

## RESISTENCIA TRANSGENICA PARA EL CONTROL DEL VIRUS MOTOSO DEL ENANISMO DE LA FRAMBUESA (RASPBERRY BUSHY DWARF VIRUS - RBDV)

### TRANSGENIC RESISTANCE FOR THE CONTROL OF RASPBERRY BUSHY DWARF VIRUS - RBDV

Angel J<sup>1</sup>, Mayo M<sup>2</sup>.

#### RESUMEN

RBDV se transmite en asociación con polen y por lo tanto la resistencia genética de algunos cultivares del género *Rubus* ha sido la única medida de control efectivo. Sin embargo, recientemente apareció la cepa viral R-15 de RBDV, la cual rompió la resistencia natural existente en algunos cultivares comerciales de frambuesa. El principal objetivo de este proyecto fue medir la resistencia transgénica a la infección con RBDV, la cual podría conferirse mediante diferentes secuencias de genes pertenecientes a este virus, adicionalmente, otro objetivo fue entender los mecanismos moleculares de resistencia transgénica que podrían ser generados por estos genes. Para medir la resistencia transgénica a RBDV, se introdujeron siete construcciones conteniendo secuencias génicas de RBDV dentro de *Agrobacterium tumefaciens* mediante conjugación de la bacteria («triparental mating») y los cultivos resultantes se usaron para transformar fragmentos de hojas de *Nicotiana tabacum* o fragmentos de tallo de plantas de *Nicotiana benthamiana* provenientes de invernadero o de cultivo de tejido. Se utilizaron plantas regeneradas a partir de cultivo de tejido en medio que contenía kanamicina para obtener semillas que dieron origen a plantas de la generación F<sub>1</sub>, las cuales se evaluaron para medir su resistencia a RBDV mediante la inoculación manual de hojas jóvenes y se analizaron para determinar el título de virus mediante ELISA después de 5 y 10 días post-inoculación. Se analizaron más de 20 líneas por cada construcción y los resultados mostraron que cada transgen introducido tuvo algún efecto de protección contra el virus. De esta manera, se obtuvo evidencia de la resistencia inducida por los genes correspondientes a la cápside, la anti-secuencia y la polimerasa de RBDV, los cuales

dieron diferentes grados de protección. La construcción pJAD-10 (secuencia de la cápside de la cepa de RBDV R-15) generó el más alto nivel de protección entre las construcciones analizadas y algunas líneas de *Nicotiana benthamiana* transformadas con esta construcción mostraron inhibición o retardo en la aparición de síntomas de la infección con RBDV. Por otra parte, el resultado de la infección de líneas transgénicas transformadas con una secuencia no traducible de la cápside o con la anti-secuencia de ésta, sugiere que la resistencia puede ser generada o mediante la expresión de la proteína o por medio de transcriptos de RNAm para esta proteína. Estas construcciones están ahora disponibles para ser introducidas en frambuesa.

**Palabras claves:** Resistencia transgénica, virus motoso, frambuesa, *Agrobacterium tumefaciens*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*.

#### SUMMARY

RBDV is transmitted in association with pollen and genetic resistance has been the only effective control measure. However, recently a virus strain (R-15) has appeared which can overcome the viral resistance of most modern raspberry cultivars. A solution to this problem could be the development of transgenic resistance.

The main objective of this project was to assess the resistance to RBDV infection that would be conferred by different RBDV gene sequences and to understand the mechanisms of resistance generated by these gene sequences. To assess

<sup>1</sup> Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), A.A. 7984 Santafé de Bogotá.

<sup>2</sup> Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Dundee, DD2 5DA, Scotland, UK.

the RBDV transgenic resistance, seven constructs containing RBDV gene sequences were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* by triparental mating and the resulting cultures were used to transform leaf pieces from plants of glasshouse grown *Nicotiana tabacum* or in vitro-cultured *N. benthamiana*. Plants regenerated from kanamycin-resistant callus were allowed to set seed and seedlings of the F1 generation were tested for resistance to RBDV by manually inoculating expanded leaves and assaying for virus titre by ELISA 5 and 10 days after inoculation. More than 20 lines were obtained from transformations with each type of construct and the results showed that transformation with each construct had some effect on virus multiplication. Evidence of resistance induced by coat protein (CP) sense, CP anti-sense and polymerase gene sequences was obtained and several degrees of effectiveness of protection were identified among these construct-transgenes. Construct pJAD-10 (RBDV R-15 CP gene sequence) induced the highest level of protection and some *N. benthamiana* lines transformed with this construct also showed inhibition or delay in the development of the symptoms of infection by RBDV. Also, the results of challenging transgenic *Nicotiana* lines transformed with untranslatable CP and CP anti-sense sequences suggest that resistance can be generated by the expression of RBDV CP and also by mRNA CP transcripts. These constructs are now available to be inserted into raspberry germplasm to provide resistance against R-15 strains of RBDV.

**Keywords:** Transgenic resistance, raspberry bushy, virus, *Agrobacterium tumefaciens*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*.

## INTRODUCCION

El concepto de resistencia derivada de un patógeno (transformación de plantas con genes o secuencias derivadas del genoma de un patógeno) tuvo su origen en años recientes (Fitchen and Beachy, 1993). Esta práctica se ha explotado de manera amplia mediante la utilización de genes pertenecientes a virus, hongos y bacterias, entre otros organismos. En particular, genes procedentes de virus han sido introducidos en plantas y utilizados para inducir resistencia a los virus de donde los genes proceden y en algunos casos dicha resistencia puede extenderse a virus genéticamente relacionados. Esta estrategia representa un potencial importante en la agricultura para inducir resistencia contra infecciones virales en cultivos donde ninguna resistencia a estas infecciones ha sido identificada.

Hace aproximadamente 20 años los cultivos de frambuesa y otros cultivos del género *Rubus* en Europa se asociaron con una patología que se caracterizó por amarillamiento y pérdida de vigor de las plantaciones (Murant et al., 1974). Estudios posteriores demostraron la presencia de un agente viral (RBDV) en las plantaciones asociadas a dicha patología (Murant, 1987). Los trabajos de mejoramiento de diferentes cultivares del género *Rubus* mostraron que algunos de éstos eran naturalmente resistentes a la infección con este virus (Jones et al., 1982; 1986). En algunos cultivares de frambuesa, por ejemplo *Rubus idaeus* L; el virus podía detectarse por la prueba de ELISA, pero no se identificaron síntomas que afectaran la productividad del cultivo. Así, se determinaron nuevos cultivares resistentes al virus y esto representó un importante aporte económico para los productores de frambuesa en toda Europa, Estados Unidos, Rusia y otros países. La resistencia de estos cultivares al virus estaba gobernada por un único gen, el cual se denominó Bu y fue identificado en varios cultivares resistentes al virus (Jones et al., 1982).

Sin embargo, en 1984 una nueva cepa de este virus denominada RBDV R-15, aislada en el Reino Unido produjo importantes pérdidas económicas para los cultivadores de frambuesa (Barbara et al., 1984). Los cultivos de frambuesa infectados con esta cepa viral se caracterizaban por pérdida de vigor de la plantas, amarillamiento de las hojas, arrugamiento y caída del fruto. Los análisis de germoplasma para buscar cultivares de frambuesa resistentes a esta nueva cepa viral indicaron que todos los cultivares evaluados, incluyendo aquellos que contenían el gene Bu eran susceptibles y mostraban la sintomatología característica a la infección con esta cepa viral (Barbara et al., 1984). Si se considera que la transmisión de este virus se hace únicamente a través de polen infectado (Cadman, 1965; Murant et al., 1974), la única posible alternativa para inducir resistencia a esta cepa viral es a través de resistencia transgénica.

El presente trabajo tuvo como principal objetivo explorar secuencias de genes provenientes de RBDV para la inducción de resistencia transgénica en plantas de *Nicotiana tabacum* y *Nicotiana benthamiana*. Para llevar a cabo este objetivo, se crearon siete diferentes construcciones las cuales contenían arreglos genómicos de RBDV que se usaron para transformar plantas de *Nicotiana* sp.

Un segundo objetivo fue determinar los mecanismos moleculares de resistencia inducidos por estos transgenes. Para este propósito se introdujo la anti-secuencia de la cápside y la secuencia de la misma pero conteniendo tres codones de terminación al inicio de la secuencia en plantas de *N. tabacum*. Secuencias de estas características integradas al genoma de las plantas pueden transcribirse pero no

traducirse y de esta manera se puede determinar si la resistencia al virus es inducida por la expresión del gene de la cápside o si dicha resistencia es conferida justo por el producto de su transcripción (RNAm).

## MATERIALES Y METODOS

**Cepas virales:** Los aislamientos de RBDV de las cepas: D-200, Canby Mild y Canby Severe fueron donados por el Doctor A.T. Jones del Scottish Crop Research Institute. Las cepas se mantuvieron en *Chenopodium quinoa* o *N. benthamiana* bajo condiciones de invernadero. Otra cepa viral, tal como la cepa motivo de estudio R-15, fue previamente estudiada y reportada en el Scottish Crop Research Institute (Murant *et al.*, 1986; Mayo *et al.*, 1991; Ziegler *et al.*, 1992).

### Producción de plantas transgénicas:

Se ha adelantado muy poco en la tecnología de transformación de frambuesa y la eficiencia de transformación de esta planta, usando *Agrobacterium*, es muy baja. Por esta razón, la resistencia transgénica para el control de RBDV se evaluó primero en *N. tabacum* y *N. benthamiana*. Sin embargo, un impedimento para la realización de las pruebas de resistencia transgénica fue que las cepas conocidas de RBDV no inducían expresión de síntomas en *N. tabacum* o en *N. benthamiana*. Afortunadamente, el descubrimiento de una nueva cepa viral de RBDV en el Scottish Crop Research Institute, que se denominó Canby Severe, ya que se originó de la cepa Canby Mild, produjo nuevas características tales como la expresión de síntomas en un amplio espectro de plantas herbáceas, incluyendo *N. tabacum* y *N. benthamiana*, además de la expresión de infección sistémica en algunas de estas especies. Esta nueva cepa de RBDV ofrecía todas las características deseables para realizar las pruebas de resistencia transgénica.

Un total de siete secuencias se introdujeron en *N. tabacum* y en *N. benthamiana* para medir su capacidad de inducir resistencia transgénica para RBDV: la secuencia de nucleótidos de la cápside de R-15 precedida por la secuencia de nucleótidos de la cápside del virus del enrollamiento de la papa (PLRV), la secuencia de nucleótidos de la cápside de la cepa R-15 y su anti-secuencia; estas tres secuencias se clonaron en pROKII (Baulcombe *et al.*, 1986) para obtener las construcciones pJAD-9, pJAD-10 y pJAD-11 respectivamente. Las restantes cuatro secuencias se clonaron en el vector de expresión en plantas pGA-482 (An, 1986), estas secuencias fueron el gen de la cápside de la cepa D-200, el gen de la polimerasa de la cepa D-200, el gen de la cápside de la cepa R-15, el gen de la cápside de la cepa R-15 pero conteniendo tres codones de terminación al comienzo de la secuencia. Estas secuencias se produjeron a partir de RNA viral por la tecnología de RT-

PCR (transcriptasa reversa y reacción en cadena de la polimerasa), para producir el cDNA correspondiente a la secuencia de los genes virales requeridos, los cuales se clonaron en el vector pGEM-T (Laboratorios Promega) y subsecuentemente en pROK-II o pGA-482. Estas siete construcciones (Figura 1) se introdujeron por conjugación en *A. tumefaciens* desarmado (triparental mating) y los cultivos resultantes se utilizaron para transformar fragmentos circulares de hojas de *N. tabacum* de 1 cm de diámetro o fragmentos de tallo de *N. benthamiana* de 5 mm de largo. Plantas regeneradas a partir de callus que crecieron en medio conteniendo kanamicina se usaron para obtener semilla y plantas obtenidas de éstas (generación F<sub>1</sub>) se evaluaron para determinar su resistencia a RBDV.

### Determinación de plantas transgénicas:

Algunas de las plantas resistentes a kanamicina también se examinaron por PCR para la detección del transgen. DNA genómico fue sujeto a amplificación como describe Aatsinki *et al.*, 1994, usando iniciadores específicos para la detección de la cápside (RBDV3 5' GTTTTCCATGGC GAAGAAAGTG3' y RBDV4 5' GCCCTCTAGAGGCAAA TAGTCCG 3') o de la polimerasa (RBDV1 5' AATGC CATGGATAGCTAATAAATAGTTTGATCTGG 3' y RBDV2 5' AATCTA- GAACAGCATTGAAAAGAGACAG GC 3').

### Reacción en cadena de la polimerasa y transcriptasa

**reversa:** Este método se usó esencialmente como lo describen Aatsinki *et al.*, en 1994 utilizando como sustrato RNA viral y iniciadores específicos para la producción de los genes requeridos.

**Extracción de DNA y RNA:** Se hizo extracción de RNA total de plantas transformadas usando el método descrito por Verwoerd *et al.*, 1989. Similarmente, el método utilizado para extracción de DNA total (genómico) fue el descrito por Thompson *et al.*, 1983.

**Hibridización Dot-blot:** Se hizo esta reacción utilizando sondas no radioactivas las cuales fueron marcadas con digoxigenina (Laboratorios Boehringer). La reacción de hibridización, marcaje y revelado se hizo siguiendo las recomendaciones de este laboratorio.

**Western blotting:** El método usado para la extracción de proteínas, de electroforesis SDS-PAGE y Western immunoblotting fue el descrito por Dawson *et al.*, 1988 y Webster y Barker, 1994. La cápside se detectó utilizando una dilución de 1/1000 del antisuero policlonal anti-RBDV preparado en conejo.

**Infección de plantas transgénicas:** Líneas de *N. tabacum* y *N. benthamiana* de aproximadamente ocho semanas de edad y transformadas con las siete construcciones conteniendo secuencias de los genes de

RBDV, se infectaron con RBDV Canby Severe por inoculación mecánica (con savia de plantas de *N. benthamiana* previamente infectadas) en hojas jóvenes de cada planta a evaluar.

**Determinación de partículas virales por ELISA:**

Se usó ELISA doble sandwich (Clark y Adams, 1977) para detectar RBDV en los extractos de plantas transgénicas. Las placas se cubrieron con una dilución de 1/1000 de antisuero policlonal producido en conejo,

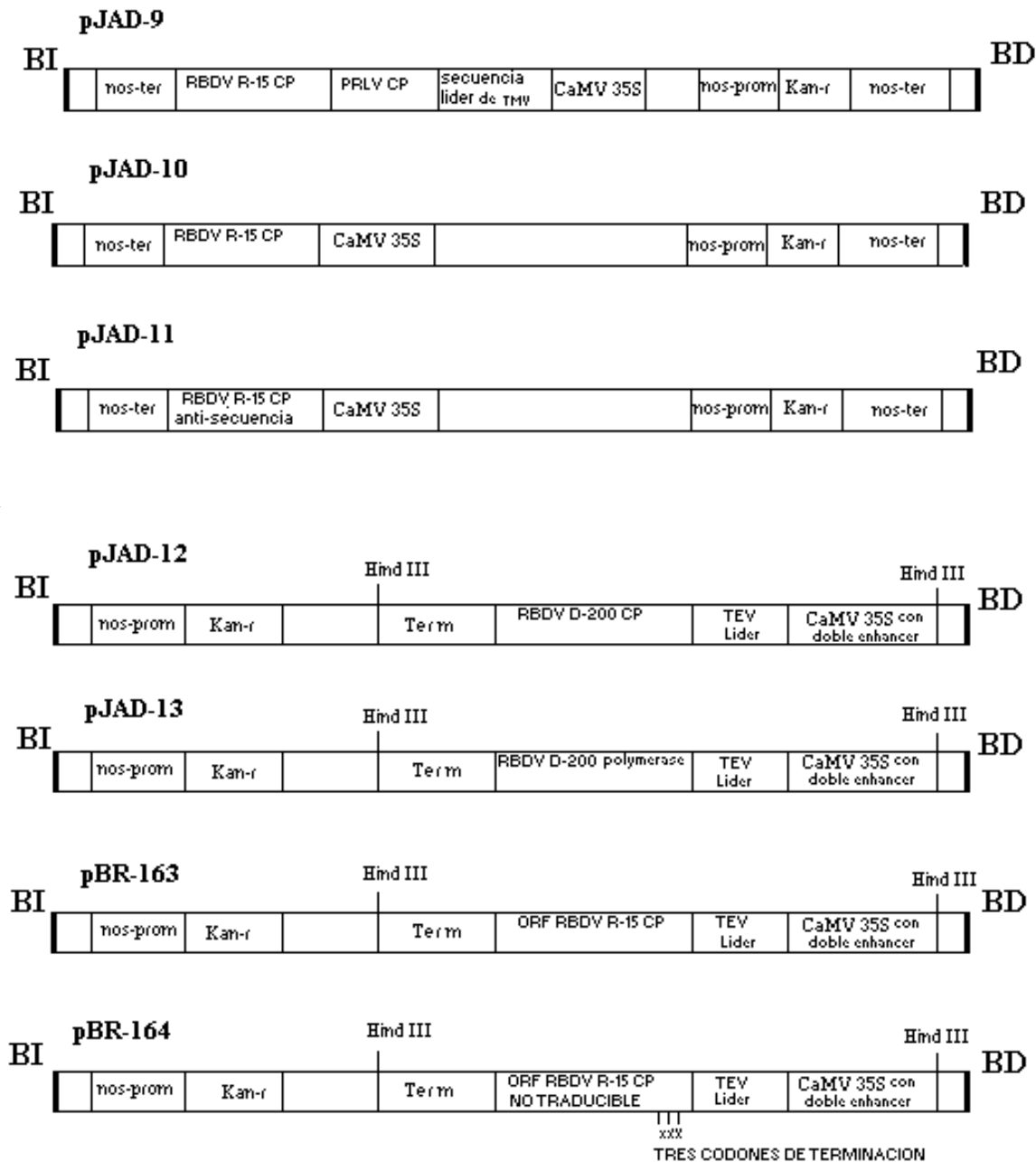


Figura 1. Mapas de las siete construcciones conteniendo los genes de RBDV. Los siguientes símbolos aparecen en estos diagramas: Bordes Izquierdo y Derecho del T-DNA de *A. tumefaciens* (BI y BD), promotor de la nopalina sintetasa (*nos-prom*), secuencia terminal del gene de la nopalina sintetasa (*nos-ter*), gene de resistencia a la kanamicina (*Kan-r*), virus del mosaico de la coliflor 35S (CaMV promotor 35S), cubierta proteica del virus del enrollamiento de la papa (PLVR CP), secuencia líder del virus del mosaico del tabaco (secuencia líder de TMV), líder del virus etch del tabaco (TEV líder) y signo 35S poli (A) (Term). Las cajas en blanco significan secuencias intermedias de los vectores de clonaje en plantas.

una dilución de 1/1000 de anticuerpo monoclonal dirigido contra la cápside de RBDV y una dilución de 1/10000 de conjugado marcado con fosfatasa alcalina se usaron para detectar el antígeno de la cápside de RBDV.

**Pruebas de resistencia:** Las líneas transgénicas se evaluaron tomando dos muestras de diferente hoja inoculada a los 5 y a los 10 días post-inoculación (muestra 1 y muestra 2 respectivamente). Se usaron dos controles para cada prueba de ELISA: (i) plantas de *N. tabacum* o *N. benthamiana* libres de virus, dependiendo de la especie retada (control negativo) y (ii) plantas de *N. tabacum* o *N. benthamiana* inoculadas con RBDV Canby Severe (control positivo). En total, seis plantas del control positivo y seis del control negativo se usaron para cada placa de ELISA. El valor del control negativo se sustrajo de cada valor obtenido por ELISA. Se estimó la desviación estándar del ensayo de los controles positivos para cada ELISA y se tomaron los valores mayores de dos desviaciones estándar debajo de la media del control positivo para indicar resistencia (para obtener un 95% de significancia). Un total de 209 líneas equivalente a 1254 plantas se evaluaron por ELISA y se analizaron para determinar la resistencia a RBDV.

## RESULTADOS

**Análisis del gen de la cápside y de la polimerasa en plantas transformadas:** DNA genómico correspondiente a plantas transformadas de *N. tabacum* o *N. benthamiana* con el gen de la cápside o de la polimerasa (transformación primaria) se analizaron por PCR para determinar la presencia y el tamaño correcto de estos genes. Las líneas transgénicas detectadas positivas por PCR para la presencia del transgen se les permitió autopolinizarse. Las semillas producidas por estas plantas se colectaron, se germinaron y las plantas obtenidas de estas semillas se analizaron por PCR para determinar el grado de segregación, encontrándose las proporciones de segregación Mendeliana esperadas.

### Análisis de expresión de transcritos de RNA de la cápside de RBDV en plantas transgénicas:

Un total de 40 muestras de diferentes plantas se analizaron para la detección de transcritos correspondientes a la cápside de RBDV mediante hibridación dot-blot. La Figura 2A muestra un ejemplo de la detección de transcritos de la cápside provenientes de las líneas 29 y 27 de *N. tabacum* transformadas con pJAD-10. La Figura 2B muestra la detección de este mismo transcripto en las líneas 6 y 2.1 de *N. benthamiana*. De las 40 muestras analizadas, sólo cuatro mostraron acumulación de transcritos de la cápside. Este análisis también reveló variables niveles de transcripción indicado por la intensidad de los puntos de reacción.

**Análisis de expresión de la cápside de RBDV en plantas transgénicas:** Se detectó una proteína con un peso molecular de 30 Mr por Western blot en muestras obtenidas de las líneas 29 y 27 de *N. tabacum* transformadas con la construcción pJAD-10 y en las líneas 6 y 2.1 de *N. benthamiana* transformadas con esta misma construcción (las mismas líneas donde se detectaron los transcritos de la cápside). En este análisis, ninguna banda correspondiente a esta proteína se observó en el filtro en las muestras de las líneas 31 transformada con pJAD-11, 5 con pJAD-12 y 8 con pJAD-11 (Figura 3).

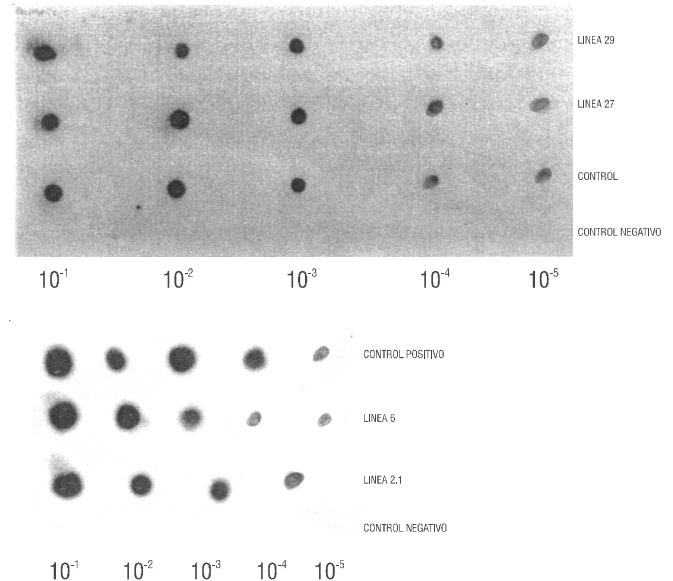


Figura 2. Detección por dot-blot hibridación del gene de la cubierta proteica de RBDV en líneas transformadas de *N. tabacum* y *N. benthamiana*. Las muestras de RNA total fueron diluidas (de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-5}$ ) y se aplicó un 1  $\mu$ l de cada dilución (A) RNA total de las líneas 27 y 29 de *N. tabacum* Samsun transformadas con pJAD-10. (B) RNA total de las líneas 6 y 2.1 de *N. benthamiana* transformadas con pJAD-10. Los controles positivo y negativo fueron los mismos en ambos casos (A y B), el control positivo fue RNA total de *C. quinoa* infectada con RBDV Canby Severe y el control negativo fue RNA total de *N. tabacum* no infectada.

**Determinación de líneas transgénicas resistentes a la infección con RBDV:** Debido a que el número de datos obtenidos de cada infección correspondiente para cada transformación fue relativamente extenso, la presentación de los datos se resumió agrupando las líneas en términos de resistencia o susceptibilidad de acuerdo con la acumulación de virus por la prueba de ELISA en la muestra 1 o en la muestra 2. De acuerdo a estos criterios, se encontraron tres categorías en términos de resistencia o susceptibilidad en las evaluaciones de resistencia de las plantas transgénicas: (a) cuando

ninguna de las dos muestras evaluadas de la misma planta fueron resistentes (categoría SS, susceptible), (b) cuando sólo una de las dos muestras evaluadas de la misma planta fue resistente (categoría PR, posible resistente) y (c) cuando las dos muestras evaluadas de la misma planta fueron resistentes (categoría RR, resistente).

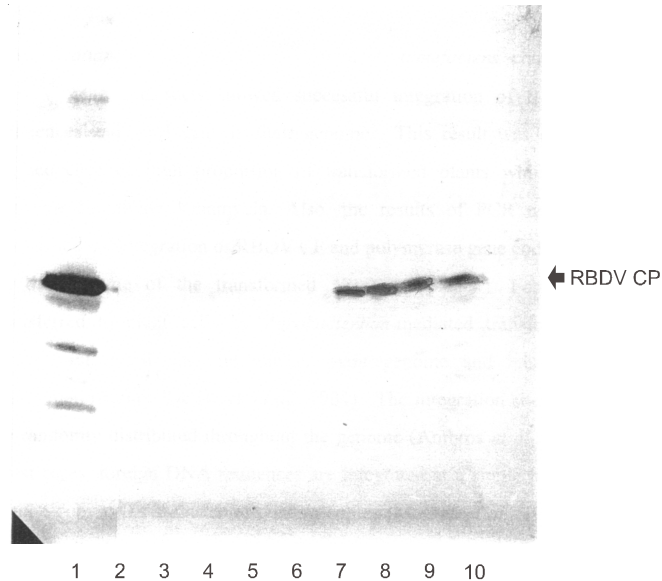


Figura 3. Análisis por Western blot de la expresión de la cubierta proteica de RBDV en líneas transformadas R1 de *N. tabacum* y *N. benthamiana*. *C. quinoa* infectada con RBDV Canby Severe (carril 1). Líneas de *N. tabacum*: 31 con pJAD-11 (carril 2), 5 con pJAD-12 (carril 3), 8 con pJAD-11 (carril 4). *N. tabacum* no transformada y no infectada (carriles 5 y 6), líneas 27 y 29 transformadas con pJAD-10 (carriles 7 y 8). Líneas de *N. benthamiana*: 6 y 2.1 con pJAD-10 (carriles 9 y 10).

La Tabla 1 muestra las proporciones de líneas que cayeron dentro de las categorías de resistencia. Se definieron dos grupos separados de líneas en este análisis. El Grupo I corresponde a plantas de *N. tabacum* transformadas con las construcciones pJAD-9, pJAD-10, pJAD-11, pJAD-12, pJAD-13, pBR-163 y pBR-164 (Tabla 1). El Grupo II correspondió a plantas de *N. benthamiana* transformadas con pJAD-10 y pJAD-11 (Tabla 1).

En el Grupo I, la transformación que resultó en la proporción más alta de líneas resistentes, fueron plantas transformadas con las construcciones pJAD-10 y pJAD-11. Las plantas transformadas con los restantes constructos mostraron líneas resistentes pero en menor proporción (Tabla 1). Sin embargo, en plantas transformadas con la construcción pJAD-12, no se encontraron plantas susceptibles y la proporción de plantas resistentes fue significativamente alta. Un

efecto contrario se encontró en plantas transformadas con las construcciones pJAD-9 y pBR-164, donde el número de plantas susceptibles fue comparativamente mayor con las restantes transformaciones (Tabla 1). En el Grupo II, la transformación de plantas de *N. benthamiana* con pJAD-11 resultó en un número mayor de líneas resistentes que en las líneas transformadas con pJAD-10. Sin embargo, una gran proporción de plantas transformadas con pJAD-10 fueron posibles resistentes. La proporción de plantas susceptibles resultantes de la infección de ambas transformaciones fue similar (Tabla 1).

Tabla 1. Proporciones de diferentes categorías de resistencia determinadas en transformaciones de *Nicotiana tabacum* y *Nicotiana benthamiana*

Construcción	Número de líneas evaluadas	Número de plantas evaluadas	Categorías de Resistencia		
			Plantas SS (%)	Plantas PR (%)	Plantas RR (%)
pJAD-9 *	21 R1	126	35 (28)	64 (50)	27 (22)
pJAD-10	24 R1	144	9 (6)	10 (7)	125 (87)
pJAD-11	21 R1	126	1 (1)	19 (15)	106 (85)
pBR-163	20 R1	120	28 (23)	27 (23)	65 (54)
pBR-164	20 R1	120	52 (43)	23 (19)	45 (38)
pJAD-12	27 R0	27	0 (0)	9 (33)	18 (67)
pJAD-13	36 R0	36	6 (17)	16 (45)	14 (39)
pJAD-10**	39	234	93 (40)	118 (50)	23 (10)
pJAD-11	19	114	54 (47)	37 (32)	23 (20)

\* Grupo I : *Nicotiana tabacum*,\*\*Grupo II : *Nicotiana benthamiana*.

La inducción de síntomas se monitoreo en líneas transformadas entre los días 5 y 20 post-inoculación. Todas las líneas de *N. benthamiana* desarrollaron claros síntomas entre los días 5 y 10 post-inoculación (efecto sistémico de mosaico), excepto en las líneas 6, 25, 9, 1.2 y 1.1 transformadas con pJAD-10 las cuales mostraron atenuación de la expresión sistémica de síntomas o no expresión de síntomas por completo como en la línea 2.1, también transformada con pJAD-10 (Figura 4). Este efecto se observó en las seis plantas pertenecientes a estas líneas las cuales se detectaron como posibles resistentes (PR). Las líneas de *N. tabacum* retadas con la cepa Canby Severe de RBDV no se monitorearon debido a que los síntomas se expresaron irregularmente en las líneas inoculadas o en el control positivo. Los resultados de ELISA sin embargo, indicaron que las líneas de *N. tabacum* inoculadas con virus, mostraban multiplicación de virus, aunque no se detectaran síntomas. La detección de transcritos y de la cápside de RBDV de plantas transgénicas mostró que todas las líneas de *N. tabacum* transformadas con pJAD-10 y que expresaron

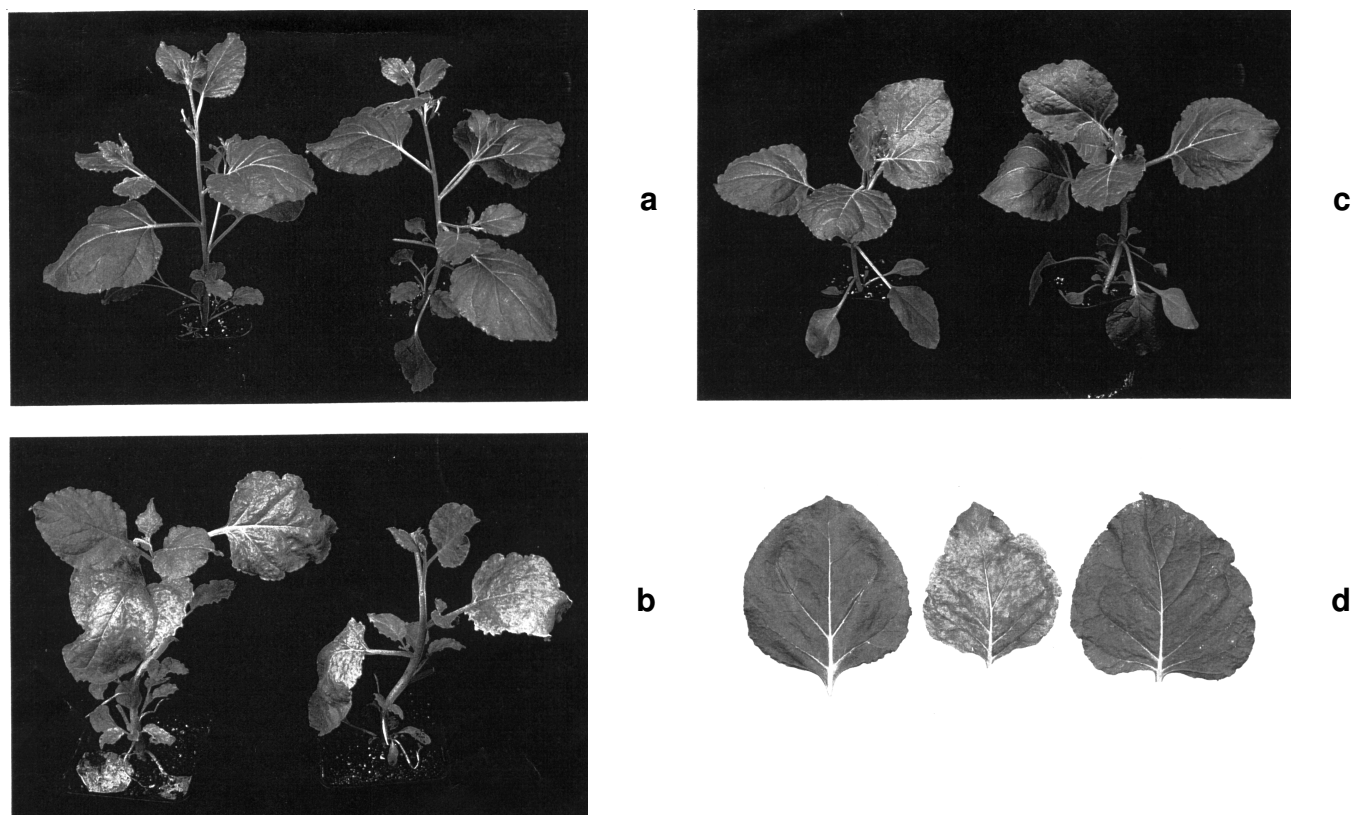


Figura 4. Prueba de Resistencia Transgénica, Expresión de Síntomas en Plantas de *N. benthamiana* Inoculadas con RBDV Canby Severe. (A) Tipo silvestre saludable. (B) Tipo silvestre infectado. (C) Línea transgénica 2.1 (D) Hojas a partir de: planta tipo silvestre saludable (izquierda), tipo silvestre infectado (centro) y línea transgénica 2.1 infectada (derecha).

el transcripto de la cápside (líneas 27, 29, 11 y 4) fueron resistentes (RR) a la infección con RBDV. Estos resultados indican que pJAD-10 indujo mayor protección en plantas de *N. tabacum* las cuales expresaron la cápside de RBDV, que aquellas plantas de *N. benthamiana* que también expresaron este gen.

## DISCUSION

El aislamiento de la cepa Canby Severe resultó de gran utilidad en las pruebas de resistencia de las plantas transgénicas. Canby Severe, la cual originalmente se aisló de una replicación de Canby Mild en *N. benthamiana*, probó poderse replicar y expresar síntomas en un amplio rango de plantas herbáceas (*C. quinoa*, *N. glutinosa*, *N. tabacum*, *N. tabacum* Xanthi, *N. tabacum* White Barley, *N. occidentalis*, *N. tabacum* Japanese Xanthi y *N. benthamiana*). Esta cepa produjo infección sistémica en *N. benthamiana* e infección local en *N. tabacum*, con una expresión clara de síntomas los cuales pudieron ser monitoreados durante las pruebas de resistencia en *N. benthamiana* pero no en *N. tabacum* ya que la expresión de síntomas fue muy irregular y ésto impidió el monitoreo de esta especie en las pruebas de resistencia.

La introducción de siete construcciones en *N. tabacum* y la introducción de pJAD-10 y pJAD-11 en *N. benthamiana* facilitó la obtención de información de estos diferentes arreglos genómicos. Los resultados del análisis de la prueba de PCR confirmaron la integración de las secuencias que codificaban para los genes de la cápside y la polimerasa en el genoma de las plantas transformadas de *Nicotiana* sp. El DNA foráneo transferido dentro de las células vegetales por medio de *Agrobacterium* usualmente se integra dentro del genoma nuclear de las células de la planta y se hereda de una manera Mendeliana (De Block *et al.*, 1984). En la mayoría de los casos las secuencias de DNA foráneo se integran en un solo *locus*, tanto como una sola copia o como serie de éstas (Mouras *et al.*, 1987). Los datos del experimento de RNA Dot-blot y Western blot demostraron la expresión del gen de la cápside integrado en el genoma celular, así como la no degradación extensiva de esta proteína.

En general, las plantas de *N. tabacum* y *N. benthamiana* transformadas con el gen de la cápside fueron resistentes a la infección con RBDV. Sin embargo, la resistencia producida varió entre las plantas de una línea particular, o entre las líneas, o entre las plantas transformadas con las diferentes construcciones. Por ejemplo, pJAD-9

conteniendo el gen de la cápside de la cepa R-15 precedido por la secuencia líder del virus del mosaico del tabaco (TMV), el cual se usó para transformar *N. tabacum*, produjo una resistencia marginal. Igualmente plantas transformadas con las construcciones pBR-163 y pBR-164 también produjeron una resistencia marginal. En contraste, la construcción pJAD-12 conteniendo el gen de la cápside de la cepa D-200 introducida en *N. tabacum*, dió un alto nivel de plantas transgénicas resistentes al virus (67% plantas transgénicas RR), no se encontraron plantas susceptibles a la infección con el virus en plantas transformadas con esta construcción, sin embargo, el nivel más alto de resistencia se detectó en plantas de *N. tabacum* transformadas con la construcción pJAD-10, la cual contenía el gen de la cápside de la cepa R-15 introducida en el vector de expresión pROKII. Curiosamente, plantas de *N. benthamiana* transformadas con esta construcción pJAD-10 produjeron una proporción muy baja de líneas resistentes (23/234). Estos resultados sugieren que aunque una construcción puede inducir resistencia contra la infección viral, la cual resistencia puede variar entre especies diferentes transformadas con la misma construcción. Estos resultados igualmente sugieren que puede haber uno o más factores presentes en estas especies de plantas, los cuales están involucrados en la generación de resistencia. Se han llevado a cabo estudios para explicar por qué diferentes especies de plantas transformadas con la misma construcción generan diferentes grados de resistencia (Lindbo *et al.*, 1993).

La anti-secuencia de la cápside de la cepa R-15 introducida tanto en *N. benthamiana* como en *N. tabacum* generó resistencia en ambas especies. Sin embargo, la resistencia en *N. tabacum* fue mayor y más consistente que en *N. benthamiana*. De 21 líneas analizadas de *N. tabacum* transformadas con esta construcción, sólo una línea fue susceptible, mientras que en *N. benthamiana* el 47% de líneas analizadas mostraron ser susceptibles. La anti-secuencia de la cápside no se esperaba que fuera expresada en plantas transformadas con esta secuencia, debido a que el codón de iniciación de esta secuencia en pJAD-11 estaba localizado en la parte terminal de la secuencia en relación con el promotor 35S. Por lo tanto, la resistencia inducida por esta anti-secuencia de la cápside de RBDV parece ser generada por efecto de la transcripción de esta secuencia, o por el transgen en sí mismo, más no por la expresión de la cápside.

Una explicación adicional para esta diferencia de expresión de resistencia entre especies de plantas transformadas con la misma construcción se ha relacionado con el nivel de RNA polimerasa dependiente de RNA, el cual produce un efecto de retroalimentación sobre el transgen y puede aumentar la hipermetilación de éste lo que puede inducir un efecto supresor del transgen (silenciamiento del gen) el cual reprime la

expresión del transgen (Smith *et al.*, 1994; English *et al.*, 1996). Otra probable explicación a esta diferencia de resistencia es que *N. benthamiana* es más susceptible a la infección con RBDV Canby Severe que *N. tabacum*. Esto se deduce del hecho de que la infección de *N. tabacum* con Canby Severe induce necrosis local en la hoja u hojas infectadas y en algunos casos no se detecta expresión de síntomas (aunque puede haber replicación viral). En contraste, con este resultado, la infección de *N. benthamiana* con Canby Severe indujo siempre síntomas sistémicos de la infección y la replicación del virus ocurrió en casi todas las hojas de la planta inoculada. Estos resultados hacen suponer que los genes de RBDV introducidos en *N. benthamiana* generaron resistencia a la infección con RBDV en un alto grado pero debido a la susceptibilidad de esta especie a ser infectada con RBDV, tanto la expresión de síntomas como la acumulación de virus aparecieron más visibles que en plantas transgénicas de *N. tabacum* retadas con el virus. Otro aspecto a considerar en relación con la resistencia débil expresada por plantas transgénicas de *N. benthamiana* retadas con el virus, es la presión del inóculo viral. La concentración de partículas virales presentes en el inóculo usado en las pruebas de resistencia transgénica fue relativamente alto (cientos de partículas virales) y los síntomas en las plantas infectadas con este inóculo aparecieron rápidamente después de la inoculación (5 y 10 días post-inoculación). La infección natural de RBDV se lleva a cabo mediante partículas de polen infectadas con el virus y en ello es de esperarse que el número de partículas virales en el polen infectado es menor que el número de partículas virales usado en las pruebas de resistencia transgénica. Bajo estas condiciones aún una débil resistencia inducida por los genes de RBDV podría ser suficiente para generar resistencia al virus debido a la baja presión del inóculo. De igual manera, aún si la transformación de plantas de frambuesa con secuencias de genes de RBDV resulta sólo en una resistencia débil, tal resistencia podría ser suficiente para evitar la infección viral.

El análisis de la expresión de síntomas en este trabajo, indicó que la secuencia del gen de la cápside de la cepa R-15 en *N. benthamiana* indujo atenuación o inhibición de la expresión síntomas para Canby Severe; contrario a este resultado, la anti-secuencia de la cápside de esta misma cepa no afectó la expresión de síntomas de Canby Severe (los síntomas siempre se detectaron).

La resistencia conferida por la polimerasa de la cepa D-200 en plantas transgénicas de *N. tabacum* fue relativamente alta, aunque la resistencia inducida por este gen fue menor que la obtenida con el gen de la cápside de la misma cepa. Este resultado demuestra que el gen de la polimerasa de RBDV puede generar confiable y efectiva protección para la infección viral con RBDV Canby Severe.



La variabilidad de resistencia entre líneas transgénicas (por ejemplo, algunas se detectaron como posibles resistentes (PR), mientras que otras se encontraron resistentes RR), sugiere la influencia de un factor genético, tal como el número o posición de transgenes. El efecto del número de copias de un transgen en la inducción de resistencia se demostró mediante Southern blot, por ejemplo, plantas transgénicas que tuvieron más de una copia del gen de la cápside del virus del mosaico de la alfalfa (AIMV) fueron más resistentes a la infección viral que aquellas que tuvieron justo una sola copia del transgen (Loesch-Fries *et al.*, 1987). De acuerdo con este estudio, es posible hipotetizar que plantas transgénicas encontradas resistentes (RR) tuvieron un mayor número de copias del transgen que aquellas encontradas posible resistentes (PR).

La demostración de que estas secuencias de los genes de RBDV (cápside, anti-secuencia de la cápside y polimerasa) pueden inducir resistencia en *N. tabacum* y en *N. benthamiana* abre un número de alternativas las que se pueden explotar para generar resistencia a la infección viral con RBDV en plantas de frambuesa. El próximo paso a seguir debe ser la transformación de plantas de frambuesa con las construcciones pJAD-10, pJAD-11, pJAD-12 y pJAD-13 y evaluar la resistencia inducida por estos transgenes en dichas plantas en condiciones de laboratorio y de campo, ya que el efecto de la presión del inóculo puede ser un

factor importante en la eficiencia de la protección obtenida.

Una estrategia alternativa para inducir resistencia para RBDV en plantas de frambuesa podría ser la transformación de dichas plantas con una combinación de los genes de la cápside y la polimerasa del virus. La introducción de estos dos genes en una planta podría generar una resistencia más fuerte contra la infección de RBDV. Esta estrategia se usó con resultados positivos para generar resistencia contra el virus del mosaico del tabaco (TMV) (Harrison and Murrant, 1988).

En síntesis, los resultados presentados en este trabajo ilustran una variedad de caminos en los cuales la biotecnología, basándose en el conocimiento de la biología molecular de los virus, puede ser explotada para proveer nuevas soluciones a problemas de enfermedades causadas por virus. Este trabajo continúa en el Scottish Crop Research Institute y se espera que un beneficio práctico se obtenga en cultivos de frambuesa en los años venideros.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por Colciencias y la Secretaría de Agricultura del Reino Unido (The Scottish Office Agriculture, Environment and Fisheries Department).

## BIBLIOGRAFIA

- Aatsinki J T, Lakkakorpi J T, Pietilä E M, and Rajaniemi H J** (1994). A coupled one-step reverse transcription PCR procedure for generation of full-length open reading frames. *BioTechniques*. **16**, 282-288.
- An G.** (1986). Development of plant promoter expression vectors and their use for analysis of differential activity of nopaline synthase promoter in transformed tobacco cells. *Plant Physiol*. **81**, 86-91.
- Barbara D J, Jones A T, Henderson S J, Wilson S C and Knight V H.** (1984). Isolates of raspberry bushy dwarf virus differing in *Rubus* host range. *Ann. Appl. Biol.* **105**, 49-54.
- Barnett O W, and Murrant A F.** (1970). Host range, properties and purification of raspberry bushy dwarf virus. *Ann. Appl. Biol.* **65**, 435-449.
- Baulcombe D C, Saunders G R, Bevan M W, Mayo M A, and Harrison B D** (1986). Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. *Nature (London)* **321**, 446-449.
- Cadman C H.** (1965). Filamentous viruses infecting fruit trees and raspberry and their possible mode of spread. *Plant. Dis. Rep.* **49**, 230-232.
- Clark M F, and Adams A N.** (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **34**, 475-483.
- Dawson W O, Bubrick P, and Grantham G L.** (1988). Modifications of the tobacco mosaic virus coat protein gene affecting replication, movement, and symptomatology. *Mol. Plant Pathol.* **78**, 783-789.
- De Block M, Herrera-Estrella L, Van Montagu, M., Schell, J. and Zambryski, P.** (1984). Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny. *EMBO J.* **3**, 1681-1689.
- English J J, Mueller E, and Baulcombe D E.** (1996). Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *Plant Cell* **8**, 179-188.
- Fitch J H, and Beachy R N.** (1993). Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. *Annu. Rev. Microbiology* **47**, 739-763.
- Harrison B D, and Murrant E A.** (1988). Genetic engineering of virus resistance. In *Annual Report Scottish Crop Research Institute (1987)*. pp. 164-166.
- Jones A T, Murrant A F, Jennings D L, and Wood G A.** (1982). Association of raspberry bushy dwarf virus with raspberry yellows disease: reaction of *Rubus* species and cultivars, and the inheritance of resistance. *Ann. Appl. Biol.* **100**, 135-147.
- Jones A T, Mitchell, M J, Jennings D L, and Gordon S C.** (1986). Recent research on viruses and virus-like diseases of *Rubus* in Scotland. *Acta Hort.* **186**, 9-16.
- Lindbo J A, Silva-Rosales L, and Dougherty, W.G.** (1993). Pathogen derived resistance to potyviruses: Working, but why? *Semin. Virol.* **4**, 369-379.
- Loesch-Fries L S, Merlo D, Zinnen T, Burhop L, and Hill K.** (1987). Expression of alfalfa mosaic virus RNA 4 in transgenic plants confers virus resistance. *EMBO J.* **6**, 1845-1851.
- Mayo M A, Jolly, C.A., Murrant A F, and Raschke J H.** (1991). Nucleotide sequence of raspberry bushy dwarf virus RNA-3. *J. Gen. Virol.* **72**, 469-472.
- Mouras A, Saul M W, Essad S, and Potrykus I.** (1987). Localization by in situ hybridization of a low copy chimeric resistance gene introduced into plants by direct gene transfer. *Mol. Gen. Genet.* **207**, 204-209.
- Murrant A F.** (1987). Raspberry bushy dwarf virus. In *Virus Diseases of Small Fruits*. USDA Agriculture Handbook No. 631. pp. 229-234. Edited by R.H. Converse, Washington D.C.
- Murrant A F, Chambers J, and Jones A T.** (1974). Spread of raspberry bushy dwarf virus by pollination, its association with

crumbly fruit and problems of control. *Ann. Appl. Biol.* **77**, 271-281.

**Murant A F, Mayo M A, and Raschke J H.** (1986). Some biochemical properties of raspberry bushy dwarf virus. *Acta Hort.* **186**, 23-30.

**Smith H A, Swaney S L, Parks T D, Wernsman E A, and Dougherty W G.** (1994). Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs: expression, regulation, and fate of nonessential RNAs. *Plant Cell* **6**, 1441-1453.

**Thompson R D, Bartels D, Harberd N P, and Flavell R V.** (1983). Characterization of the multigene family coding for HMW glutenin subunits in wheat using cDNA clones. *Theor. Appl. Genet.* **67**, 87-96.

**Verwoerd C, Dekker B M M, and Hoekema A.** (1989). A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.* **17**, 2362.

**Webster K D., and Barker H.** (1994). *Molecular biological techniques.* Scottish Crop Research Institute Molecular Biological Techniques, Version 1.1., pp 4-11.

**Ziegler A, Natsuaki T, Mayo M A, Jolly C A, and Murant A F.** (1992). The nucleotide sequence of RNA-1 of raspberry bushy dwarf virus. *J Gen. Virol.* **73**, 3213-3218.

# Nuestro *servicio*

la mejor herramienta  
para su laboratorio

PUBLICIDAD ASESORISA Y MANTENIMIENTO

EQUIPOS - ELEMENTOS - REACTIVOS



AM, ASESORIA & MANTENIMIENTO LTDA,  
DIAGONAL 145A No. 34-44 OF. 103  
a.m.ltda@imsap.net.ec



**ASESORIA & MANTENIMIENTO LTDA.**

**R A I N I N**

MICROPIPETAS

**E P P E N N D O R F**

MICROCENTRIFUGAS

**T E C H N E**

HIBRIDIZACION - TERMOCICLADORES

**S A N T A C R U Z**

ANTICUERPO - MARCADORES

**M J R E S E A R C H**

TERMOCICLADORES

**S T R A T A G E N E**

BIOLOGIA MOLECULAR - ELECTROFERESIS