accumulation or by PTGS induction triggered by transgene expression. If the mechanism of protection were protein mediated, the protein accumulation in the transgenic lines could not be enough to prevent viral infection in the conditions assayed (high viral charge and small plants challenged). If we propose a PTGS mechanism to protect the plants, line 23 could be a good

candidate since it contains 3 copies of the transgene, expresses a low level of mRNA and null CP, and the ORF is cytosine-methylated. In preliminary experiments, we have not detected small RNAs derived from the transgene by Northern blot analysis, which are the hallmarks of PTGS (data not shown). However, this result has to be confirmed.

PDR has been shown to be the way to control virus infection in some plant-virus systems. Nevertheless, most of the PDR has been reported for viruses of positive genome RNA, and applied to transgenic herbaceous hosts. Transformation of citrus and other woody plants like grapevines and plums has been performed with positive-stranded virus genes, such as CTV (Domínguez et al. 2002; Fagoaga et al. 2006), GFLV (Gambino et al. 2005, Maghuly et al. 2005) and *Plum pox virus* (Ravelonandro et al. 1997; Hily et al. 2004), respectively. There are few reports of transformation with genes of negative genome viruses like *Tomato spotted wild virus*, TSWV (Levin et al. 2005; Pang et al. 1992; Prins et al. 1995) and none on negative viruses in transgenic woody plants.

Several factors could contribute to the lack of protection observed in the transgenic lines evaluated here: i) the high dose of virus delivered to plants by graft-inoculation could overcome the potential protection afforded by constitutive expression of the *cp* gene in transgenic cells, ii) the variable level of transgene expression during sympodial growth and development of transgenic plants could affect the PDR mechanism, and/or iii) the CPsV genome could encode protein/s breaking putative PTGS at least in line 23. In spite of the results shown in this paper, more than 15 transgenic sweet orange lines remain untested, and it could be the case that more transgenic lines need to be evaluated for either efficient CP accumulation or PTGS induction to attempt protection against CPsV in its natural woody host.

References

- Alioto D, Gangemi M, Deaglio S, Sposato S, Noris E, Luisoni E, Milne RG (1999) Improved detection of citrus psorosis virus using polyclonal and monoclonal antibodies. *Plant Pathol* 48: 735-741. DOI 10.1046/j.1365-3059.1999.00410.x
- Barthe GA, Ceccardi TL, Manjunath KL, Derrick KS (1998) Citrus psorosis virus: Nucleotide sequencing of the coat protein gene and detection by hybridisation and RT-PCR. *J Gen Virol* 79:1531-1537.
- Baulcombe DC (1996) Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* 8:1833–1844. DOI 10.1105/tpc.8.10.1833.
- Beachy RN, Loesch-Fries S, Tumer NE (1990) Coat protein-mediated resistance against virus infection. *Annu Rev Phytopathol* 28:451–474.
- Bekesiova I, Nap J-P, Mlynarova L (1999) Isolation of high Quality DNA and RNA from leaves of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia*. *Plant Mol Biol Rep* 17:269-277.
- Beñatena HN, Portillo MM (1984) Natural spread of psorosis in sweet orange seedlings. In: Garnsey SM, Timmer LW and Dodds JA (eds) Proceedings of the 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, IOCV. Riverside, CA, pp 159-164.
- Cervera M (2005) Histochemical and fluorometric assays for *uidA* (GUS) gene detection. *Methods Mol Biol* 286:203-214.
- Danós E (1990) La psorosis de los cítricos: la epidemia en curso en Argentina y el desafío de su control. In: International Foundation for Science (IFS) e Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) (eds), *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 22, pp 265-277.

Domínguez A, Guerri J, Cambra M, Navarro L, Moreno P, Peña L. (2000) Efficient production of citrus transgenic plants expressing the coat protein gene of *Citrus Tristeza Virus*. *Plant Cell Rep.* 19: 427-433. DOI 10.1007/s002990050751

Domínguez A, Hermoso de Mendoza A, Guerri J, Cambra M, Navarro L, Moreno P, Peña L (2002) Pathogen-derived resistance to *Citrus tristeza virus* (CTV) in transgenic Mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) plants expressing its *p25* coat protein gene. *Mol. Breed.* 10: 1-10. DOI 10.1023/A:1020347415333

Futterer J, Gisel A, Iglesias V, Kloti A, Kost B, Mittelsten Sced O, Neuhaus-Url G, Schrott M, Shillito R, Spangenberg G, Wang ZY (1995) Standard molecular techniques for analysis of transgenic plants. In: Potrykus I, Spangenberg G (eds) *Gene transfer to plants*, Springer Lab manual, 25, pp 215.

Gambino G, Gribaudo I, Stephan L, Scharti A, Laimer M (2005) Molecular characterization of grapevine plants transformed with GFLV resistance genes. *Plant Cell Rep* 24:665-662. DOI 10.1007/s00299-005-0006-4.

García ML, Dal Bo E, Grau O, Milne R (1994) The closely related citrus ringspot and citrus psorosis viruses have particles of novel filamentous morphology. *J Gen Virol* 75:3585-3590.

Garnsey SM, Youtsey CO, Bridges GD, Burnett HC (1976) A necrotic ringspot-like virus found in a "Star Ruby" grapefruit tree imported without authorization from Texas. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 89, pp 63-67.

Garnsey SM, Timmer LW (1980) Mechanical transmissibility of citrus ringspot virus isolates from Florida, Texas, and California. In: Calavan EC, Garnsey SM, Timmer LW (eds) *Proceedings of the Eighth Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. IOCV. Riverside, CA, USA, pp 174-179.

Ghorbel R, Lopez C, Fagoaga C, Moreno P, Navarro L, Flores R, Peña L (2001) Transgenic citrus plants expressing the citrus tristeza virus p23 protein exhibit viral-like symptoms. *Molecular Plant Pathology* 2: 27-36.

Goldbach R, Bucher, Prins M (2003) Resistance mechanisms to plant viruses: an overview. *Virus Res* 92(2): 207-212. DOI 10.1016/S0168-1702(02)00353-2

Hily JH, Scorza R, Malinowski T, Zawadzka B, Ravelonandro M (2004) Stability of gene silencing-based resistance to Plum pox virus in transgenic plum (*Prunus domestica* L.) under field conditions. *Transgenic Res* 13(5):427-436. DOI 10.1007/s11248-004-8702-3

Kalantidis K, Psaradakis S, Tabler M, Tsagris M (2002) The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus. *Mol Plant Microbe Interact* 15:826-833.

Kouassi NK, Chen L, Siré C, Bangratz-Reyser M, Beachy RN, Fauquet CM, Brugidou C (2006) Expression of rice yellow mottle virus coat protein enhances virus infection in transgenic plants. *Arch Virol* 151: 2111-2122. DOI 10.1007/s00705-006-0802-3

Legarreta GG, García ML, Costa N, Grau O (2000) A highly sensitive heminested RT-PCR assay for the detection of citrus psorosis virus targeted to a conserved region of the genome. *J Virol Methods* 84:15-22. DOI 10.1016/S0166-0934(99)00123-8

Levin JS, Thompson WF, Csinos AS, Stephenson MG, Weissinger AK (2005) Matrix attachment regions increase the efficiency and stability of RNA-mediated resistance to Tomato Spotted Wilt Virus in transgenic tobacco. *Transgenic Res* 14:193-206. DOI 10.1007/s11248-004-5413-8

Maghuly F, Stephan L, da Câmara Machado A, Borroto Fernandez E, Mahmood AK, Gambino G, Gribaudo I, Scharti A, Laimer M (2005) Molecular characterization of grapevine plants transformed with GFLV resistance genes: II. *Plant Cell Rep* 25 (6): 546-553. DOI 10.1007/s00299-005-0087-0

Milne RG, Garcia ML, Moreno P (2003) Citrus Psorosis virus. Association of Applied Biologists (AAB) Descriptions of Plant Viruses. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=401>

Palle SR, Miao H, Seyran M, Louzada ES, da Graça JV, Skaria M (2004) Preliminary Evidence for Natural Transmission of Citrus psorosis virus by an Olpidium-Like Fungus. In: 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Abstract Conference, Mexico.

Pang SZ., Nagpala P, Wang M, Slightom JL, Gonsalves D (1992) Resistance to heterologous isolates of tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco expressing its nucleocapsid protein gene. *Phytopathology* 82:1223-1229.

Peña L, Cervera M, Juárez J, Navarro A, Pina JA, Durán-Vila N, Navarro L (1995) *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plant. *Plant Cell Rep* 14:616-619. DOI 10.1007/BF00232724

Powell-Abel P, Nelson RS, De B, Hoffmann N, Rogers SG, Fraley RT, Beachy RN (1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232:738-743. DOI 10.1126/science.3457472.

Prins M, de Haan P, Luyten R, van Veller M, van Grinsven MQ, Goldbach R (1995) Broad resistance to tospoviruses in transgenic tobacco plants expressing three tospoviral nucleoprotein gene sequences. *Mol Plant Microbe Interact* 8(1):85-91.

Roistacher CN (1991) Graft-Transmissible Diseases of Citrus. In: Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO (ed.). Handbook for detection and diagnosis, Rome, Italy, pp 115-126.

Roistacher CN (1993) Psorosis-A review. In: Moreno P, da Graça JV, Timmer LW (eds) Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside, C.A., USA, pp. 139-154.

Sánchez de la Torre ME, Riva O, Zandomeni R, Grau O, García ML (1998) *Mol Plant Pathol On-line*, <http://www.bspp.org.uk/mppol/1998/1019sanchez>.

Sánchez de la Torre ME, López C, Grau O, García ML (2002) RNA2 of Citrus psorosis virus is of negative polarity and has a single open reading frame in its complementary strand. *J Gen Virol* 83: 1777-1781.

Sanford JC, Johnston SA (1985) The concept of parasite-derived resistance – deriving resistance genes from the parasite's own genome. *J Theor Biol* 113:395-405.

Scorza R, Callahan A, Levy L, Damsteegt V, Webb K, Revelonandro M (2001). Post-transcriptional gene silencing in plum pox virus resistant transgenic European plum containing the plum potyvirus coat protein gene. *Transgenic Res* 10:201-209. DOI 10.1023/A:1016644823203

Swingle WT, Webber HJ (1896) The principal diseases of citrus fruits in Florida. United States Department of Agriculture, Division of Vegetable Physiology and Pathology, Bulletin 8.

Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Sanchez L, Willmitzer L, Rocha-Sosa M (1990) Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol Gen Genet* 220:245-250.

Zanek MC, Peña EJ, Reyes CA, Figueroa J, Stein B, Grau O, García ML (2006) Detection of Citrus Psorosis Virus in the northwestern citrus production area of Argentina by using an improved TAS-ELISA. *J Virol Methods* 137: 245-251. DOI:10.1016/j.jviromet.2006.06.021

Acknowledgements

We thank Ing. G. Chiarrone and Pto. Agr. Fabián Ramos for greenhouse work. M. L. García, Eduardo J. Peña, Carina A. Reyes and M. C. Zanek. belong to the staff of Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, O.G. is recipient of the research career award from CICBA, and MLG from CONICET. Lic. Zanek and Reyes are fellows of CONICET. This work was supported by grants BID802 OC-AR PICT 6198 SECyT-CONICET, AECL, CICBA and INTA EEA Concordia.

Legends

Figure 1

Panel A: Schematic representation of the T-DNA from the binary plasmid p35SGUSINT/CP engineered to express the coat protein gene (2440 pb) from the CPsV strain CPV-4 in transgenic sweet orange plants. The gene is controlled by the CaMV 35S promoter (35SP) containing a duplicated enhancer region, the Alfalfa mosaic virus RNA4 leader sequence (AIMV-RNA4-leader) and the *nos* terminator (*nosT*). The *cp* coding region (ORF-*cp*) is flanked by the *nptII* gene between the *nos* promoter (*nosP*) and the *nosT*, and by the *uidA* gene (GUS) between the 35SP and the *nosT*. Transcription orientation of each gene is indicated by arrows, and *EcoRI* and *HindIII* restriction sites by vertical lines. The relative size of the CP probe and the expected hybridization products are indicated. RB, right border, LB, left border.

Panel B: Southern blot analysis of total DNA extracted from the transgenic lines (1, 18, 20, 21, 23, 28, 29, 34 and 96) digested with *EcoRI*, which release the complete *cp* gene.

Panel C: Southern blot analysis of total DNA extracted from the same transgenic lines digested with *HindIII* which shows the copy number of the transgene integrated.

The nylon membranes were probed with a digoxigenin-labeled fragment of the *cp* coding region (CPV1-CPV2 probe).

Panel D: Northern blot analysis of total RNA extracted from the transgenic lines (1, 18, 20, 21, 23, 28, 29, 34 and 96) and probed with ³²P-labeled DNA fragment of the *cp* gene (CPV1-CPV2 probe).

Panel E: Total RNA extracted from the transgenic plants stained with ethidium bromide after gel electrophoresis showing equivalent RNA loads.

Figure 2. TAS-ELISA-HRP for the detection of CPsV coat protein in transgenic citrus plants. The OD values refer to mean optical densities for six to seven independent experiments. Small black boxes indicate the mean, the empty boxes the mean \pm SE and the bars the mean \pm SD.

The OD values differences were analyzed according to the *Fisher LSD* test:

^a represent a statistically significant difference in OD value mean compared with non-transgenic line (healthy) at $P < 0.01$

^b represent a statistically significant difference in OD value mean compared with non-transgenic line (healthy) at $P < 0.05$

Figure 3. Evaluation of transgenic lines challenged with CPsV.

Panels A-D: Analysis of virus accumulation of six replicates (1-6) of lines 96 (96CP), 23 (23CP), 28 (28CP) and 3-control (3-C) by TAS-ELISA-HRP. The OD values refer to mean optical densities for three wells (standard deviations are in brackets) for three successive flushes throughout 4 months. The OD values for one or two replicates non-inoculated (7-8) of each transgenic line analyzed are included in the graphic.

Panel E: The OD values refer to mean optical densities for the six replicates infected with CPV-4 isolate for 96CP, 23CP and 28CP transgenic lines in the three successive flushes. IC refers to mean for infected control. NIC refers to mean for non-infected control. Standard deviations are indicated in brackets.

Figure 4. Analysis of methylation of the DNA from transgenic CP lines.

Panel A. Schematic representation of the T-DNA fragment containing the expression cassette of the *cp* gene showing the resulting fragments after digestion with the restriction enzyme

EcoRI and the methylation-sensitive restriction enzyme *DdeI*. The relative sizes of *cp* probes and the expected hybridization products are indicated.

Panel B. Southern blot hybridization of DNA from the binary plasmid p35SGUSINT/CP (lane 1), 3-control (lane 2) and lines 23 and 96 (lane 3 and 4, respectively) digested with *EcoRI* and *DdeI*. The size of DNA markers are indicated in bp.

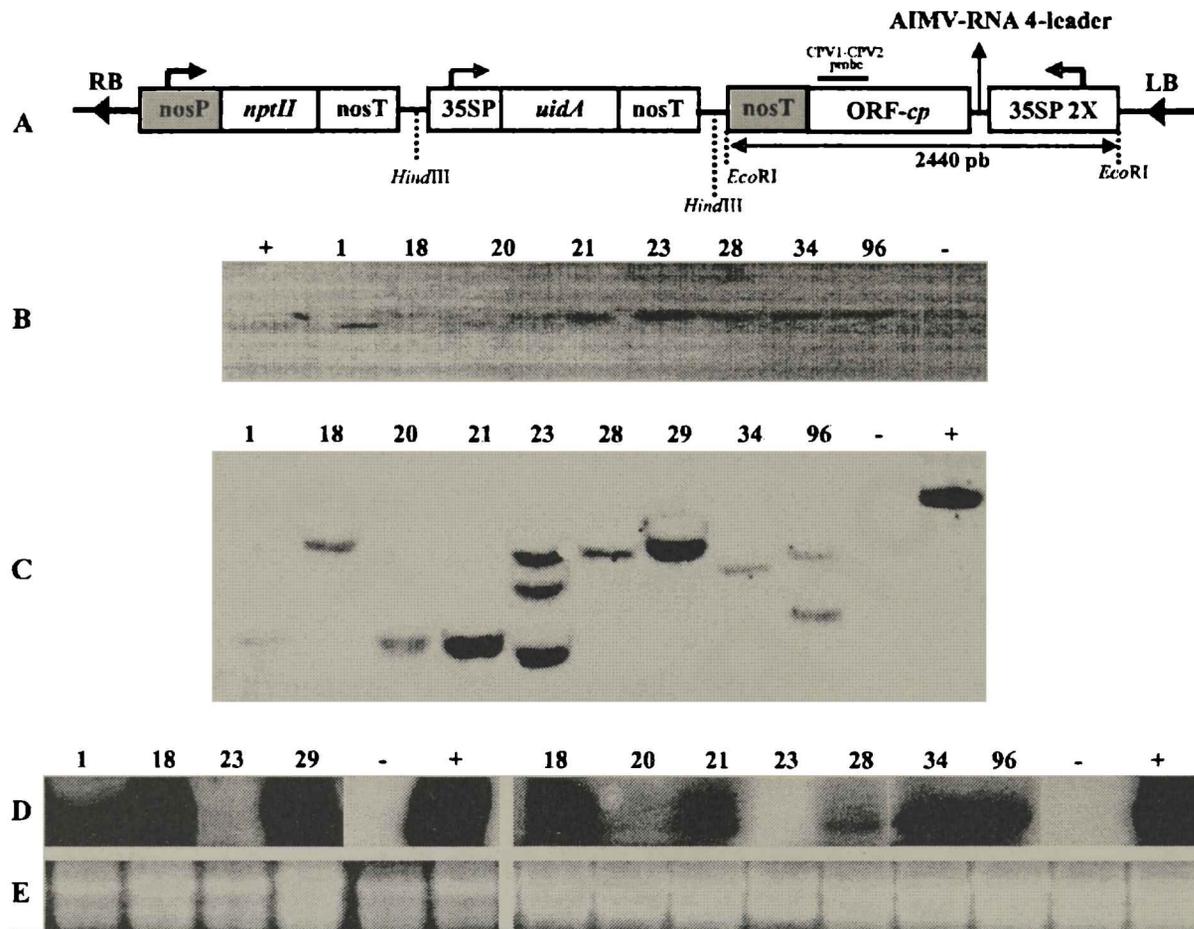


Figure 1 -Zanek et al Panel A: Schematic representation of the T-DNA from the binary plasmid p35SGUSINT/CP engineered to express the coat protein gene (2440 pb) from the CPsV strain CPV-4 in transgenic sweet orange plants. The gene is controlled by the CaMV 35S promoter (35SP) containing a duplicated enhancer region, the Alfalfa mosaic virus RNA4 leader sequence (AIMV-RNA4-leader) and the nos terminator (nosT). The cp coding region (ORF-cp) is flanked by the nptII gene between the nos promoter (nosP) and the nosT, and by the uidA gene (GUS) between the 35SP and the nosT. Transcription orientation of each gene is indicated by arrows, and EcoRI and HindIII restriction sites by vertical lines. The relative size of the CP probe and the expected hybridization products are indicated. RB, right border, LB, left border. **Panel B:** Southern blot analysis of total DNA extracted from the transgenic lines (1, 18, 20, 21, 23, 28, 29, 34 and 96) digested with EcoRI, which release the complete cp gene. **Panel C:** Southern blot analysis of total DNA extracted from the same transgenic lines digested with HindIII which shows the copy number of the transgene integrated. The nylon membranes were probed with a digoxigenin-labeled fragment of the cp coding region (CPV1-CPV2 probe). **Panel D:** Northern blot analysis of total RNA extracted from the transgenic lines (1, 18, 20, 21, 23, 28, 29, 34 and 96) and probed with ³²P-labeled DNA fragment of the cp gene (CPV1-CPV2 probe). **Panel E:** Total RNA extracted from the transgenic plants stained with ethidium bromide after gel electrophoresis showing equivalent RNA loads.

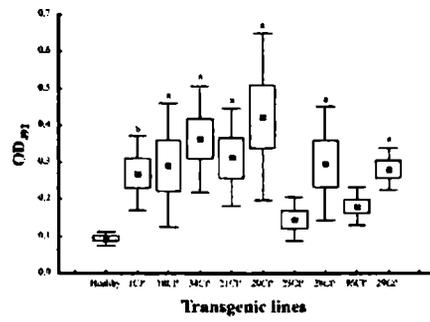


Figure 2 -Zanek et al TAS-ELISA-HRP for the detection of CPsV coat protein in transgenic citrus plants. The OD values refer to mean optical densities for six to seven independent experiments. Small black boxes indicate the mean, the empty boxes the mean \pm SE and the bars the mean \pm SD. The OD values differences were analyzed according to the Fisher LSD test: a represent a statistically significant difference in OD value mean compared with non-transgenic line (healthy) at $P < 0.01$ b represent a statistically significant difference in OD value mean compared with non-transgenic line (healthy) at $P < 0.05$

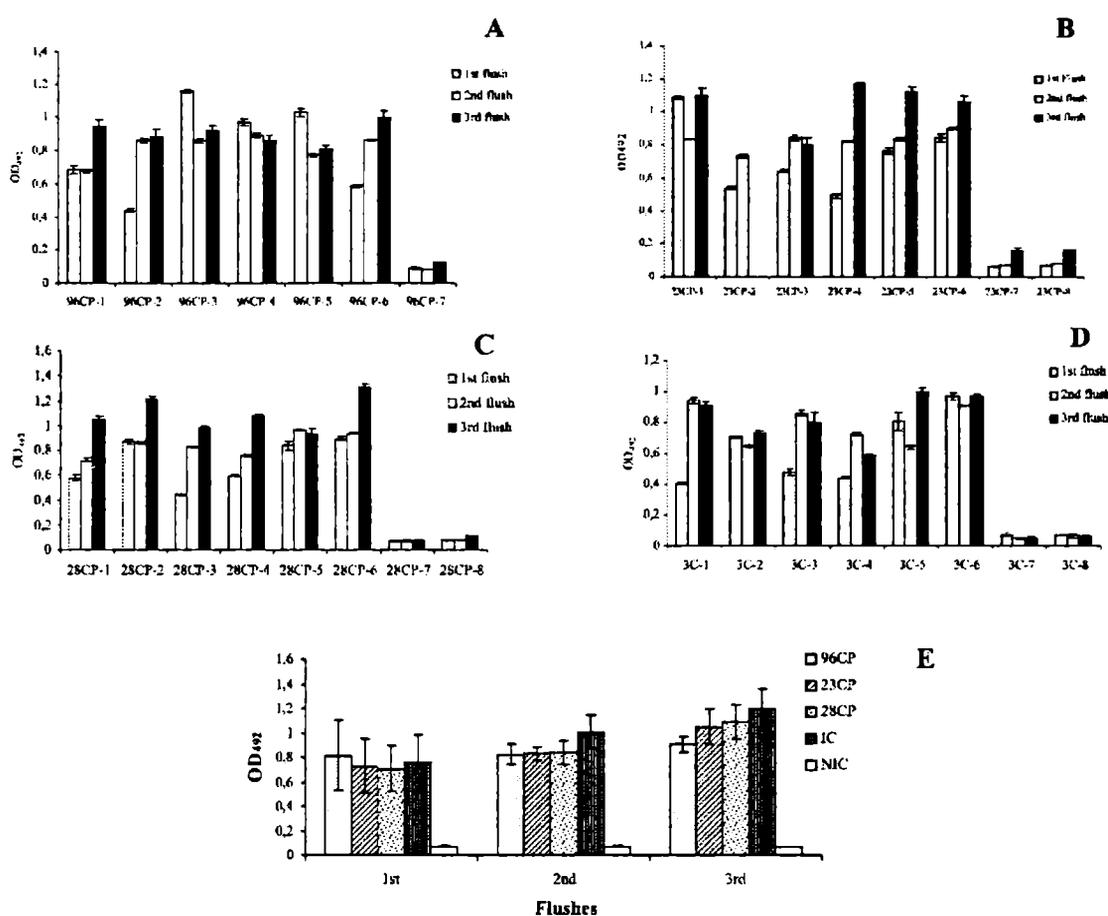


Figure 3. Evaluation of transgenic lines challenged with CPsV. Panels A-D: Analysis of virus accumulation of six replicates (1-6) of lines 96 (96CP), 23 (23CP), 28 (28CP) and 3-control (3-C) by TAS-ELISA-HRP. The OD values refer to mean optical densities for three wells (standard deviations are in brackets) for three successive flushes throughout 4 months. The OD values for one or two replicates non-inoculated (7-8) of each transgenic line analyzed are included in the graphic. Panel E: The OD values refer to mean optical densities for the six replicates infected with CPV-4 isolate for 96CP, 23CP and 28CP transgenic lines in the three successive flushes. IC refers to mean for infected control. NIC refers to mean for non-infected control. Standard deviations are indicated in brackets.

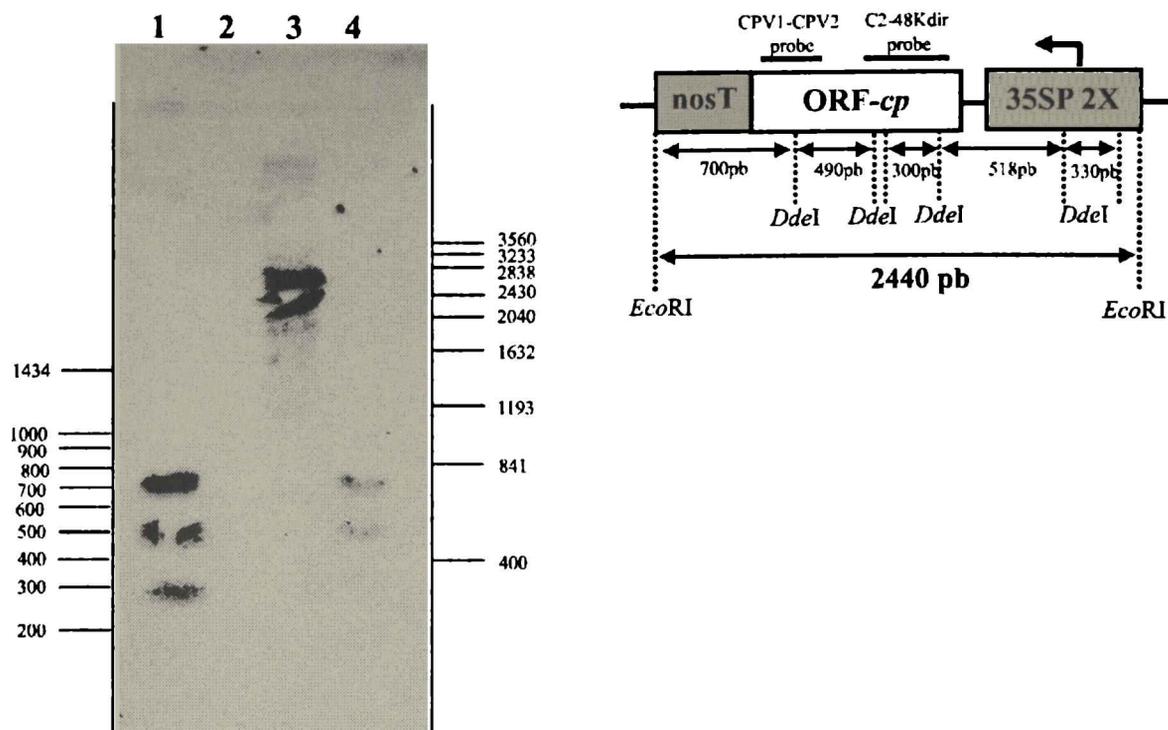


Figure 4. Analysis of methylation of the DNA from transgenic CP lines. Panel A. Schematic representation of the T-DNA fragment containing the expression cassette of the *cp* gene showing the resulting fragments after digestion with the restriction enzyme *EcoRI* and the methylation-sensitive restriction enzyme *DdeI*. The relative sizes of *cp* probes and the expected hybridization products are indicated. Panel B. Southern blot hybridization of DNA from the binary plasmid p35SGUSINT/CP (lane 1), 3-control (lane 2) and lines 23 and 96 (lane 3 and 4, respectively) digested with *EcoRI* and *DdeI*. The size of DNA markers are indicated in bp.

