

**ASOCIACIÓN DEL SILENCIAMIENTO POST-TRANSCRIPCIONAL DE
GENES Y LA REACCIÓN DE HIPERSENSIBILIDAD, CON LA
RESISTENCIA TRANSGÉNICA AL VIRUS DE LA HOJA BLANCA DEL
ARROZ (*Oryza sativa* L.)**

Andrea María Garavito Espejo

Universidad de los Andes
Facultad de Ciencias
Maestría en Ciencias-Biología
Bogotá, Enero de 2003

**ASOCIACIÓN DEL SILENCIAMIENTO POST-TRANSCRIPCIONAL DE
GENES Y LA REACCIÓN DE HIPERSENSIBILIDAD, CON LA
RESISTENCIA TRANSGÉNICA AL VIRUS DE LA HOJA BLANCA DEL
ARROZ (*Oryza sativa* L.)**

Andrea María Garavito Espejo

Trabajo para optar al título de Magíster en Ciencias-Biología

Director:

Lee A. Calvert P_HD

Unidad de Virología

Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT

Co-director:

Alfredo Badillo P_HD

Universidad de los Andes

Facultad de Ciencias

Maestría en Ciencias-Biología

Bogotá, Enero de 2003

A mi madre...

Agradecimientos

La autora agradece a todas las personas involucradas con la realización de este trabajo la colaboración prestada, en especial:

Al Doctor Lee Calvert PhD, de la Unidad de Virología del CIAT, por la oportunidad de realizar este trabajo, su apoyo y valiosa guía, sin la cual no hubiera sido posible alcanzar las metas propuestas.

A Iván Lozano MSc. de la unidad de Virología, por la instrucción en las técnicas de laboratorio y los comentarios durante la realización del trabajo.

A Luisa Fory MSc. de la Unidad de Biotecnología, por las provechosas discusiones y la colaboración durante toda la realización de este trabajo.

A Zaida Lentini PhD. de la Unidad de Biotecnología, por su interés y valiosos comentarios.

A Alfredo Badillo PhD. de la Universidad de los Andes, por abrirme las puertas a la realización de este trabajo.

A Mauricio Castaño de la Unidad de Virología, por los comentarios referentes al manuscrito.

A José Arroyave de la Unidad de Virología, por el procesamiento de las muestras y las fotografías en el microscopio electrónico.

A Miriam Cristina Duque del proyecto Arroz, por los análisis estadísticos.

A Cristian Olaya de la Unidad de Virología, por la colaboración en la toma de las fotografías en el microscopio de luz.

A mis compañeros de la Unidad de Virología que de una u otra manera colaboraron en la realización de este trabajo.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

1	OBJETIVOS	1
1.1	Objetivo general	1
1.2	Objetivos específicos	1
2	MARCO TEÓRICO	2
2.1	Arroz	2
2.2	Tenuivirus y RHBV	2
2.2.1	Virus de la Hoja Blanca del Arroz	3
2.3	Resistencia derivada del patógeno	5
2.4	Silenciamiento Post-Transcripcional de Genes	6
2.4.1	Transgenes y silenciamiento	6
2.4.2	Descubrimiento	7
2.4.3	Etapas	9
2.4.4	Genes conocidos implicados en el silenciamiento	11
2.4.5	El silenciamiento mediado por RNA como mecanismo de defensa a virus	13
2.5	Reacción de hipersensibilidad	17
2.5.1	Genes <i>R</i>	18
2.5.2	Genes <i>avr</i>	18

2.5.3	Cascadas de señalización	19
2.5.4	Resistencia sistémica adquirida (SAR)	20
2.6	El ácido salicílico y la resistencia a virus	20
3	MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1	Material vegetal	21
3.2	Inoculación viral	21
3.3	ELISAS	22
3.4	Immunosorbent Electron Microscopy (ISEM)	23
3.5	Extracciones de RNA	23
3.5.1	Extracción de RNA total	23
3.5.2	Extracción de RNA de bajo peso molecular	24
3.6	Electroforesis	25
3.7	Hibridizaciones	26
3.7.1	Transferencias	26
3.7.2	Marcaje de la sonda	26
3.7.3	Pre-hibridizaciones e hibridizaciones	27
3.8	Diseño de primers	28
3.9	Reacciones de PCR	28
3.10	Tinción con Diaminobenzidina	30
4	RESULTADOS	31

4.1	Evaluación de la expresión del transgén	31
4.2	Acumulación del RNA 3 de RHBV en las plantas inoculadas	32
4.3	Extracciones de RNA de bajo peso molecular	34
4.4	Desarrollo de la infección	36
4.4.1	Presencia de partículas virales	36
4.4.2	Evaluación de la presencia de proteínas virales	38
4.4.3	Análisis de la presencia del RNA4 de RHBV en las plantas inoculadas	43
4.4.4	Análisis de RNA de bajo peso molecular	45
4.5	Análisis de las reacciones de hipersensibilidad	48
5	DISCUSIÓN	55
5.1	Expresión del transgén	55
5.2	El silenciamiento y la resistencia	56
5.3	Reacciones de hipersensibilidad	60
5.4	Modelo de la interacción	63
	BIBLIOGRAFÍA	68
	ANEXOS	73

Lista de Figuras

Figura 2.1. Modelo del Silenciamiento mediado por RNA	12
Figura 4.1. Análisis de la expresión del transgén en diferentes edades por Northern blot	32
Figura 4.2. Presencia del RNA3 en plantas 10 días post-inoculación	33
Figura 4.3. Presencia de población basal de RNAs de 21 y 25 nt	34
Figura 4.4. Presencia de RNA de bajo peso molecular derivado del RNA3, 45 días post-inoculación	35
Figura 4.5. Presencia de partículas virales	39
Figura 4.6. Promedio en los diferentes tiempos de las lecturas de DAS-ELISA	42
Figura 4.7. Acumulación del RNA4 a través del tiempo en las plantas inoculadas	44
Figura 4.8. Presencia de los siRNAs a diferentes tiempos post-inoculación	46
Figura 4.9. Reacciones de hipersensibilidad presentes en las plantas transgénicas a través del tiempo	50
Figura 4.10. Presencia de reacciones de hipersensibilidad en la línea 57-5	53
Figura 5.1. Modelo de la interacción RHBV-Planta transgénica	65
Figura C.1. Representación esquemática del genoma de RHBV	77
Figura D.1. Representación esquemática del constructo usado para la transformación de las plantas de arroz	78

Lista de Tablas

Tabla 2.1. Genes implicados en el silenciamiento post-transcripcional en plantas y sus posibles funciones	13
Tabla 2.2. Supresores virales conocidos del silenciamiento post-transcripcional de genes	15
Tabla 4.1. Presencia de partículas virales completas	37
Tabla 4.2. Promedios de las lecturas de DAS-ELISA y sus errores estándar	40
Tabla 4.3. Porcentaje de variación en el promedio del título viral, obtenido por DAS-ELISA	42
Tabla F-1. Datos completos de las lecturas de DAS-ELISA para las plantas evaluadas	80

INTRODUCCIÓN

La finalidad de las técnicas de transformación genética, aplicadas al control de enfermedades virales, es desarrollar plantas con resistencia duradera, de amplio espectro y que requieran de menos tiempo para ser desarrolladas, en comparación con el mejoramiento tradicional. El uso de dichas plantas en la investigación, permite conocer las características de las interacciones que ocurren entre el virus y su planta hospedera.

Sin embargo, las plantas modificadas para resistir infecciones virales y en general los organismos genéticamente modificados, han generado mucha polémica en torno a los posibles riesgos y beneficios que su uso pueda traer. El estudio detallado del mecanismo que media la resistencia a virus en las plantas genéticamente modificadas, para cada caso particular, hace posible eliminar o controlar las posibles fuentes de riesgos (Tepfer, 2002). Además, el conocimiento de los determinantes de la resistencia en las plantas transgénicas puede ayudar al diseño de nuevos plásmidos para transformación (constructos), que reproduzcan dichas características y de esta forma, optimizar la generación de nuevas variedades resistentes.

El silenciamiento mediado por RNA o silenciamiento post-transcripcional de genes (PTGS, por sus siglas en inglés), se evidencia como la ausencia de acumulación de RNA en el citoplasma, debido a la degradación específica de secuencia, sin que haya cambios significativos en el nivel de transcripción. Este fenómeno ha sido reportado en gran variedad de especies de plantas transformadas, incluido el arroz (Pinto *et al*, 1999).

Se ha reportado que la resistencia a virus inducida por transgenes involucra esta respuesta, y por ello se ha llegado a la conclusión que este mecanismo está involucrado en la defensa natural de las plantas frente a los virus (Voinnet, 2001). Recientemente se han asociado pequeñas moléculas de RNA de 21 a 25 nucleótidos con el silenciamiento post-transcripcional, en plantas transgénicas silenciadas y en plantas infectadas con virus, demostrando la asociación del mecanismo con la defensa a estos (Hamilton y Baulcombe, 1999).

Las plantas de arroz transformadas con el gen de la Nucleoproteína del Virus de la Hoja Blanca (RHBV) desarrolladas en el CIAT, presentan ausencia del RNA mensajero y de la proteína codificada por el transgén; además, cuando son inoculadas muestran inmunidad o recuperación de la infección. Dichas características hacen sospechar que la resistencia en estas líneas transgénicas está mediada por RNA (Lentini *et al*, 2003). Adicional a esto, las plantas resistentes presentan lesiones semejantes a reacciones de hipersensibilidad, que aparecen en el lugar donde se ha manifestado la sintomatología.

Con el uso de diferentes metodologías, se pretende encontrar evidencias moleculares que indiquen, si en las plantas transformadas con el gen de la Nucleoproteína de RHBV está ocurriendo el silenciamiento post-transcripcional del transgén, y confirmar la idea de que dicho mecanismo media la resistencia al virus. También se aspira comprobar la presencia de reacciones de hipersensibilidad y su asociación con la resistencia.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

Encontrar evidencias moleculares que permitan inferir el mecanismo que media la resistencia contra el Virus de la Hoja Blanca (RHBV), en plantas de arroz transformadas con el gen de la Nucleoproteína de RHBV.

1.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la variación que sufre la acumulación del producto de la expresión del transgén de la Nucleoproteína en las plantas transgénicas de arroz, en diferentes edades de la planta.
2. Determinar si las plantas transgénicas de arroz presentan silenciamiento post-transcripcional de las secuencias homólogas a la Nucleoproteína del RHBV y detectar si este silenciamiento está correlacionado con la resistencia de las plantas al virus.
3. Comprobar si las reacciones observadas en las plantas resistentes al RHVB corresponden a reacciones de hipersensibilidad.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Arroz

El arroz es una planta Monocotiledónea, perteneciente a la familia *Gramineae*. Los géneros cultivados en el mundo son *Oryza sativa* L. y *Oryza glaberrima* Steud. Se diferencian tres eco-especies, *japónica*, *javánica* e *indica* (Tsunoda y Takahashi, 1984).

El arroz está incluido en la dieta básica de casi la mitad de la población mundial, y de ahí deriva su importancia. En América Latina se producen alrededor de 20 millones de toneladas por año, constituyéndose en el cultivo de cereal para consumo humano más importante. (Sanint y Wood, 1998).

El cultivo del arroz, se ve afectado por diferentes tipos de plagas y enfermedades que pueden reducir los rendimientos. Hongos como *Magnaporthe grisea*, bacterias como *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* y virus como la Hoja Blanca, producen grandes pérdidas en la producción.

2.2 Tenuivirus y RHBV

Los *Tenuivirus* son un grupo de virus de RNA que utilizan la estrategia de ambisentido para codificar sus productos. Los viriones son delgados, con 3 a 8 nm de ancho y longitud variable. Pueden adquirir conformación circular, ramificada o

filamentosa. Están compuestos de Nucleoproteína, asociada a cada una de las moléculas de RNA genómico. Comparten algunas características de organización y expresión del genoma con los *Phlebovirus* y los *Tospovirus*.

El genoma de los *Tenuivirus* es multipartito, y está compuesto por cuatro o cinco segmentos, según la especie. Cada segmento genómico posee complementariedad entre los extremos 3' y 5', a lo cual se deben las conformaciones virales vistas al microscopio (Ramírez y Haenni, 1994). A excepción del RNA1, cada segmento codifica para dos proteínas, cuyos ORFs están localizados en polaridades opuestas, en cada extremo 5' de las cadenas complementarias (Falk y Tsai, 1998).

El rango de hospederos se limita a las plantas y a los insectos que actúan como vectores. Afectan gramíneas, de las cuales los cultivos más importantes son el arroz, el trigo y el maíz. Los *Tenuivirus* son transmitidos por insectos de la familia *Delphacidae*. La transmisión se da en una forma circulativa y propagativa, puede ocurrir paso trans-ovárico del virus en el insecto (Gálvez *et al*, 1961).

La sintomatología general incluye manchas cloróticas entre las venas, que luego se convierten en rayas continuas de variado ancho e intensidad; puede haber una completa decoloración de la hoja, y suele ocurrir necrosis del tejido (Falk y Tsai, 1998). Entre los *Tenuivirus* están, el Virus del Rayado del Maíz (MSpV), el Virus del Rayado del Arroz (RSV) y el Virus de la Hoja Blanca del Arroz (RHBV)

2.2.1 Virus de la Hoja Blanca del Arroz

Es transmitido por el salta-hojas *Tagosodes orizicolus* (Muir) (Gálvez *et al*, 1961). Su genoma tiene aproximadamente 18.000 nucleótidos (nt) (Ramírez *et al*, 1992).

Se obtienen por purificación a partir de partículas virales, cuatro especies de RNA de cadena sencilla de ambas polaridades (ver Anexo C).

El RNA1 tiene aproximadamente 9000 nucleótidos y codifica para la RNA polimerasa putativa del virus (Secuencia parcial, número de acceso AF009569 del GenBank, url: [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) en la cadena complementaria (vcRNA1). El RNA2 tiene 3600 nt, con dos marcos abiertos de lectura (ORFs por sus siglas en inglés), uno en la cadena viral (vRNA2) que codifica para una proteína de 23 Kilodaltons (K) y otro en la cadena complementaria (vcRNA2) cuyo producto es de 94 K (Ramírez *et al*, 1992, De Miranda *et al*, 1996). Ambos ORFs están separados por una región intergénica, rica en Adeninas y Uracilos.

El RNA3 tiene 2300 nt y codifica para dos proteínas, una en la cadena vRNA3 de 23 K, y la Nucleoproteína viral de 35 K, en la cadena vcRNA3 (De Miranda *et al*, 1994). También posee una región intergénica.

El RNA4 posee 1991 nucleótidos y dos ORFs; uno localizado en la cadena vRNA4, cuyo producto es de 21 K, corresponde a la proteína NS4, y otro en la cadena complementaria que codifica para un producto de 31.5 K (Ramírez *et al*, 1993).

El RHBV solo ha sido reportado en América, principalmente en zonas tropicales. Tiene una gran importancia económica debido a las pérdidas que genera en el campo, en la mayoría de los países donde se cultiva arroz en el continente americano (Morales y Niessen, 1985, Morales y Niessen, 1983). Estas pérdidas pueden llegar a variar entre un 25 y un 50 % (Jennings, 1963). Las epidemias ocurren en forma cíclica, con intervalos de 8 a 15 años (Calvert *et al*, 1996).

Existen cultivares con resistencia al virus pero cuando las plantas son infectadas a temprana edad, se ve afectada su productividad de forma significativa. Con el fin de generar fuentes adicionales de resistencia, que complementen a la tradicional, se utilizó la transformación genética. En el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) se introdujo por medio de Biobalística, el gen de la Nucleoproteína de RHBV en plantas de arroz de la variedad susceptible *indica* Cica 8. Al ser enfrentadas al virus, algunas de las líneas obtenidas mostraron inmunidad, pero resultaron ser estériles; otras una reducción en la intensidad de los síntomas a través del tiempo y algunas continuaron siendo susceptibles al virus durante toda su vida. De las líneas obtenidas que mostraban el fenotipo de recuperación, algunas presentaron lesiones locales semejantes a reacciones de hipersensibilidad, constituyéndose en las más resistentes (Lentini *et al*, 2003).

Los análisis de expresión en la planta mostraron que no había acumulación del RNA del transgén detectable con Northern blot, pero sí con RT-PCR. Tampoco la proteína codificada por el gen era detectable, indicando que en las plantas la resistencia está siendo mediada por el RNA.

En la actualidad algunas de estas plantas transgénicas han sido llevadas hasta la séptima generación y evaluadas en su comportamiento frente el virus, tanto en el invernadero como en el campo.

2.3 Resistencia derivada del patógeno

En la búsqueda de plantas con resistencia viral de amplio espectro y más duradera, se han implementado técnicas de transformación genética. Al introducir en el genoma una secuencia derivada del patógeno, se espera interferir el ciclo del

parásito y con ello encontrar resistencia. Casos basados en estos métodos se describen al introducir los genes de proteínas de cápside (CP), proteínas de movimiento (MP) y replicasas virales, en los respectivos hospederos (Beachy, 1997).

La resistencia derivada del patógeno puede estar mediada por el RNA o por proteínas. Entre las interferencias más estudiadas mediadas por proteínas, están las basadas en la replicasa y en la CP. Se cree que las proteínas derivadas del transgén pueden no asociarse con los factores del hospedero y/o saturar los sitios de interacción entre proteínas, afectando el desensamblaje, la replicación y el movimiento viral (Palaukaitis y Zaitlin, 1997; Beachy, 1999).

Ejemplos que involucran la resistencia mediada por RNA son las plantas transformadas con RNAs sub-virales (Harrison *et al*, 1987), debido a la competencia con el virus, y las plantas transformadas con secuencias virales que inducen el silenciamiento post-transcripcional de genes.

2.4 Silenciamiento Post-Transcripcional de Genes

2.4.1 Transgenes y silenciamiento

La expresión de los genes que componen el genoma de las plantas depende de los elementos en *cis* que regulan la maquinaria de transcripción y del lugar en donde se encuentren. No todos los lugares en el genoma proveen el ambiente apropiado para la expresión; por esto, si un transgén se inserta en una región donde no hay transcripción este no se expresará (Matzke y Matzke, 1998, Kumpatla *et al*, 1998).

En algunos casos, los transgenes se insertan en lugares apropiados para su expresión pero son reconocidos por la célula como secuencias extrañas, razón por la cual no se puede llegar a encontrar el producto para el que codifican. Dicho fenómeno causa también, que cualquier secuencia que tenga un grado de homología con la secuencia insertada, experimente el mismo proceso.

El fenómeno anteriormente descrito es llamado silenciamiento y resulta de las interacciones epigenéticas entre las copias de los transgenes o genes endógenos, involucrando un mecanismo basado en homología (Silenciamiento de genes dependiente de homología, HDGS por sus siglas en inglés). Puede ocurrir a dos niveles diferentes, el silenciamiento transcripcional y el silenciamiento post-transcripcional.

El silenciamiento transcripcional de genes (TGS por sus siglas en inglés) se asocia con modificaciones como la metilación de los promotores y cambios en la estructura de la cromatina. Debido a estas, no hay acumulación del RNA mensajero porque se impide la transcripción del gen (Kooter *et al*, 1999).

El silenciamiento post-transcripcional (PTGS por sus siglas en inglés) o silenciamiento mediado por RNA, involucra una degradación del RNA ya sea endógeno o no, de una manera secuencia-específica en el citoplasma, sin que haya disminución significativa en la tasa de transcripción.

2.4.2 Descubrimiento

Se describió por primera vez en plantas transgénicas de petunia con las cuales se pretendía sobre-expresar el gen de la Chalcon-sintasa, involucrado en la síntesis de Flavonoides. Contrario a lo esperado, en vez de aumentar la pigmentación de las flores, estas carecían de ella o mostraban patrones desiguales de coloración. Al

analizar la expresión del gen endógeno y del transgén se encontraron niveles menores del RNA mensajero (van der Krol *et al*, 1990, Napoli *et al*, 1990). El fenómeno, llamado co-supresión (por la “comunicación” entre secuencias lejanas en el genoma), afecta los RNAs derivados del transgén y aquellos de genes endógenos que tienen homología con él.

Posteriormente se determinó que aunque la transcripción del gen se daba a niveles semejantes a los encontrados en plantas no transformadas (de Carvalho Neibel *et al*, 1995), la concentración de su mRNA en el citoplasma era casi imperceptible, debido al incremento en la degradación después de la salida del núcleo (Van Blokland *et al*, 1994).

Mecanismos de silenciamiento mediado por RNA se han descrito en hongos, invertebrados (Plasterk y Ketting, 2000) y en mamíferos (Elbashir *et al*, 2001). El “Quelling” en *Neurospora crassa* y la interferencia de RNA (RNAi) en *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*, han demostrado tener vínculos con el PTGS en plantas, puesto que comparten genes reguladores (Fagard *et al*, 2000) con homología entre ellos y productos o intermediarios de la degradación (Voinnet, 2001).

Los primeros reportes que involucraron al silenciamiento con la resistencia a virus vienen del grupo de trabajo de Lindbo (Lindbo *et al*, 1993 y Dougherty *et al*, 1994). En 1993 describen que al infectar con virus, plantas transgénicas que poseían secuencias derivadas del mismo en su genoma, se induce la recuperación de la infección y la posterior resistencia a re-infecciones. En la actualidad se reconoce al silenciamiento mediado por RNA como el mecanismo de defensa del genoma frente a la invasión de virus y transposones, no solo en plantas sino en general en todos los eucariotas (Plasterk, 2002). Se le compara con el sistema

inmune porque detecta ácidos nucleicos extraños, inicia y amplifica una respuesta específica en contra de ellos.

2.4.3 Etapas

En el mecanismo del PTGS se identifican diferentes fases: iniciación, que se define como el cambio de estado no silenciado a silenciado; mantenimiento, en donde se da una estabilización del estado silenciado; y propagación, mediada por una señal que viaja vía plasmodesmo silenciando el blanco en el tejido sistémico (Meins, 2000).

- **Iniciación**

La iniciación se da cuando la planta reconoce el RNA a degradar e inicia la respuesta. En la actualidad el modelo de iniciación más aceptado (Voinnet, 2001) tiene que ver con la detección de RNA de doble cadena (dsRNA). Este está presente como intermediario de la replicación de los virus de RNA. Puede además, ser sintetizado por RNA polimerasas dependientes de RNA (RdRp por sus siglas en inglés) de la planta (Schiebel *et al*, 1998, Dalmay *et al*, 2000), a partir de templados de RNA con conformación aberrante. En el caso de los transgenes, el dsRNA puede originarse por transcripción de repeticiones invertidas en la secuencia (Sijen y Kooter, 2000). Una vez reconocidos los dsRNAs, son degradados por RNAsas homólogas a DICER, una proteína de la familia de las RNasa III encontrada en *Drosophila* (Bernstein *et al*, 2000). Por esta degradación se generan pequeñas moléculas de RNA de 21 y 25 nucleótidos de ambas polaridades. Dichos RNAs son denominados “pequeños RNAs que interfieren” (siRNAs por su sigla en inglés) (Hamilton y Baulcombe 1999, Hamilton *et al*, 2002).

- **Mantenimiento**

En el mantenimiento persiste la degradación de la secuencia blanco, independiente de si está o no presente la molécula que inició la respuesta (Ruiz *et al*, 1998). Se cree que el mantenimiento involucra la síntesis *de novo* de dsRNA por RdRps a partir de los transcritos nucleares (Vaistij *et al*, 2002). Dichos dsRNAs son luego degradados de igual forma que aquellos producidos por la molécula iniciadora y dan origen a siRNAs (Hamilton *et al*, 2002). Estas pequeñas moléculas sirven como instrumento de retroalimentación, amplificando el mecanismo.

En *Drosophila* se ha descrito la existencia de otro complejo de degradación llamado RISC (*RNA-induced silencing complex*), que se encarga de cortar los RNAs de cadena sencilla con homología a los siRNAs (Hammond *et al*, 2000). No se han encontrado evidencias de la existencia de dicho complejo en plantas ni en otros organismos, estando la degradación del RNA de cadena sencilla mediada por la síntesis de la cadena complementaria por las RdRps de la planta.

Al mantenimiento también se ha asociado la metilación de la secuencia codificante, mediada por interacciones RNA-DNA (Thomas *et al*, 2001). Posiblemente las pequeñas moléculas de RNA de 25 nt, interactúan con el genoma de la planta para inducir la metilación de la secuencia (Thomas *et al*, 2001, Hamilton *et al*, 2002).

- **Propagación**

Dada la especificidad de la degradación, se cree que la señal que viaja a larga distancia propagando el silenciamiento sistémico es un ácido nucleico. El movimiento sistémico desde el lugar de la iniciación del silenciamiento hacia el resto de la planta, ocurre de la misma manera que lo hace el movimiento viral, involucrando paso de célula a célula y translocación por el floema. Además, implica la iniciación de la producción de nueva señal por las células en las que se ha

iniciado el silenciamiento (Fagard y Vaucheret 2000). Haciendo una analogía con la respuesta sistémica adquirida (SAR) se ha denominado la propagación del silenciamiento como silenciamiento sistémico adquirido (SAS) (Jorgensen *et al*, 1998).

La hipótesis que predice la salida de una señal desde el tejido silenciado hacia aquel que expresa la secuencia blanco, ha sido comprobada en estudios con injertos. En ellos, el silenciamiento de un gen endógeno sobre-expresado o de un transgén no silenciado se indujo injertando la planta en una transgénica silenciada (Palauqui y Vaucheret 1998). Las moléculas que posiblemente actúan como mensajeros del silenciamiento son los siRNAs de 25 nt. Su concentración en la planta se ve comprometida en presencia de inhibidores virales del silenciamiento que bloquean el movimiento de la señal sistémica (Hamilton *et al*, 2002).

En la **Figura 2.1** se muestra un posible modelo del mecanismo de acción del silenciamiento mediado por RNA, que resume todas las etapas y proteínas involucradas en este.

2.4.4 Genes conocidos implicados en el silenciamiento

Utilizando técnicas de mutagénesis se han logrado caracterizar diferentes genes, la mayoría de *Arabidopsis*, involucrados de una u otra manera en el silenciamiento mediado por RNA. Algunos juegan un papel en la regulación del mecanismo, mientras otros son necesarios como efectores del silenciamiento. En la **Tabla 2.1** se enumeran los genes conocidos en el PTGS.

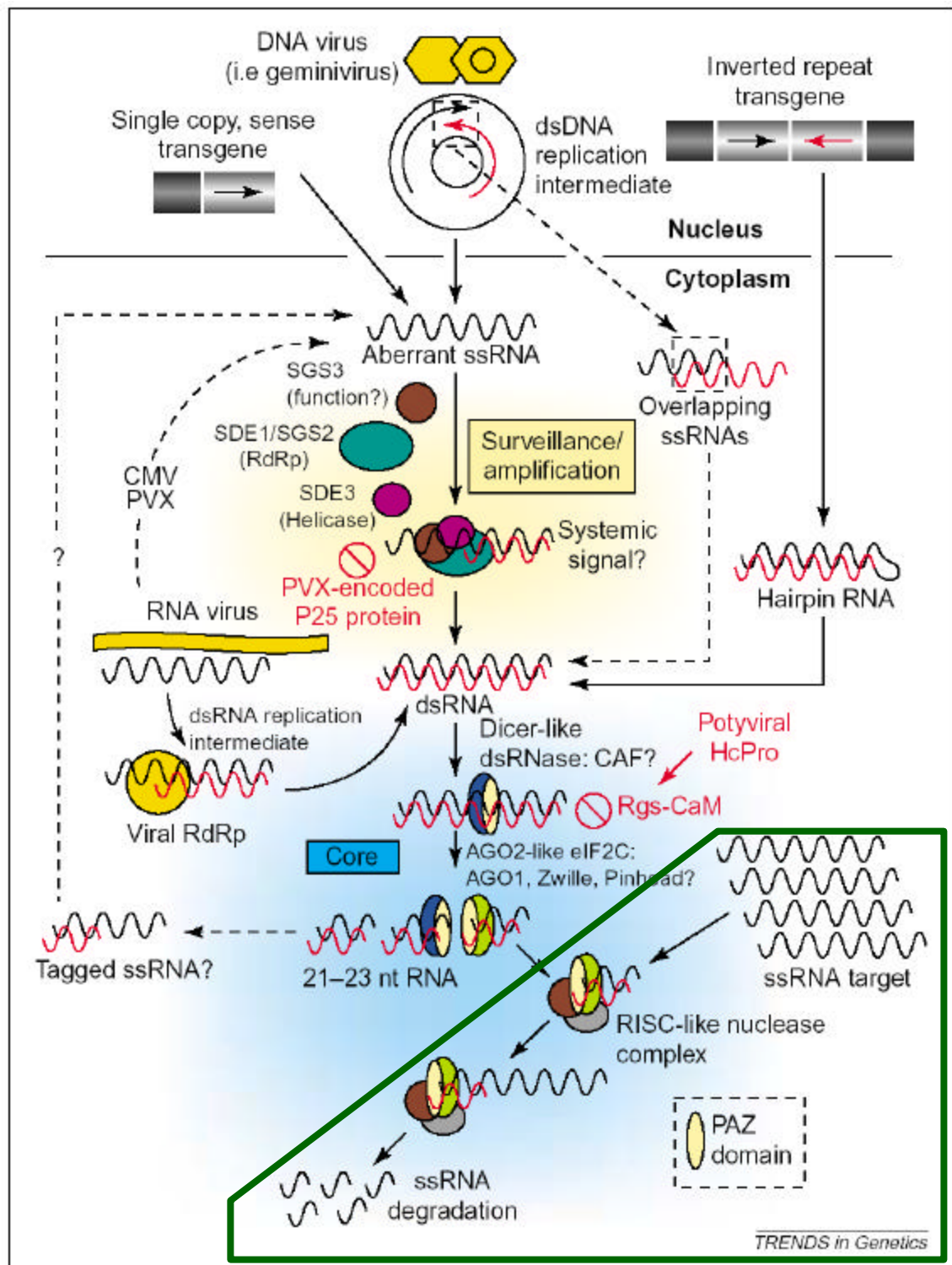


Figura 2.1. Modelo del Silenciamiento mediado por RNA. La parte de la figura contenida en el recuadro verde solo ha sido descrita en el RNAi, las evidencias indican que este proceso no ocurre en plantas (Vaistij *et al*, 2002). Tomado de Voinnet *et al*, 2001.

Tabla 2.1. Genes implicados en el silenciamiento post-transcripcional en plantas y sus posibles funciones

Gen	Planta	Fenotipo mutante	Posible Función
Genes reguladores			
<i>Enhancers of gene silencing (EGS1 y EGS2)</i> ^(a)	<i>Arabidopsis</i>	Aumento en el silenciamiento	Regulador negativo
<i>Regulator of gene silencing-calmodulin-like protein (rgs-CaM)</i> ^(b)	Tabaco	Su sobre-expresión inhibe el silenciamiento	Represor celular
Genes efectores			
<i>Silencing defective (SDE3)</i> ^(c)	<i>Arabidopsis</i>	Pérdida retardada del silenciamiento	Helicasa para RNA
<i>Suppressor of gene silencing (SGS2/SDE1)</i> ^(d)	<i>Arabidopsis</i>	Pérdida total del silenciamiento	RdRp involucrada en el mantenimiento
<i>Argonaute (AGO1)</i> ^(e)	<i>Arabidopsis</i>	Problemas en el desarrollo y fertilidad, pérdida del silenciamiento	RdRp
<i>SGS3</i> ^(f)	<i>Arabidopsis</i>	Pérdida total del silenciamiento	Desconocido, posee dominio para interacción entre proteínas

(a) Dehio y Schell, 1994. **(b)** Anandalakshmi *et al*, 2000. **(c)** Dalmay *et al*, 2001. **(d)** Mourrain *et al*, 2000. Dalmay *et al*, 2000. **(e)** Fagard *et al*, 2000, Morel *et al*, 2002, **(f)** Mourrain *et al*, 2000.

2.4.5 El silenciamiento mediado por RNA como mecanismo de defensa a virus

Desde las primeras asociaciones del silenciamiento mediado por RNA con la resistencia a virus (Limbo *et al*, 1993), se han encontrado evidencias que lo vinculan con la defensa natural de las plantas frente a ellos (Voinnet, 2001).

La incrementada susceptibilidad de los mutantes defectuosos en PTGS a infecciones virales (Mourrain *et al*, 2000; Dalmay *et al*, 2000; Dalmay *et al*, 2001; Morel *et al*, 2002), la existencia de inhibidores virales del silenciamiento (Lucy *et al*, 2000; Voinnet *et al*, 2000; Voinnet *et al*, 1999), la activación de RdRps en dichas infecciones (Xie *et al*, 2001) y otros tipos de interferencia en el ciclo viral, demuestran que este mecanismo tiene un papel importante para su control en las plantas, y en general en eucariotas (Li *et al*, 2002).

- **Inhibidores virales**

Se han descrito proteínas virales inhibidoras del silenciamiento en una gran variedad de virus. Dichos supresores poseen una extensa diversidad tanto en secuencia como en estructura, indicando convergencia evolutiva llamada a contrarrestar esta defensa (Voinnet, 2001).

Muchas de las proteínas se conocían como factores de virulencia requeridos para llevar a cabo una infección exitosa (Brigneti *et al*, 1998). También el fenómeno del sinergismo, que se observa como el aumento de los síntomas en infecciones virales múltiples, era atribuido a dichos factores (Pruss *et al*, 1997). Solo fue posible entender el modo de acción de estas proteínas cuando se conoció el PTGS y la acción que ejercían sobre este.

En la **Tabla 2.2** se enumeran los casos conocidos de dichos supresores y los posibles blancos a los que están dirigidos. Continuamente se reportan mas proteínas virales con acción inhibidora del silenciamiento, indicando la importancia de contrarrestar esta defensa para la patogénesis.

Tabla 2.2. Supresores virales conocidos del silenciamiento post-transcripcional de genes

Proteína inhibidora	Virus	Acción
HC-Pro ^(a)	<i>Potyvirus</i>	Impide a los tejidos sistémicos responder a la señal sistémica, interfiriendo con el mantenimiento. Revierte en tejidos donde se ha establecido La inhibición se da posiblemente por interacción con Rgs-CaM
2b ^(b)	<i>Cucumovirus</i>	Bloquea la señal de larga distancia desde el núcleo, impidiendo el silenciamiento en los nuevos tejidos, pero no lo revierte en donde ya se ha establecido. Interferencia en la vía de defensa de virus dependiente de SA.
p25 ^(c)	<i>Potexvirus</i>	Inhibe la distribución de la señal de larga distancia del silenciamiento, pero no el silenciamiento a escala celular.
P19 ^(d)	<i>Tombusvirus</i>	Previene la distribución de la señal de larga distancia. Se une a los siRNAs.
P15 ^(e)	<i>Pecluvirus</i>	Impide el silenciamiento en los nuevos tejidos, y lo revierte en donde ya se ha establecido.
P1 ^(f)	<i>Sobemovirus</i>	No determinado
AC2 ^(f)	<i>Geminivirus</i>	No determinado

(a) Mallory *et al*, 2001; Anandalakshmi *et al*, 2000. **(b)** Guo y Ding, 2002; Ji y Ding, 2001; Lucy *et al*, 2000. **(c)** Voinnet *et al*, 2000. **(d)** Silhavy *et al*, 2002. **(e)** Dunoyer *et al*, 2002. **(f)** Voinnet *et al*, 1999.

• Inducción de RdRp en las infecciones virales

El grupo de trabajo de Xie en 2001 describió la clonación de *NtRDRP1*, una RdRp de tabaco que es inducida después de la infección con virus o del tratamiento con Ácido Salicílico exógeno. Cuando en las plantas se impide la expresión del gen de *NtRDRP1* se incrementa la susceptibilidad a infecciones virales. En estos estudios no se especifica el papel de dicha RdRp en el PTGS, pero permite sospechar de un entrecruzamiento en la vía de defensa por silenciamiento y la defensa que involucra al Ácido Salicílico.

- **Silenciamiento y su relación con otros tipos de resistencia**

El silenciamiento permite explicar diferentes fenómenos naturales que median la resistencia o la tolerancia a infecciones virales. Desde las primeras descripciones de estos, se han lanzado posibles explicaciones del mecanismo por los cuales ocurren. La competencia por la maquinaria de replicación, metabolitos requeridos y sitios de replicación, son algunas de las posibles interpretaciones. Fenómenos como la protección cruzada, la atenuación de la infección por partículas sub-virales, y la recuperación, son fácilmente comprendidos en función del silenciamiento, entendiendo que puede no ser esta la única explicación posible.

El fenómeno de la protección cruzada, descrito por primera vez por McKinney en 1929, se define como la prevención o retardo de la acumulación de cepas virulentas, por un virus relacionado con menor virulencia (Hull, 2002). En la actualidad se conoce que el mecanismo activo detrás de la protección cruzada en la mayoría de los casos es el PTGS (Ratcliff *et al*, 1997; Ratcliff *et al*, 1999). Sin embargo, no es posible descartar que otros mecanismos estén involucrados en la protección cruzada puesto que existen casos donde se ha demostrado que la resistencia es mediada por proteínas, debido a la interferencia en el desensamblaje viral (Culver, 2002).

Otro tipo de interferencia en la replicación viral que puede ser explicada por el PTGS es la atenuación de los virus ayudadores por sus *Defective Interfering* (DI). Estas moléculas son derivados del genoma viral que han perdido genes esenciales para su ciclo y por esto necesitan al virus del que se originaron para su replicación. Los DI colaboran en la iniciación del silenciamiento pero son poco accesibles a la degradación, impidiendo la acumulación del virus ayudador (Szittyá *et al*, 2002).

El fenotipo de recuperación se caracteriza por la disminución gradual de los síntomas y la acumulación viral, hasta el punto de que la planta queda libre de virus y es inmune a nuevas infecciones del mismo o de otros muy relacionados. Se da naturalmente en plantas infectadas con *Nepovirus* y *Caulimovirus* (Covey *et al*, 1997; Ratcliff *et al*, 1997) e inducido por la presencia de transgenes (Limdbo, 1993). La presencia del virus activa la respuesta del silenciamiento en los primeros tejidos inoculados, impulsa la salida de la señal sistémica e inicia su degradación en los tejidos a donde este llega. Una variación de la recuperación es el fenómeno de islas verdes en donde el tejido infectado es rodeado por tejido sano, libre de virus y resistente a nuevas inoculaciones (Jorgensen *et al*, 1998). Las islas verdes surgen de la activación del silenciamiento en contra del virus de manera local, sin que la señal sistémica viaje largas distancias (Moore *et al*, 2001).

2.5 Reacción de hipersensibilidad

La reacción de hipersensibilidad (HR) es una rápida muerte celular programada (PCD por sus siglas en inglés), dentro o alrededor del lugar de la infección (Lam *et al*, 2001). Se puede observar a simple vista como una lesión de color café y bordes definidos, si suficientes células mueren. Además de la muerte celular, se da la expresión de genes de defensa para restringir al patógeno (Heath, 2000). Ocurre generalmente cuando el producto de un gen de resistencia (*R*) de la planta se encuentra con el correspondiente gen de Avirulencia (*avr*) del patógeno, en la llamada interacción gen por gen.

2.5.1 Genes *R*

Se encuentran organizados en *clusters* en el genoma de la planta. Poseen dominios comunes característicos involucrados en la interacción proteína-proteína, proteína-ácido nucleico o en la cascada de señalización. Se pueden reconocer cinco clases según sus características (Martín, 1999). Protein-quinasas intracelulares; Protein-quinasas semejantes a receptores, con un dominio extracelular de repeticiones ricas en leucina (LRR); proteínas intracelulares con LRRs, sitios de unión a nucleótidos (NBS) y motivos de zipers de leucina (LZ); proteínas intracelulares NBS-LRR con regiones similares a las proteínas Toll y al receptor de la Interleuquina 1 (TIR); y proteínas LRR extracelulares unidas a membranas. Los dominios NSB, quinasa y TIR pueden cumplir funciones de señalización, mientras que los LRR y LZ pueden ser dominios para la interacción y reconocimiento entre proteínas (Bent, 1996; Martín, 1999; Hammond-Kosack y Jones, 1997).

La localización celular de los productos de los genes de resistencia depende del lugar donde el patógeno se aloja o del lugar en donde se secreta sus productos. En la mayoría de los casos, el reconocimiento de bacterias y virus se da en el citoplasma, mientras que para los hongos se da en el apoplasto (Martín, 1999).

2.5.2 Genes *avr*

Los genes *avr* no poseen una estructura específica. Pueden ser productos requeridos para la patogénesis, factores de virulencia, proteínas estructurales, enzimas o cualquier otro producto del patógeno que la planta reconoce (Alfano y Collmer, 1996). En el caso de los hongos, péptidos secretados al apoplasto actúan como factores de avirulencia (Wit y Joosten, 1999). Para las bacterias, además del producto del gen *avr* se requiere la secreción de este en el citoplasma. Dicha

función es llevada a cabo por los genes *hrp* (por *hypersensitive reaction and pathogenesis*), que codifican para la maquinaria del sistema de secreción tipo III (Bonas y Van den Ackerveken, 1999). En el caso de los virus, la proteína de cápside, la replicasa o la proteína de movimiento han sido señaladas como determinantes de avirulencia (Hull, 2002).

2.5.3 Cascadas de señalización

Después del reconocimiento del patógeno se activa una cascada de señalización encaminada a detener al invasor. Dicha cascada de señalización incluye la producción de radicales oxidativos (ROS por sus siglas en inglés), Ácido Salicílico (SA), etileno y Óxido Nitroso (NO).

Los radicales oxidativos como el $O_2^{\cdot-}$ y el Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) hacen parte de una reacción en cadena auto-perpetuante, involucrada en la señalización. Ocurren dos explosiones oxidativas, la primera de duración limitada, a pocos minutos del reconocimiento del patógeno y la segunda a las pocas horas y de mayor duración, suficiente para producir señal y desencadenar posteriores reacciones (Lamb y Dixon, 1997). Esta última explosión es exclusiva de las interacciones incompatibles, mientras que la primera ocurre generalmente con la entrada de patógenos (interacción compatible).

También se da un aumento en la producción de SA a partir de la vía de Fenilpropanoides. Este ácido tiene diferentes papeles en la regulación de la resistencia, sobre todo en la llamada resistencia sistémica adquirida (SAR por su sigla en inglés) y en la transcripción de los genes *Pathogenesis-Related* (PR). Dichos genes son en su mayoría, compuestos con acción antibacteriana y antifúngica como las quitinasas y glucanasas (Hammond-Kosack y Jones 1996).

Además del aumento de estos compuestos, se requiere la apertura de canales iónicos y la activación de proteínas de señalización.

2.5.4 Resistencia sistémica adquirida (SAR)

La activación de una HR induce una respuesta sistémica que le confiere a la planta mayor resistencia de amplio espectro a ataques posteriores. Señalizada por el SA, la llamada resistencia sistémica adquirida (SAR) se caracteriza por la fuerte inducción de los genes PR, encaminados al control de hongos y bacterias (Ryals *et al*, 1996).

2.6 El ácido salicílico y la resistencia a virus

En la resistencia a virus se ha descrito otra vía que involucra el SA, independiente de aquella dirigida a desencadenar HR, expresión de PRs y SAR. En una HR iniciada por una infección viral, la muerte celular no es la única razón por la que se localiza el virus. Al parecer, el SA activa una vía de traducción de señales que involucra a la Oxidasa Alternativa mitocondrial, componente de la vía alterna de respiración de la planta (Chivasa *et al*, 1997). La interferencia depende del tipo de célula infectada (Murphy y Carr, 2002; Naylor *et al*, 1998), se da en la replicación y en el movimiento entre células y a larga distancia. Recientemente se describió que la proteína 2b del *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) inhibidora del silenciamiento post-transcripcional, suprime también este tipo de defensa mediada por SA en algún componente compartido de las vías (Ji y Ding 2001). Este hecho, y que las RdRps se activen con la aplicación de SA exógeno (Xie *et al*, 2001) indican una estrecha relación entre los dos mecanismos de resistencia a virus, siendo el SA potenciador de ambas respuestas.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Para los ensayos se utilizaron el control susceptible no transgénico *O. sativa* L. *indica* cv Cica 8 y cuatro líneas transgénicas derivadas de este (Lentini *et al*, 2003). Las líneas A3-49-60-12-3-3-57-5 (57-5) y A3-49-60-19-12-6 (12-6) presentan disminución en los síntomas de la enfermedad a través del tiempo y lesiones semejantes a reacciones de hipersensibilidad, mientras que la A3-49-60-12-3-1-31-4 (31-4) y A3-49-60-7-26-3 (26-3) muestran síntomas durante toda su vida. Las líneas transgénicas 57-5 y 31-4 representan la séptima generación desde la introducción del transgén, mientras que las restantes la quinta. Las plantas fueron mantenidas en invernadero.

3.2 Inoculación viral

Plantas de 10 a 21 días fueron inoculadas con el Virus de la Hoja Blanca mediante los insectos vectores de la colonia mantenida en el CIAT. Para esto se colocaron junto con la planta, dentro de un cilindro de polipropileno cerrado en la parte superior con una malla, tres a cuatro ninfas virulentas de *T. orizicolus* del 2º o 3º instar, para asegurar una alta dosis del virus. Pasados 5 días los insectos fueron retirados. Como controles negativos se enfrentaron plantas bajo las mismas condiciones, a vectores libres de virus.

Cuando se necesitaba inocular un número elevado de plantas, estas eran colocadas con los insectos dentro de una jaula de malla.

3.3 ELISAS

La presencia del virus en plantas inoculadas y los controles sanos fue evaluada por ELISAS de Doble sándwich de anticuerpo (DAS-ELISA) (Clark y Adams, 1977). Para los análisis siempre se utilizó la parte media de la hoja más joven de la planta, independiente de la presencia de síntomas. Se analizaron plantas de las líneas C8, 57-5 y 31-4, a los 13, 27 y 41 días post-inoculación.

Las placas de Poliestireno (Dynex) fueron recubiertas colocándolas a 37°C durante 4 horas, con una dilución 1/3000 (v/v) del anti-RHBV IgG (Morales y Niessen, 1983) en buffer de cubrimiento (Carbonato de Sodio 0,05 M pH 9,8). El tejido fue macerado 1/400 (w/v) en buffer de muestras (Buffer Fosfato Salino -PBS- 0,15 M pH 7,4, Tween 20 0,05 % y Polivinil-pirrolidona 40,000 al 2 %) y agregado a la placa de microtitulación cubierta con el anticuerpo. Después de incubar la placa a 4 °C *over night* (ON), se agregó el conjugado marcado con Fosfatasa alcalina, diluido 1/4000 (v/v) en buffer de muestra con Ovoalbúmina al 0,2 %. Después de cada paso la placa se lavó en PBS-Tween (PBS 0,15 M pH 7,4 y Tween 20 0,05 %) con cuatro cambios de buffer a intervalos de 3 minutos. Las lecturas se hicieron a 405 nm, con el MRX Microplate Reader (Dinex) a los 20 minutos de agregar el sustrato de la Fosfatasa alcalina (1 mg/mL de p-Nitrofenil di-sodio Fosfato en buffer de Dietanolamina al 10 % pH 9.8).

3.4 Immunosorbent Electron Microscopy (ISEM)

Para la observación de las partículas virales se utilizó la técnica de ISEM a los 13, 27 y 41 días post-inoculación a una planta de las líneas C8, 57-5 y 31-4. Como control negativo se utilizó una planta de la línea resistente sana.

La muestra se homogenizó en Buffer Fosfato 0,01 M pH 6,5. Sobre una gota del macerado se colocó una rejilla previamente recubierta con el anticuerpo específico diluido 1:1000 en el buffer Fosfato, y se incubó a 4 °C, durante 20 minutos. Para la observación la rejilla se tiñó con Acetato de Uranilo al 2 % (Christie *et al*, 1987).

3.5 Extracciones de RNA

Para las extracciones de RNA se colectó material de varias plantas hasta completar el peso necesario para la extracción. La concentración de los productos obtenidos en las extracciones de RNA total y de bajo peso molecular, fue calculada basado en la OD_{260nm}. Su pureza se estimó por la relación OD_(260/280nm). Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Beckman DU-50.

3.5.1 Extracción de RNA total

Para la extracción de RNA total se utilizó el kit RNAeasy de Qiagen, partiendo de 100 mg de tejido macerado en nitrógeno líquido. Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante, utilizando como buffer de lisis el RLT.

También se utilizó la fracción correspondiente al RNA total, remanente de los protocolos para separación del RNA de bajo peso molecular.

3.5.2 Extracción de RNA de bajo peso molecular

La purificación de RNA de bajo peso molecular se realizó utilizando dos métodos diferentes. Precipitación con cloruro de litio (Papaefthimiou *et al*, 2001) y cromatografía de intercambio iónico con el kit Qiagen RNA/DNA system (Hamilton y Baulcombe, 1999).

- **Extracción por cloruro de Litio**

Se partió de 2 a 3 gramos de tejido macerado en nitrógeno líquido, homogenizado en 7 mL de buffer TEMS (Tris-HCl pH 7,5 100 mM, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM con β -Mercaptoetanol 100 mM) junto con 3 volúmenes de Fenol-Cloroformo (Para 500 g de Fenol, 150 mL de buffer TEMS, 0,5 mg de Hidroxiquinolina y 125 mL de Cloroformo). La fase acuosa se separó por centrifugación. El sobrenadante se extrajo de nuevo una vez con Fenol-Cloroformo y otra con Cloroformo-Alcohol Isoamílico 24:1. Posteriormente se aumentó la concentración de sodio a 200 mM con Acetato de Sodio pH 5,6 para precipitar los ácidos nucleicos con 2,5 volúmenes de Etanol absoluto, 4 horas a -20°C. Después de centrifugar, el precipitado fue resuspendido en agua y calentado a 58 °C por 5 minutos. Se agregó Cloruro de Litio a una concentración final de 8 M y la mezcla se dejó en agitación ON a 4 °C. El RNA de alto peso molecular se precipitó por centrifugación y se guardó para posteriores análisis, quedando en el sobrenadante el RNA de bajo peso molecular y el DNA. Un segundo ciclo de precipitación con Cloruro de Litio se llevó a cabo durante 6 horas. Ambos sobrenadantes fueron colectados y precipitados con 2,5 volúmenes de Etanol absoluto y lavados con Etanol al 70 %.

El precipitado obtenido se secó y resuspendió con agua tratada con DEPC. Para proteger el producto, 1 U de RNase out (Invitrogen) fue adicionada.

- **Extracción por cromatografía de intercambio iónico**

Utilizando 1 a 2 gramos de tejido macerado en nitrógeno líquido, homogenizado en 2 volúmenes de buffer de extracción (NaCl 0,1 M, SDS 2 %, Tris-HCl pH 9,0 50 mM, EDTA 10 mM, β -Mercaptoetanol 20 mM) y 3 volúmenes de Fenol, se realizó la separación de los ácidos nucleicos de las muestras. La fase acuosa fue extraída de nuevo con fenol y centrifugada a 1000 G por una hora en un Centricon-100 (Amicon). El filtrado que se obtiene, en donde se encuentra la población de RNA de bajo peso molecular, fue pasado por las columnas del kit RNA-DNA system de Qiagen, siguiendo el protocolo para extracción de LMW RNA descrito por el fabricante. Una unidad de RNase out (Invitrogen) fue adicionada al producto final.

3.6 Electroforesis

Todas las electroforesis en Agarosa se llevaron a cabo bajo condiciones estándar (Sambrook *et al*, 1989) y se visualizaron con Bromuro de Etidio 0,5 μ g/mL. Para las extracciones de RNA total, una concentración determinada se corrió siguiendo protocolos estándar para geles de Agarosa con Formaldehído o en condiciones no-denaturantes en buffer TAE 1 X (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8,0). Los productos de PCRs se visualizaron en Agarosa con buffer TBE 1 X (90 mM Tris-Borato, EDTA 1 mM pH 8,0). EL RNA de bajo peso molecular fue separado bajo condiciones denaturantes en geles de Poliacrilamida (Acrilamida 14,5 %, N, N'-Metilenbisacrilamida 0,5 % TBE 0,5 X, Úrea 7 M) utilizando como buffer de carga Formamida al 95 %, Azul de Bromofenol 0,05 %, Xilen Xianol 0,05 % y EDTA 20 mM pH 8,0. La electroforesis se llevó a cabo a 280 V por 3 horas.

3.7 Hibridizaciones

3.7.1 Transferencias

Todos los geles de Agarosa fueron transferidos ON por capilaridad, a membrana de Nylon Hybond N+ (Amersham) (Sambrook *et al*, 1989). Aquellos que fueron corridos con Formaldehído se transfirieron en SSC 20X (NaCl 3 M, Citrato de Sodio 0,3 M pH 7,0). Para los geles de RNA corridos en condiciones no denaturantes, la transferencia se realizó en SSC 10 X después de ser denaturados 30 minutos en NaOH 0,5 M, NaCl 0,15 M y neutralizados en una solución con Tris-HCl 0,1 M pH 7.5 y NaCl 0,15 M (Ramírez *et al*, 1993). La transferencia de los geles de Poliacrilamida fue realizada en el TransferBlot de Bio-Rad en TBE 0.5 X a 40 voltios por una hora (Llave *et al*, 2000). Para todos los casos las muestras se fijaron por UV en el Stratalinker (Stratagene) utilizando 1200μJ.

3.7.2 Marcaje de la sonda

- **Marcaje por *Random primers***

El templado para la sonda de hibridización se obtuvo por PCR a partir del vector de transformación de la Nucleoproteína de RHBV (pVR3)(Lentini *et al*, 2003), con los primers *forward* RHB3-11 y *reverse* RHB3-1375 diseñados para este fin (ver numeral 3.8). El marcaje se realizó con radioactividad. Se utilizó según las especificaciones del fabricante, el kit Multiprime DNA labeling system (Amersham), que incorpora [α -³²P] dATP por reacción de *Random primers*. Después de la

reacción de marcaje la sonda fue limpiada utilizando el kit DNA Clean-up de Promega.

- **Marcaje por transcripción *in vitro***

Sondas de RNA (*Riboprobes*) específicas para el RHBV fueron obtenidas por síntesis *in vitro* de RNA en presencia de [α -³²P] CTP. Se utilizó el kit Riboprobe system (Promega). Las reacciones de transcripción se realizaron a partir del clon del RNA4, R4-26 (Ramírez *et al*, 1993), partiendo de 0,5 µg de plásmido linearizado con *EcoRI*, en presencia de la RNA polimerasa T7.

3.7.3 Pre-hibridizaciones e hibridizaciones

La pre-hibridización para todos los filtros se realizó por lo menos durante cuatro horas, siguiendo procedimientos estándar (Sambrook *et al*, 1989). La hibridización ON, se hizo en la misma solución y temperatura, al agregar la sonda previamente marcada.

Para los filtros de RNA total hibridizados con sondas marcadas por *Random primers*, la pre-hibridización se realizó en SSC 5 X, SDS 0,5 %, Denhardt's 7,5 X, y 100 µg/mL de DNA de esperma de salmón, a 50 °C. Aquellos filtros de RNA total hibridizados con *Riboprobes*, se pre-hibridizaron en Formamida 50 %, SDS 1 %, SSC 3 X, Buffer fosfato 50 mM pH 7,5 y DNA de esperma de salmón 100 µg/mL, a 37°C.

La pre-hibridización de las membranas con los RNAs de bajo peso molecular se realizó en Formamida al 50%, Denhardt's 10X, DNA de esperma de salmón 0.5 mg/mL, SDS 1% (v/v), SSC 3 X y Buffer fosfato 50 mM pH 7,5, a 35°C (Llave *et al*, 2000).

Los lavados fueron hechos con SDS y SSC a diferentes concentraciones y temperaturas, que dependieron de la señal emitida por las membranas.

Para las membranas con los RNAs de bajo peso molecular, se hicieron a 42 °C en 0,5 X SSC y 0,2 % SDS.

La detección se realizó al exponer las películas XOMAT (Kodak) al filtro, por tiempos que variaron dependiendo de la radiactividad detectada. La exposición se hizo a -70 °C entre pantallas intensificadoras. El revelado de las películas se hizo manualmente utilizando el revelador y fijador Kodak GBX.

3.8 Diseño de primers

Con el fin de obtener una sonda de DNA, equivalente a toda la secuencia del RNA3 introducida en el transgén, se diseñaron nuevos primers. El diseño fue realizado utilizando el programa disponible en Internet Primer 3 (url: http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi/). Se introdujo la totalidad de la secuencia derivada del RNA3 en el programa, especificando que la longitud del fragmento amplificado fuera mayor a 1320. Las secuencias de primers resultado del diseño se denominaron RHB3-11 (5' ATCATCAAGCAAGAGTGGTTTCTGA 3') y RHB3-1375 (5'GAAAAATCTTGTAATATGTAAATACTC 3').

3.9 Reacciones de PCR

Para la detección de la expresión del transgén se utilizó RT-PCR y PCR anidado. Las amplificaciones se realizaron utilizando el programa AT-56 (Lentini *et al*, 2003). El cDNA para el RT-PCR se obtuvo por transcripción reversa, a partir de una

concentración conocida del RNA extraído. Para la reacción se utilizaron los primers *forward* SK (5' CGCTCTAGAACTAGTGGATC 3') (Stratagene) y *reverse* 10 (5' CTCAAATAGCAAGTACATGG 3') (Lentini *et al*, 2003) a una concentración final de 0,3 mM, Buffer First strand (Invitogen) 1 X, 0,4 mM dNTPs, DTT 3 mM y 200 U de la Transcriptasa reversa Superscript II (Invitogen). 2,5 µL del cDNA se utilizaron en una primera reacción de PCR con los mismos primers, a una concentración final de 1,2 mM, dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 2 mM, buffer de PCR 1 X y Taq polimerasa.

Para el PCR anidado se utilizó 1µL del RT-PCR y siguiendo el mismo programa, se amplificó utilizando los primers *forward* 4 (5' CAGGGGTACTGGGTTTGTCTAG 3') y *reverse* 7 (5' GGCTTCTAGCCTTCTTCTTCTG 3') (Lozano I., comunicación personal).

El templado para la síntesis de sonda de DNA se obtuvo por amplificación con PCR a partir de plásmido diluido pVR3, utilizando los primers que amplifican la totalidad de la secuencia del transgén derivada del virus, *forward* RHB3-11 y *reverse* RHB3-1375, a una concentración final de 1,2 mM, dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 2 mM, buffer de PCR 1 X y Taq polimerasa. El programa utilizado fue el VR3-56, diseñado para este fin, que consiste en 94°C por 1 minuto, 56 °C por 2 minutos, 72 °C por 2 minutos y 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto, con una última extensión de 72 °C por 5 minutos.

Utilizando el mismo programa se obtuvo el control positivo para las hibridizaciones, bajo las mismas condiciones, utilizando los primers, *forward* SK (Stratagene) y *reverse* 10 (Lentini *et al*, 2003).

3.10 Tinción con Diaminobenzidina

Para la detección de Peróxido de Hidrógeno como indicador de las reacciones de hipersensibilidad, se utilizó el protocolo descrito por Thordal-Christensen *et al*, en 1997. Para los análisis se tomaron las hojas más jóvenes, 27 días después de la inoculación; y como comparación, se analizó una hoja de la línea 57-5 en donde las reacciones eran visibles a simple vista.

Un fragmento de la hoja a analizar se sumergió en una solución de Diaminobenzidina-HCl 1 mg/mL pH 3,8, por 8 horas a 37 °C, en agitación. El tejido fue luego clarificado por ebullición en Etanol al 96 %. La observación se hizo en microscopio de luz, colocando el tejido en el mismo Etanol. La reacción positiva se observa como una coloración rojiza-café.

4 RESULTADOS

4.1 Evaluación de la expresión del transgén

En plantas transformadas genéticamente se puede presentar silenciamiento de genes dependiente de homología (HDGS) a nivel transcripcional (TGS) o post-transcripcional (PTGS). Una de las diferencias entre ellos es que el TGS es heredado en la meiosis mientras que el PTGS no, por lo que debe ser reiniciado en cada generación (Elmayan y Vaucheret, 1996). En ocasiones es posible detectar alta expresión del transgén en plántulas jóvenes, antes de que sea silenciado post-transcripcionalmente de una forma gradual. Por esta razón se investigó si en algún momento temprano en el desarrollo de la planta hay expresión detectable del transgén.

No es posible detectar la expresión del transgén por Northern blot en ninguna de las líneas investigadas, en plantas de 2 a 14 días de edad (**Figura 4.1**). El experimento se repitió con plantas de 2 a 12 días y los resultados fueron los mismos. Para las plantas de 5 y 10 días, en experimentos independientes, se determinó la expresión por RT-PCR y PCR anidado. En ambos tiempos fue posible encontrar expresión con esta técnica en las diferentes líneas, mas no es posible establecer comparaciones.

Lo observado anteriormente indica que el transgén no alcanza un nivel detectable con Northern, aún ocurriendo la reiniciación del silenciamiento. Sin embargo, la imposibilidad de detectar mayor expresión en las primeras etapas de desarrollo no

es suficiente para descartar el silenciamiento post-transcripcional, puesto que los posibles cambios en la acumulación del transcrito derivado del transgén, pueden no ser detectados por la técnica utilizada.

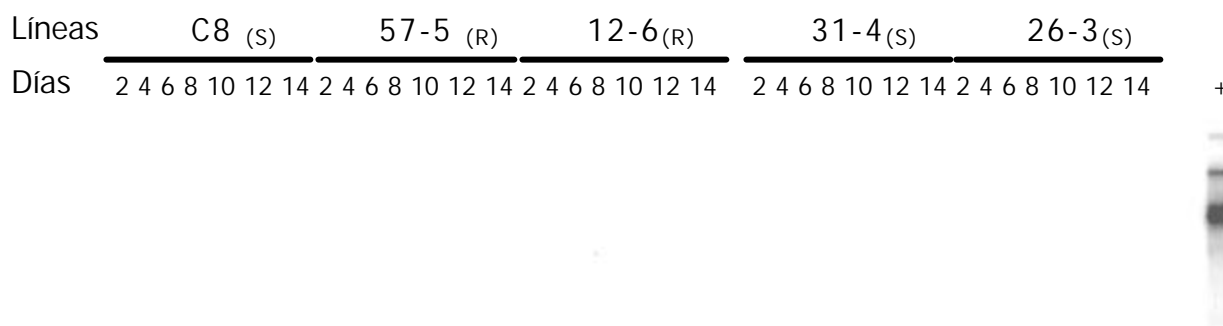


Figura 4.1. Análisis de la expresión del transgén en diferentes edades por Northern blot. En cada pozo del gel denaturante se colocó 9 µL del producto de la extracción. La sonda es un producto de PCR equivalente a la secuencia de la Nucleoproteína de RHBV. El tiempo de exposición fue de 25 días. Iguales resultados se obtuvieron con 60 días de exposición. El control positivo (+) de la hibridización es una dilución del plásmido pVR3. (S) susceptible, (R) resistente.

4.2 Acumulación del RNA 3 de RHBV en las plantas inoculadas

En las plantas de arroz transformadas con el gen de la Nucleoproteína de RHBV, no es posible detectar con Northern el RNA derivado del transgén en ninguna de las edades estudiadas (**Figura 4.1**). Cuando estas plantas son inoculadas, todas las líneas presentan síntomas pero las líneas resistentes se recuperan. Ambos fenómenos se dan de una forma semejante a lo observado cuando ocurre la resistencia mediada por RNA (Covey *et al*, 1997).

Para determinar si se da interferencia en la acumulación del RNA3 de RHBV en la planta, de igual forma que se impide la acumulación del RNA del transgén, se realizó un Northern blot con RNA total de plantas 10 días post-inoculación.

Solo es posible encontrar la presencia del RNA3 y sus derivados, en las líneas transgénicas susceptibles (31-4 y 26-3) y en el control no transgénico (C8) (**Figura 4.2**).

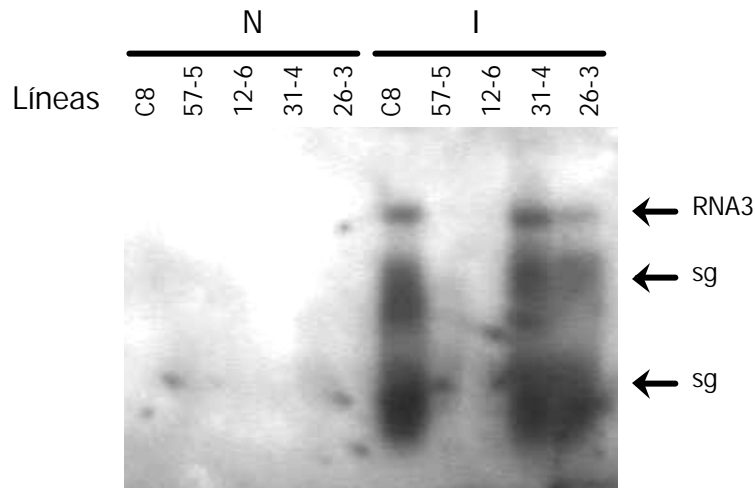


Figura 4.2. Presencia del RNA3 en plantas 10 días post-inoculación. Northern blot de plantas de 20 días de edad inoculadas (I) y sus controles no inoculados (N). 9 µL de RNA total remanente de la centrifugación con Centricon (Amicon) se corrieron en un gel de Agarosa en condiciones no denaturantes. La sonda usada es un producto de PCR. El tiempo de exposición fue de 27 días. (sg) RNA subgenómico. Las líneas resistentes corresponden a la 57-5 y 12-6.

La falta de acumulación del RNA3 en las plantas resistentes indica que hay una rápida acción en estas líneas frente al virus. Se impide la acumulación de este segmento genómico y sus derivados, desde poco tiempo de iniciada la infección. Sin embargo, no es claro si la interferencia en la acumulación es exclusiva para el RNA3 o si por el contrario, el impedimento se da para todos los componentes del virus por igual.

4.3 Extracciones de RNA de bajo peso molecular

Para determinar si en la resistencia transgénica del arroz al RHBV está involucrado el silenciamiento post-transcripcional de genes, se trató de detectar la presencia de RNAs de 21 a 25 nucleótidos, presentes en todos los casos de silenciamiento mediado por RNA (Hamilton y Baulcombe, 1999).

Si la concentración de RNA en la extracción es alta, se puede observar con Bromuro de Etidio a simple vista la población de RNAs de 21 y 25 nt (Figura 4.3). Esto indica que al igual que en *Arabidopsis* (Llave *et al*, 2002) en el arroz, y muy posiblemente en otras monocotiledóneas, hay también un sistema de regulación temporal de la expresión de genes y de defensa del genoma mediado por dichas moléculas.

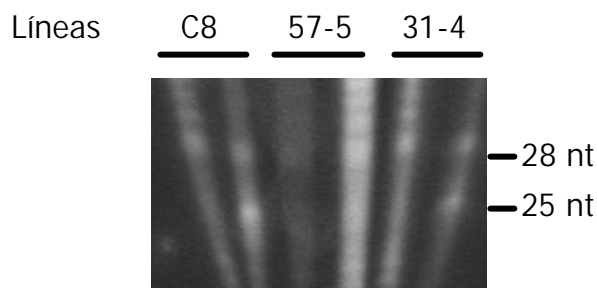


Figura 4.3. Presencia de población basal de RNAs de 21 y 25 nt. Gel de las extracciones de RNA de bajo peso molecular, visualizado con Bromuro de Etidio. En el se observa la presencia de las moléculas de RNA de 21 y 25 nt en las diferentes líneas. Para comparación de tamaño se corrieron primers de 25 y 28 nt, que migran de forma equivalente al RNA de dichos tamaños (Hamilton *et al*, 2002).

Con el fin de encontrar los siRNAs derivados del transgén y del virus, se utilizó material en donde ya se ha dado la resistencia y por ende ya se ha activado la respuesta a nivel sistémico (Plantas con dos meses de edad y 45 días post-inoculación). Con dos metodologías diferentes se detectó la presencia de un RNA

viral cuyo tamaño aproximado se calcula en 60-70 nt, por comparación con la distancia de migración del tRNA (~70 nt) (**Figura 4.4**). No fue posible en estas extracciones visualizar los RNAs de 21 a 25 nt.

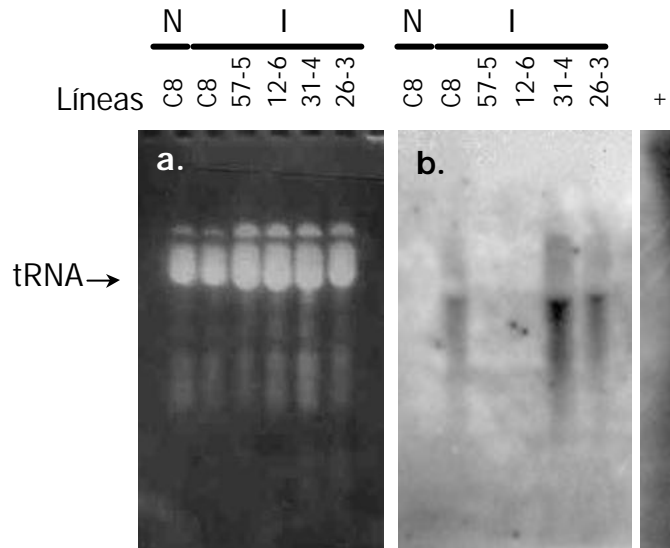


Figura 4.4. Presencia de RNA de bajo peso molecular derivado del RNA3, 45 días post-inoculación. Gel de Poliacrilamida con productos de la extracción de RNA de bajo peso molecular por el método de Hamilton y Baulcombe. En promedio se colocaron 25 µg de RNA. **(a)** Gel teñido con Bromuro de Etidio en donde se observa el tRNA. **(b)** Northern blot. La sonda usada es un producto de PCR. El tiempo de exposición fue de 4 días. El control positivo (+) es un producto de PCR. (N) No inoculado, (I) Inoculado. Las líneas resistentes corresponden a la 57-5 y 12-6.

Iguales resultados se obtuvieron en extracciones realizadas a partir del mismo material descrito en la **Figura 4.2**, pero en este caso la cantidad en que están presentes las moléculas virales de 60-70 nt es aparentemente menor que en las plantas de más de 45 días de inoculadas. No se detectaron los siRNAs derivados del RNA3.

La dificultad de detección de los siRNAs derivados del RNA3, puede ser indicativa de que en arroz, no es necesaria la presencia de concentraciones altas para mediar el silenciamiento. Es posible que estén distribuidos heterogéneamente en la planta,

o que no estén presentes en concentraciones detectables, durante todo el desarrollo (ver numeral 4.4.4), y por ello, ocurra un efecto de dilución al extraerlos a partir de toda la planta. Estas pequeñas moléculas no han sido reportadas en monocotiledóneas, pero la presencia de poblaciones de dichos tamaños (**Figura 4.3**) indican que si son producidas.

4.4 Desarrollo de la infección

Para realizar una comparación del desarrollo de la infección y la respuesta de la planta, se estableció a través del tiempo la dinámica de la infección. Como material vegetal se seleccionaron plantas de las líneas transgénicas 57-5 y 31-4, inoculadas a los 21 días de edad. Las hojas analizadas surgieron después de haber sido retirados los insectos vectores, por lo cual el virus llegó a ellas por movimiento vía plasmodesmo y floema.

Buscando un análisis más completo se determinó la presencia de partículas virales, proteínas y RNA viral y de bajo peso molecular. Todas las lecturas fueron realizadas a los 13 días cuando algunas plantas empiezan a mostrar síntomas, a los 27 y 41 días post-inoculación (d.p.i.). Siempre se analizó la hoja más joven completamente elongada.

4.4.1 Presencia de partículas virales

La proteína codificada por el ORF localizado en la cadena vcRNA3 de RHBV es la Nucleoproteína, encargada de ensamblar las partículas virales alrededor de las moléculas de RNA genómicas (De Miranda *et al*, 1994). Como en las plantas resistentes transformadas con dicho gen hay interferencia en la acumulación del

RNA3 y sus derivados (**Figura 4.2**), se espera una disminución o ausencia del ensamblaje de partículas.

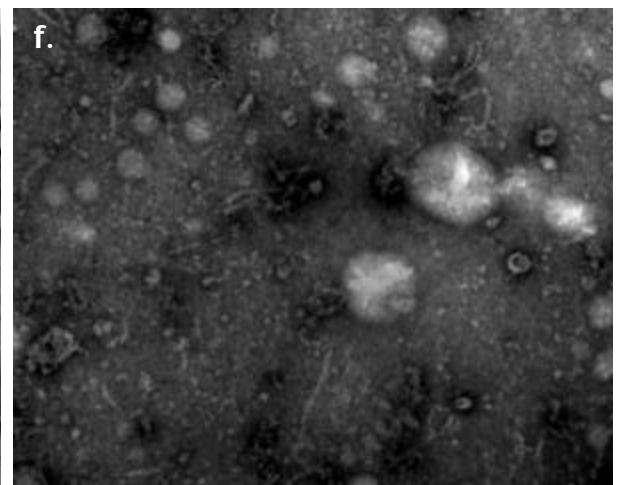
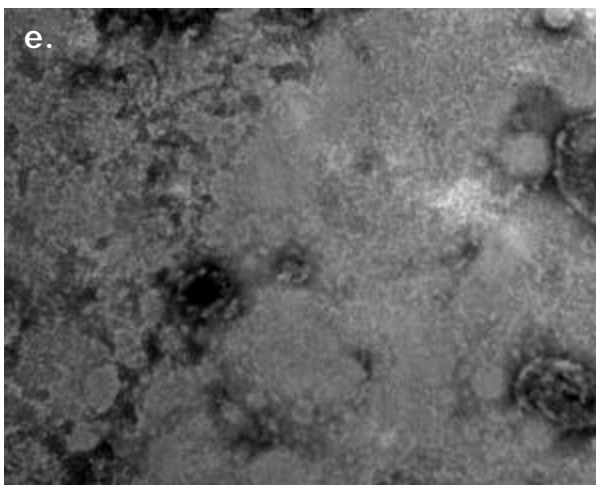
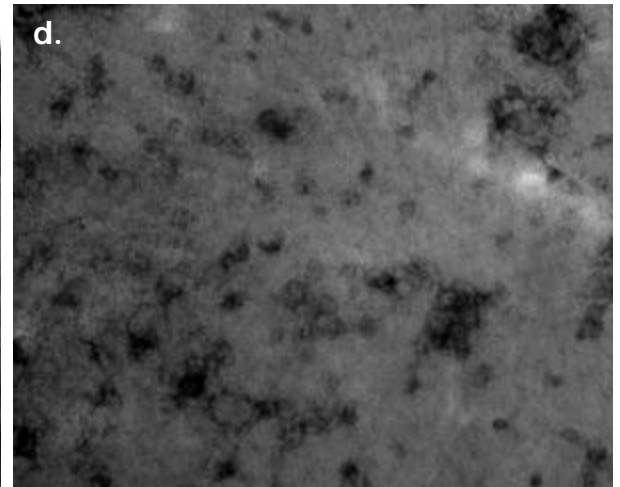
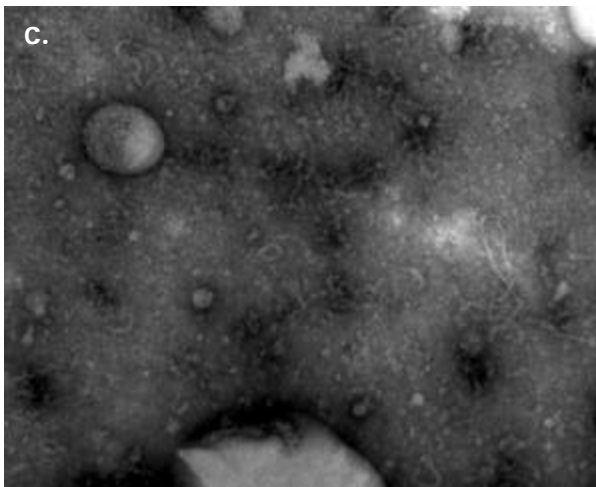
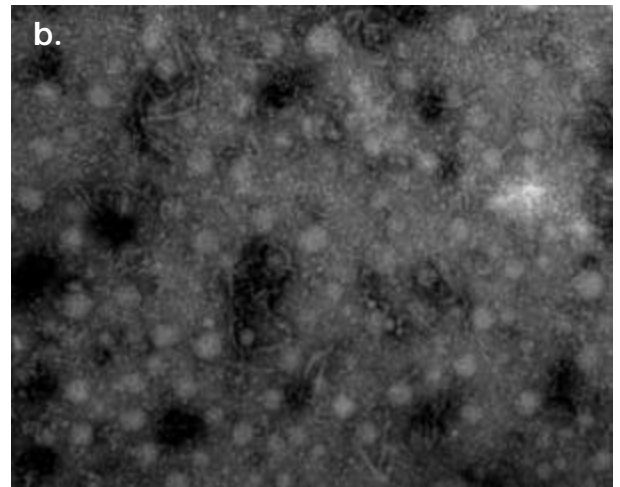
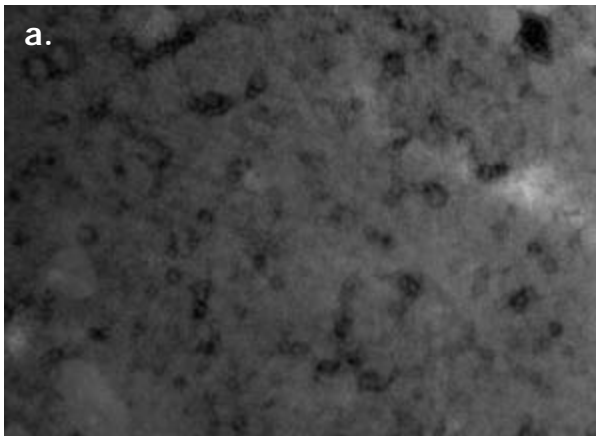
Con el fin de detectar si en las plantas resistentes hay o no acumulación de partículas virales se recurrió a la técnica de ISEM. Posteriormente las plantas fueron analizadas por DAS-ELISA. Los resultados se resumen en la **Tabla 4.1** y en la **Figura 4.5**.

En la línea control (C8) y en la transgénica susceptible (31-4) la presencia de partículas virales es una constante para todos los tiempos evaluados (**Figura 4.5** y **Tabla 4.1**). Para la línea resistente 57-5 son detectables de manera clara las partículas virales, únicamente a los 27 días (**Figura 4.5 f**). A los 13 días para confirmar que la ausencia de partículas (**Figura 4.5 d**) no se debía a un escape en la inoculación viral, se realizó un ISEM adicional, de una planta de la misma línea con síntomas (**Figura 4.5 e**). Para ambos casos no es clara la presencia de virus.

Tabla 4.1. Presencia de partículas virales completas. La evaluación se hizo utilizando anticuerpos policlonales específicos para RHBV en un ISEM.

Línea	Tiempo post-inoculación (días)					
	13		27		41	
	ISEM	ELISA	ISEM	ELISA	ISEM	ELISA
Sano						
57-5	-	0,000	- (a)	0,000	-	0,001
Inoculado						
C8	+	0,697	+	0,710	+	0,685
57-5	- (d)	0,000	+	0,377	- (g)	0,012
	- (e)	0,027				
31-4	+	0,366	+	0,579	+	1,060

Las letras entre paréntesis indican la referencia de las fotografías tomadas al microscopio electrónico de transmisión que se muestran en la **Figura 4.5**.



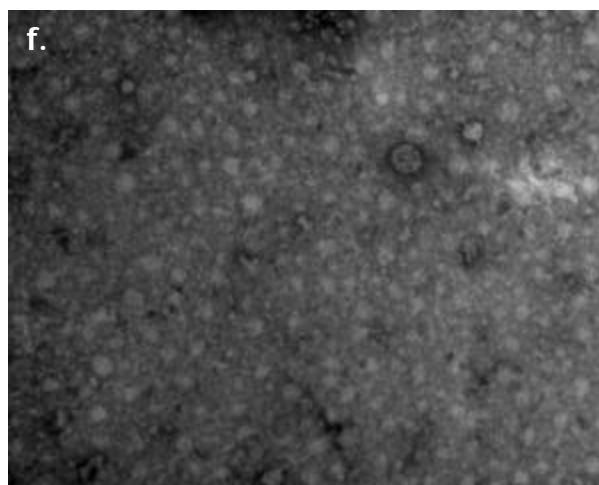


Figura 4.5. Presencia de partículas virales. Fotografías de los ISEMs hechos en cada tiempo, tomadas con un aumento de 80,000 X con el microscopio electrónico de trasmisión. **(a)** Planta de la línea 57-5 sana usada como control negativo. **(b)** C8 a los 27 d.p.i. **(c)** 31-4 a los 27 d.p.i. Para la línea 57-5 inoculada se muestran fotografías de cada tiempo. **(d)** 13 d.p.i. sin síntomas. **(e)** 13 d.p.i. con síntomas. **(f)** 27 d.p.i. **(g)** 41 d.p.i.

Al parecer el control ejercido por la planta contrarresta la acumulación del RNA3, pero no es suficiente para evitar el ensamblaje viral. Posiblemente pocas moléculas de RNA escapan temporalmente a la degradación y son suficientes para la traducción de la proteína que ensambla algunos virus.

4.4.2 Evaluación de la presencia de proteínas virales

Aún en ausencia de la acumulación del RNA3 y sus derivados, las líneas resistentes 57-5 y 12-6 (**Figura 4.2**) presentan sintomatología. Esta a medida que la edad de la planta avanza va disminuyendo, llevando en diferentes tiempos a la recuperación completa.

La expresión de proteínas virales es importante para la aparición de síntomas y la infección viral en las plantas (Hull, 2002). Por esta razón se evaluó la presencia de proteínas de RHBV a través del tiempo utilizando DAS-ELISA.

Los promedios de los datos obtenidos se muestran en la **Tabla 4.2** y la **Figura 4.6**. Los datos completos de las plantas evaluadas en cada tiempo se encuentran en el anexo E.

Tabla 4.2. Promedios de las lecturas de DAS-ELISA y sus errores estándar.

Línea	n	Tiempo post-inoculación (días)					
		13		27		41	
		Promedio	Error estándar	Promedio	Error estándar	Promedio	Error estándar
Sano							
C8	5	0,000	0,000	0,002	0,003	0,000	0,001
57-5	5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,001
31-4	5	0,000	0,000	0,002	0,002	0,001	0,001
Inoculado							
C8	12	0,142	0,265	0,736	0,353	0,544	0,260
57-5	12	0,149	0,202	0,340	0,260	0,196	0,229
31-4	13	0,300	0,252	0,546	0,246	0,466	0,357

Los valores representan el promedio de la absorbancia a 405 nm, para las lecturas de DAS-ELISA en cada tiempo. n. Número de plantas por línea.

Se observa mucha variación entre las plantas de una misma línea, debido a la dependencia de un vector para la inoculación. No es posible garantizar que todas las plantas tengan la misma dosis y que reciban el virus exactamente al mismo tiempo, por lo cual, no hay una sincronización exacta de los eventos que ocurren en la infección.

Todas las líneas evaluadas muestran un patrón en la variación del promedio del título viral semejante (**Figura 4.6**), con un aumento de los 13 a los 27 días y una disminución en el último tiempo. Sin embargo, la diferencia está en la magnitud de la variación.

En el primer tiempo evaluado, no todas las plantas presentaban síntomas y por eso muchos de los datos de DAS-ELISA fueron negativos. No hay diferencias significativas entre las tres líneas para este tiempo, indicando que la infección se da de forma semejante para las tres.

A los 27 días, la infección y el título se incrementan de forma notoria. Las líneas presentan diferencias significativas en sus promedios, teniendo cada una un comportamiento independiente.

Para el último tiempo, las diferencias entre las dos líneas susceptibles y la resistente se acentúa, indicando que existe un control sobre el virus por parte de la línea resistente.

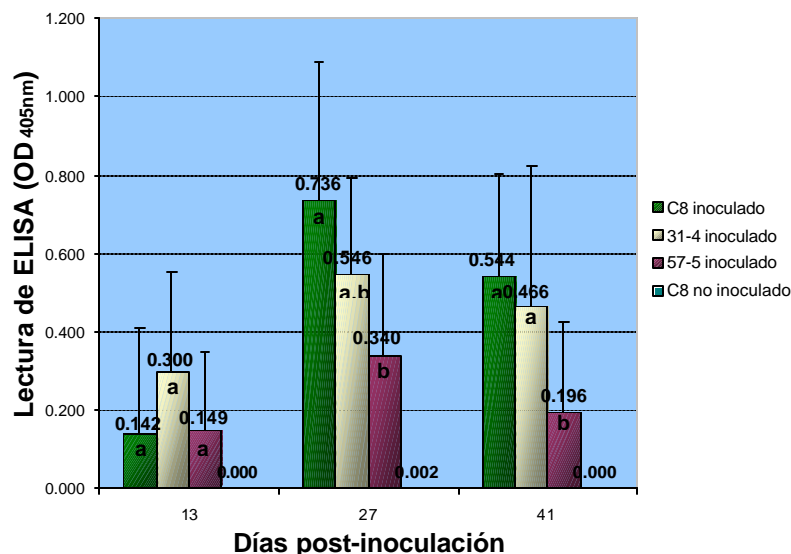


Figura 4.6. Promedio en los diferentes tiempos de las lecturas de DAS-ELISA. Las barras de error equivalen al error estándar de cada línea. Solamente a los 13 d.p.i. no hay diferencias significativas en las medias de los datos ($P < 0,05$), según el valor de probabilidad arrojado por la ANOVA para cada uno de los tiempos. Los datos de P son: 0,1932; 0,0082; y 0,0148 respectivamente. En todos los tiempos hay homogeneidad de varianza ($P < 0,05$). Las letras representan los resultados del Test de rango múltiple de Ryan-Einot-Gabriel para cada tiempo. Según este, las medias con la misma letra no son significativamente diferentes. Como comparación se graficó el control sano C8.

Si se analiza la variación del título viral en el tiempo en función de porcentaje (**Tabla 4.3**), se observa que la línea 57-5 presenta un incremento moderado y una fuerte disminución en comparación con las otras líneas. Esto indica que la línea 57-5 impide la acumulación del virus, a tal punto que el título decae.

Tabla 4.3. Porcentaje de variación en el promedio del título viral, obtenido por DAS-ELISA.

Línea	Porcentaje de variación (%)	
	13 a 27 días	27 a 41 días
C8	+ 418,6	- 26,1
57-5	+ 120,1	- 42,2
31-4	+ 82,1	- 14,7

Los signos + y – representan aumento o disminución, respectivamente.

Los datos de DAS-ELISA concuerdan con la recuperación observada en las plantas de la línea 57-5. El poco aumento del título viral del primer al segundo tiempo y la fuerte disminución posterior, indican que estas plantas están ejerciendo un control activo sobre el virus. La disminución natural de la concentración viral (evidenciada en la reducción del título en la línea C8, **Figura 4.6**), se ve complementada por la puesta en marcha de un mecanismo activo, mediado por el transgén, que controla al virus impidiendo su acumulación.

4.4.3 Análisis de la presencia del RNA4 de RHBV en las plantas inoculadas

La presencia de proteínas virales tanto en las plantas susceptibles como en las resistentes, indica que hay expresión a partir del genoma viral (**Figura 4.6**). Con el fin de evaluar el efecto del control ejercido por la planta sobre RNAs virales diferentes al RNA3, se evaluó la acumulación del RNA4.

Hay acumulación del sg-vRNA4 a los 13 d.p.i. en todas las líneas (**Figura 4.7**), en concordancia con la lectura de DAS-ELISA (**Figura 4.6**). A los 27 d.p.i. la acumulación solo es detectable en las líneas susceptibles, aunque en la 31-4, la acumulación es mucho menor a la encontrada en el primer tiempo. A los 41 días la presencia del sg-vRNA4 no es detectable en ninguna línea, para los 10 µg de RNA utilizados por pozo. Los mismos resultados se obtuvieron al repetirse el experimento.

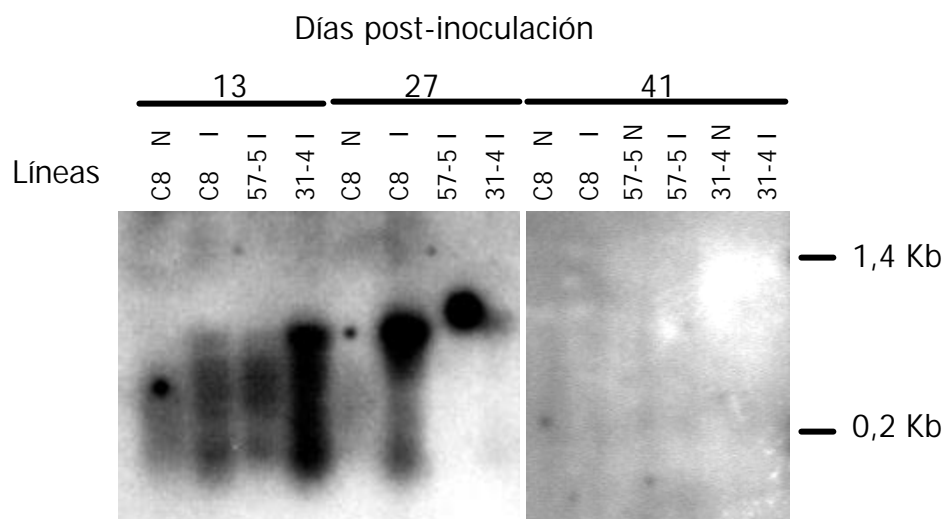


Figura 4.7. Acumulación del RNA4 a través del tiempo en las plantas inoculadas. 10 µg de RNA total por carril, se corrieron en un gel de Agarosa en condiciones no denaturantes. La sonda utilizada es una *Riboprobe* correspondiente al vcRNA4. La exposición fue de 30 días. Plantas no inoculadas (N) e inoculadas (I).

El anterior resultado indica, que el control en la acumulación no es ejercido sobre el RNA4, de la misma forma en que es ejercido sobre aquel que tiene homología con el transgén, es decir, el RNA3. El hecho que solo el RNA3 se vea afectado desde el inicio de la infección, mientras que el RNA4 se acumula, indica que el primero es el blanco del control mediado por el transgén en las plantas resistentes. El mecanismo más probable de resistencia, según los resultados, es el silenciamiento post-transcripcional de genes, que degrada de forma secuencia-específica al RNA3. La disminución posterior en la acumulación del RNA4 y en general del virus, puede ser debida al trastorno del ciclo de infección viral por la eliminación del RNA3.

4.4.4 Análisis de RNA de bajo peso molecular

Con el fin de detectar los siRNAs, se realizaron las extracciones de RNA de bajo peso molecular a los 13, 27 y 41 días post-inoculación utilizando el método de Papaefthimiou (2001). Los resultados se muestran en la **Figura 4.8**.

A los 13 d.p.i. se observa la acumulación del RNA3 solamente en las líneas susceptibles, tanto del RNA viral de alto peso molecular, como de los RNAs de 60-70 nt. No es posible detectar señal correspondiente a los siRNAs, a la altura de los primers utilizados como punto de comparación del tamaño.

A los 27 días hay una leve señal emitida por la presencia de algunas moléculas del RNA3 en la línea 57-5, de forma congruente con lo observado en las **Figura 4.5** y **Figura 4.6**. Este es el único tiempo evaluado donde es posible detectar claramente partículas ensambladas, y donde se alcanza el título más alto para esta línea. La intensidad de la señal en las líneas C8 y 31-4 es muy fuerte comparada con la detectada en los otros tiempos, en concordancia con el DAS-ELISA (**Figura 4.6**).

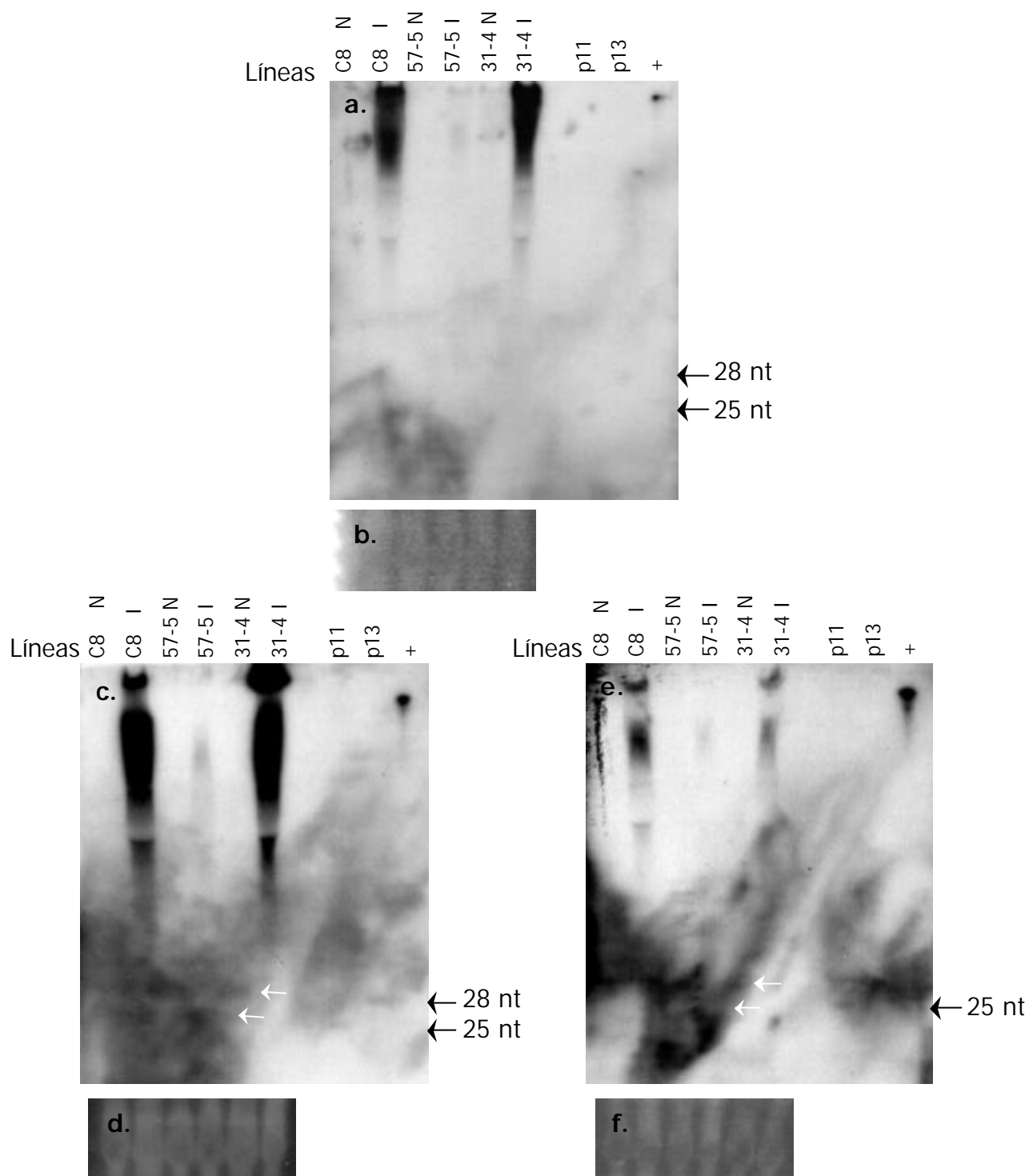


Figura 4.8. Presencia de los siRNAs a diferentes tiempos post-inoculación. Para comparación, 150 µg del producto de la extracción de RNA de bajo peso molecular fueron colocados en cada carril. Las hibridaciones corresponden a 13 días **(a)**, 27 días **(c)** y 41 días **(e)**

post-inoculación. Para cada una se muestra como control de la carga igual de los carriles, las bandas correspondientes al rRNA 5S y al tRNA, visualizadas con bromuro de etidio (**b**, **d** y **f**, respectivamente). Las flechas indican la posición de los siRNAs. La sonda utilizada es un producto de PCR derivado del pVR3. Como marcadores de peso molecular se colocaron los primers RHB3-11 (p11) y RHB3-1375 (p13) de 25 y 28 nt respectivamente. El control positivo (+) es un producto de PCR. No inoculado (N), Inoculado (I).

A pesar de la interferencia por el ruido de fondo, es posible visualizar bandas a la altura de los primers. Las bandas que se aprecian corresponden a dos tamaños diferentes, una a la altura del primer de 28 nt, presente en los carriles de ambas líneas transgénicas sanas, y una a la altura del primer de 25 nt solo presente en la línea resistente inoculada. Teniendo en cuenta que el DNA migra más rápido que el RNA, los tamaños observados de las bandas equivalen a 21 y 25 nt aproximadamente (Hamilton *et al*, 2002). La existencia de dos tamaños es congruente con reportes recientes de la literatura, donde se describen moléculas de 21 y 25 nt con funciones diferentes para el silenciamiento (Hamilton *et al*, 2002).

Para el último tiempo se observa una disminución en la concentración del RNA3 en ambas líneas susceptibles; de nuevo este no es detectable en la línea 57-5. A pesar de esto se visualiza el mismo patrón de siRNAs aunque con mayor dificultad por el ruido de fondo. Si se sobreponen ambas películas alineando los RNAs virales de 60-70 nt se observa que la localización de las posibles bandas de siRNAs es la misma, indicando que no se trata de artefactos por el ruido de fondo.

La presencia de los siRNAs, indica que en las plantas está ocurriendo el silenciamiento post-transcripcional del transgén, tanto en la línea susceptible como en la resistente. La diferencia es que en la segunda, la degradación es activa contra el virus. Lo anterior se puede deducir por la presencia de la banda de 21 nt, solo en el carril correspondiente a la línea resistente inoculada. Este tamaño de

moléculas se relaciona con la degradación activa de la secuencia blanco, de forma local (Hamilton *et al*, 2002). La molécula de 25 nt estaría involucrada con la señalización a larga distancia y la metilación de la secuencia del transgén en el genoma.

4.5 Análisis de las reacciones de hipersensibilidad

Las líneas resistentes 57-5 y 12-6 presentan lesiones semejantes a reacciones de hipersensibilidad visibles en el tejido. La aparición de estas reacciones no se da en el tejido inoculado, sino en el tejido a donde el virus ha llegado por translocación. Dichas reacciones no ocurren u ocurren esporádicamente en las líneas susceptibles, mucho tiempo después de su aparición en las líneas resistentes.

Las características macroscópicas de dichas reacciones y su aparición aproximada en la línea 57-5 se documentó en el tiempo (**Figura 4.9**). Para todas las líneas evaluadas a los 13 días post-inoculación no se presentan reacciones visibles, pero sí una sintomatología cuya intensidad varía de planta a planta. A los 27 días, en algunas de las plantas de la línea 57-5, el lugar donde se presenta el síntoma en las hojas más jóvenes, empieza a tornarse oscuro y en él se da origen a la reacción (**Figura 4.9 b**). Dichas reacciones aumentan de tamaño e intensidad, a medida que la hoja tiene más edad (**Figura 4.9 c**). No es posible encontrar reacciones en las líneas susceptibles para este tiempo.

En la última evaluación, la presencia de las lesiones en las hojas más jóvenes de la línea 57-5 es casi constante, con variación en la intensidad y frecuencia. A esta altura es posible encontrar reacciones en la línea susceptible, pero estas ocurren de forma esporádica en un número muy limitado de plantas.



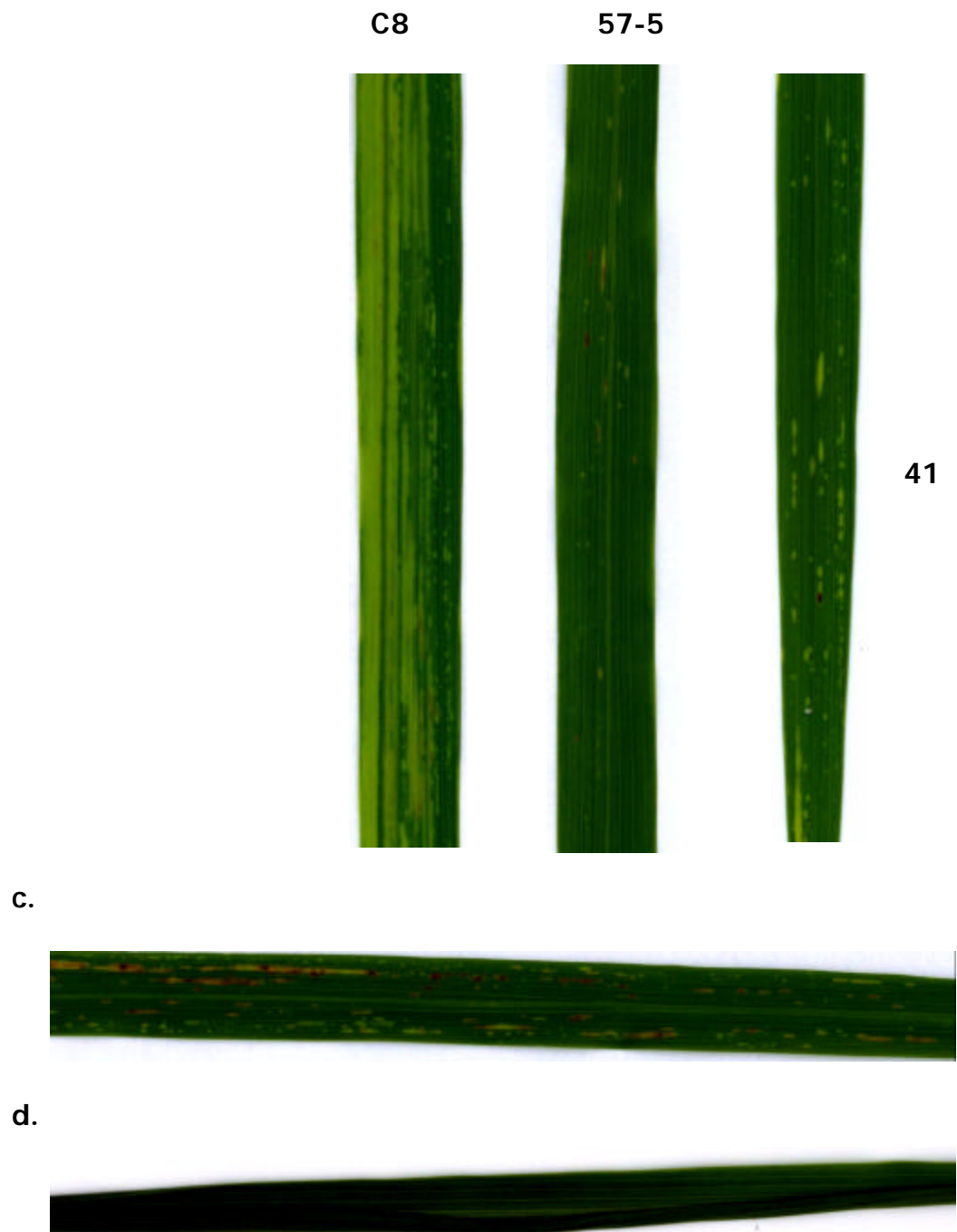
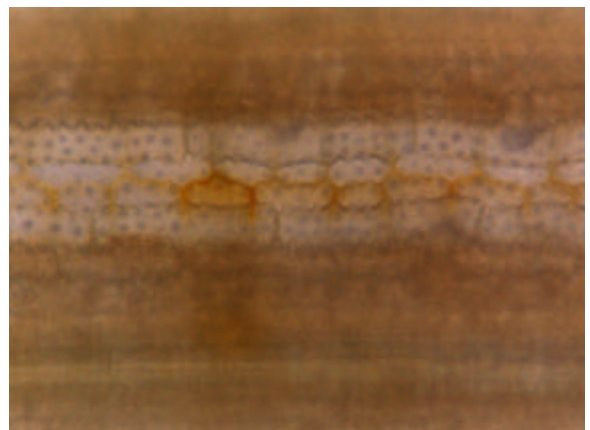
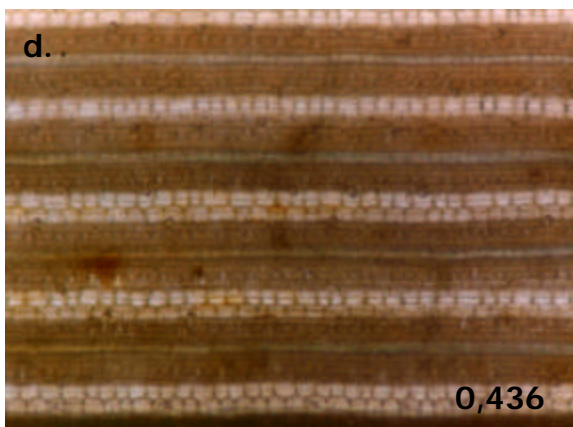
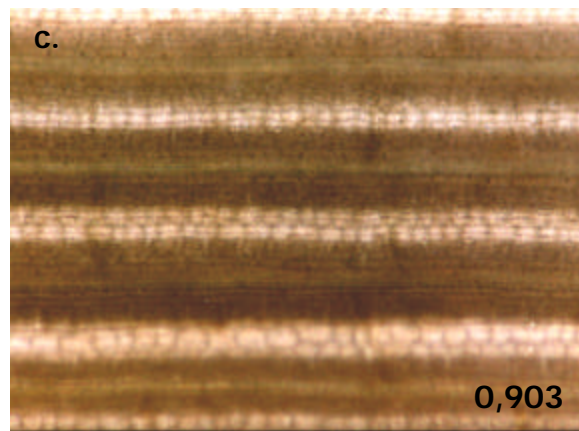
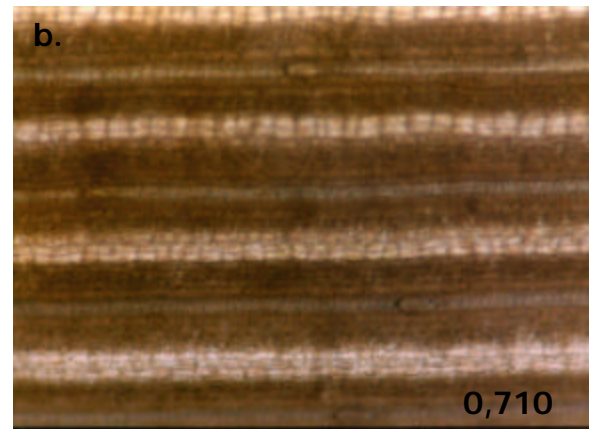
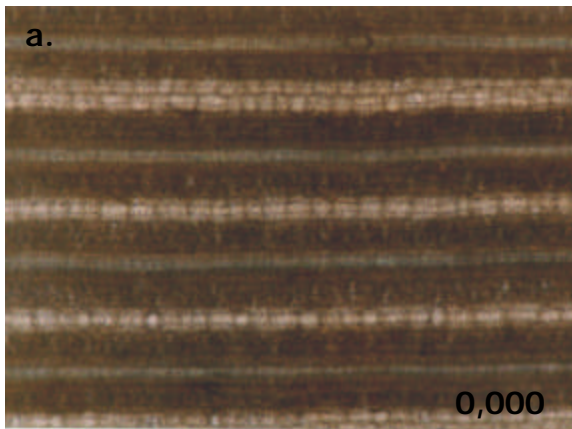


Figura 4.9. Reacciones de hipersensibilidad presentes en las plantas transgénicas a través del tiempo. Fotografías de las hojas más jóvenes que muestran la aparición de las reacciones de hipersensibilidad y la sintomatología en cada uno de los tiempos. **(a)** Hoja sana; **(b)** Hojas de cada línea en diferentes tiempos; **(c)** Hoja de la línea 57-5 varios días después de la aparición de las reacciones. **(d)** Hoja recuperada de la línea 57-5, 59 días post-inoculación.

Los resultados anteriores implican que, además de la posible defensa mediada por el silenciamiento del RNA3, las plantas resistentes también inician otro mecanismo para controlar al virus. La iniciación de las reacciones se da aparentemente de forma posterior al establecimiento del silenciamiento, por lo que actuarían como una segunda línea de defensa frente al virus. La presencia de lesiones en las líneas susceptibles, indica que estas también tienen la capacidad de reconocer al virus e iniciar la respuesta. La diferencia radica en que el elicitor o la activación de la vía de HR, no se da, u ocurre en muy baja concentración o frecuencia en las plantas susceptibles para iniciar la respuesta, en comparación con la forma y frecuencia en que ocurren en la línea resistente.

Con el fin de confirmar si las lesiones observadas se tratan de reacciones de hipersensibilidad, se utilizó la tinción con Diaminobenzidina. Este compuesto polimeriza en presencia de la enzima peroxidasa y al contacto con el Peróxido de Hidrógeno generado en la HR.



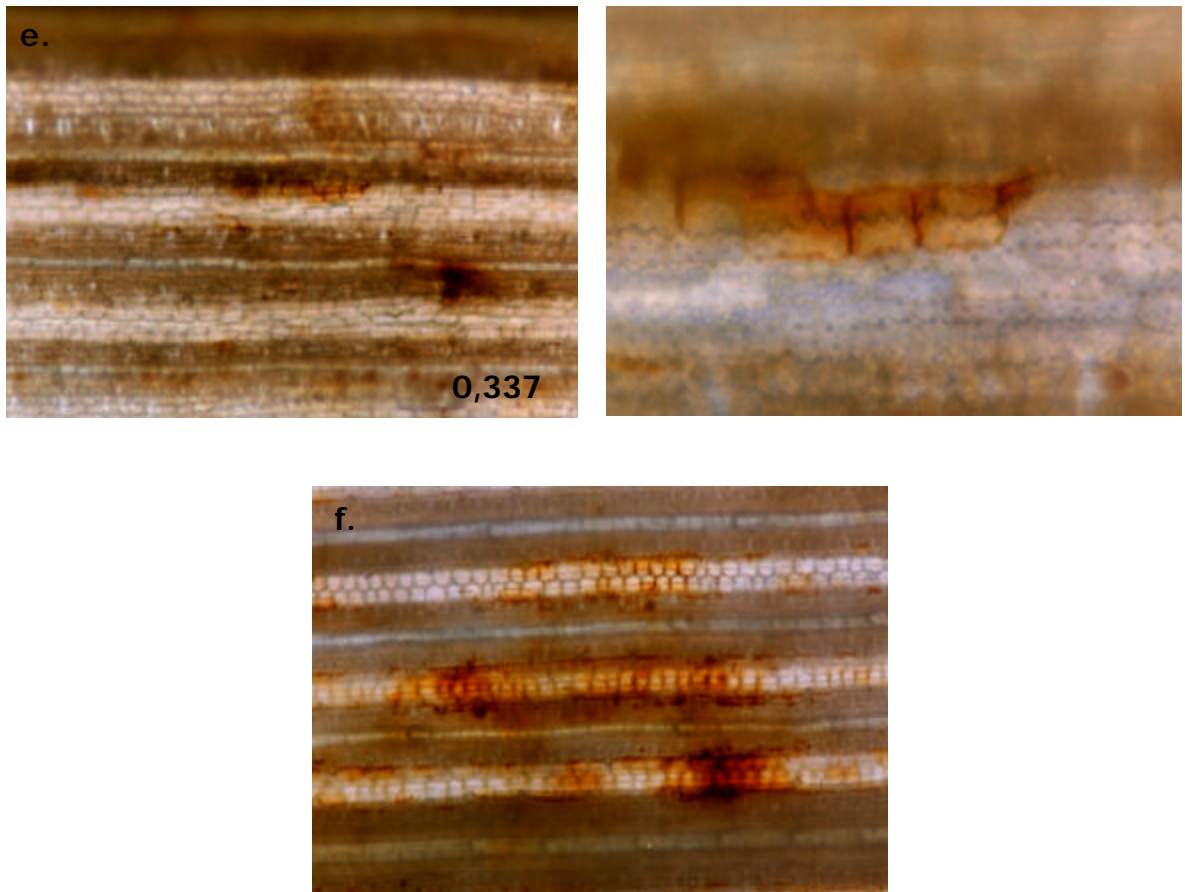


Figura 4.10. Presencia de reacciones de hipersensibilidad en la línea 57-5. Fotografías tomadas en el microscopio de luz de la tinción con Diaminobenzidina, realizada a las hojas más jóvenes 27 d.p.i. (aumento 10 X). **(a)** C8 no infectado. **(b)** C8 infectado. **(c)** 31-4 infectado. **(d, e)** Dos plantas de la línea 57-5 infectadas, con aumento de 10 X (Izquierda) y 40 X (derecha). **(f)** planta de la línea 57-5 con reacciones avanzadas, incluida como comparación. Los valores incluidos en cada foto equivalen a la lectura de DAS-ELISA para la planta.

Las fotografías tomadas al microscopio de luz revelan la aparición de reacciones de hipersensibilidad en la línea 57-5, desde que estas estaban ocurriendo al nivel de una sola célula (**Figura 4.10 d**). No es posible detectar las mismas reacciones en las plantas susceptibles (**Figura 4.10 b y c**). Cuando el análisis se hace en las plantas con reacciones ya visibles y acentuadas, la intensidad de la tinción y la cantidad de células que reaccionan es mayor, indicando la proliferación de las reacciones a células aledañas (**Figura 4.10 e**).

La presencia de Peróxido de Hidrógeno es indicadora de los cambios celulares y las cascadas de señalización que tienen lugar cuando ocurre una HR. La reacción de la Diaminobenzidina en las plantas resistentes, sugiere el desarrollo de reacciones de hipersensibilidad. La ventaja de la técnica es la detección temprana a escala celular, permitiendo su uso en la evaluación de los posibles elicitores.

El análisis de la aparición de las reacciones de hipersensibilidad, indica que la resistencia transgénica al Virus de la Hoja Blanca está mediada por dos mecanismos diferentes, el silenciamiento mediado por RNA y las HRs iniciadas posteriormente. Ambos juegan un papel importante en el control del virus. Sin embargo, no es claro el por qué ambos mecanismos se activan, ni tampoco cómo el transgén afecta la vía que conduce a una HR, iniciándola.

5 DISCUSIÓN

5.1 Expresión del transgén

La resistencia a virus mediada por el silenciamiento de RNA, y en general, el silenciamiento post-transcripcional de genes, son mecanismos muy sensibles a cambios en el nivel de transcripción (English y Baulcombe, 1997). En algunos casos de silenciamiento post-transcripcional, se detecta alta concentración del RNA blanco en etapas tempranas del desarrollo de la planta. Sin embargo, esta disminuye gradualmente debido a la re-iniciación que debe ocurrir, al no ser el silenciamiento post-transcripcional un mecanismo meióticamente heredable (Elmayan y Vaucheret, 1996).

La dificultad que se presenta en la detección del producto derivado del transgén en las plantas de arroz, es un reflejo del impedimento en la acumulación de dicho RNA. Sin embargo, los primeros análisis de expresión realizados, fueron hechos con plantas en un estado de desarrollo (alrededor de 20 días) en donde el transgén posiblemente ya ha sido sistémicamente silenciado.

Es posible que se encuentre mayor concentración del RNA derivado del transgén en plantas jóvenes, pero a medida que la planta se desarrolla, la acumulación puede llegar a decrecer a los niveles observados. Como una aproximación a este hecho, se investigó por medio de Northern si era posible, a temprana edad, detectar RNA transgénico acumulado en las plantas.

Los resultados indican que con esta técnica no es posible, aun en plántulas, detectar la acumulación de los transcritos. Sin embargo, esto no significa que no se presenten cambios en la expresión. Para que se dé inicio al silenciamiento post-transcripcional, son más importantes las características del transcrito a silenciar que su concentración en la célula (Vastij *et al*, 2002).

Existe la posibilidad que debido a los re-arreglos sufridos por el transgén al ser introducido en el genoma de la planta (Lentini *et al*, 2003), tanto la transcripción como la estructura del transcrito no sean las esperadas. Cambios en el promotor y la formación de repeticiones invertidas en la secuencia del transgén, pueden ser las responsables de la posible baja transcripción y de la iniciación del silenciamiento respectivamente.

Con el fin de determinar el nivel de transcripción y la existencia de diferencias en esta, entre las diferentes líneas y a diferentes edades, se requiere de una técnica más sensible pero a la vez cuantitativa como el *Nuclear Run-off*. El uso de dicha técnica permitiría detectar los transcritos en el momento en que salen del núcleo, previo a la degradación.

5.2 El silenciamiento y la resistencia

En las plantas resistentes desde el inicio de la infección hay inhibición en la acumulación del RNA viral con homología al transgén, mientras que el RNA4 se acumulan en forma comparable a los controles susceptibles. Este hecho y la presencia de siRNAs, son indicios de que en las plantas transgénicas de arroz está ocurriendo el silenciamiento post-transcripcional que impide la acumulación del transgén.

La presencia de dos poblaciones diferentes de siRNAs en las plantas sanas e infectadas y el patrón en que están presentes, concuerdan con los reportes recientes (Hamilton *et al*, 2002), donde los autores describen los diferentes papeles cumplidos por las pequeñas moléculas de RNA en el silenciamiento. Las moléculas de menor tamaño se correlacionan con la degradación local de la secuencia blanco, mediándola de una forma secuencia-específica. Las de mayor tamaño se correlacionan con el envío de la señal a larga distancia del silenciamiento; además, cumplen un papel en la metilación de las secuencias homólogas en el núcleo.

Siguiendo este modelo en las diferentes líneas de arroz transformadas con la Nucleoproteína de RHBV, hay silenciamiento de las secuencias insertadas señalizado por los RNAs de 25 nt. Este silenciamiento se distribuye a través de la planta impidiendo la acumulación del mRNA del transgén. Sin embargo, solo en la línea resistente hay degradación activa del virus, en forma local (evidenciado por la presencia de las moléculas de 21 nt).

Pero, ¿Por qué si hay presencia de los siRNAs y silenciamiento tanto en la línea resistente como en la susceptible, no son todas resistentes? La diferencia puede ser explicada, incluso si la banda de 21 es un artefacto del ruido de fondo. En el año 2002, Han y Grierson infirieron que no hay correlación entre el nivel encontrado de siRNA y el grado de silenciamiento, sugiriendo que los siRNAs pueden variar en la eficiencia en que median el PTGS. Es posible que el lugar donde se alinean en la secuencia blanco estas pequeñas moléculas, juegue un papel importante en la efectividad de su acción.

De esta manera las características del transgén y de su transcrito en la línea resistente lo hacen un eficiente inductor de la degradación, mientras en la línea

susceptible solo es capaz de inducir una leve degradación, insuficiente para contrarrestar al virus.

Un punto a determinar en el futuro, que puede esclarecer las diferencias entre plantas resistentes y susceptibles, es la caracterización de la población de los siRNAs generados. La distribución de las moléculas a lo largo de la secuencia del transgén puede ser diferente entre líneas; siendo estas diferencias y no solo su presencia, los determinantes de la resistencia.

Una inquietud que surge del patrón de siRNAs es: ¿Por qué las moléculas de 25 no son detectables en presencia del virus? Sería de esperar que estas moléculas estuvieran también mediando la señalización en las plantas infectadas, pero no están o están en un nivel no detectable. Una posible explicación es que el sistema del silenciamiento tienda, en presencia del virus, a centrar su atención en la degradación local disminuyendo así la presencia de señalizadores. Sin embargo, en otros sistemas es posible encontrar RNAs de 21 como de 25 nt simultáneamente (Han y Grierson, 2002). Otra explicación más factible es que el Virus de la Hoja Blanca codifique para un inhibidor del silenciamiento que retrase o impida la señalización.

La proteína viral NS4 posee una región de identidad en la secuencia con el Hc-Pro del *Tobacco Vein Mottling virus* (TVMV) (Ramírez *et al*, 1993). Hc-Pro, además del papel que juega en la transmisión viral es un reconocido inhibidor del silenciamiento (Anandalakshmi *et al*, 2000). Es posible que una de las funciones de la NS4 sea la de inhibir la respuesta de la planta. Otro indicativo de la inhibición

del silenciamiento por RHBV es que virus evolutivamente relacionados, como los *Tospovirus*, poseen también inhibidores del silenciamiento (Takeda et al, 2002)*.

En plantas transformadas con genes virales, si la secuencia está silenciada previa a la llegada del virus, la planta es inmune a la infección; pero si el silenciamiento del transgén se induce con la llegada del virus, la planta presenta el fenotipo de recuperación (Lindbo et al, 1993). La presencia de inhibidores del silenciamiento en RHBV puede también explicar el por qué existiendo silenciamiento previo a la entrada del virus, las plantas no son inmunes sino que presentan recuperación. Además, explica por qué algunas moléculas del RNA3 escapan a la degradación, permitiendo el ensamblaje de partículas virales.

En la resistencia a virus mediada por RNA, la señal del silenciamiento se mueve junto o delante de este, para mediar la respuesta en el tejido sistémico a su llegada. Si el RHBV disminuye la señal, puede llegar primero o en mayor concentración que esta y con la ventaja, infectar más rápidamente nuevas células.

Si la respuesta de la planta no es eficiente, la inhibición viral será suficiente para permitir la infección, haciéndola susceptible. En las plantas resistentes, se ve afectado el envío de la señal (ausencia de los RNAs de 25 nt) pero por las características del transcrito, el silenciamiento del RNA3 se re-inicia o se mantiene a la llegada del virus. En estas condiciones la respuesta ocurre, pero se ve retrasada por la inhibición viral, permitiendo el ensamblaje de partículas y el establecimiento de una infección más leve que la presentada en las plantas

* **Nota adjuntada como prueba.** El equipo de investigación de Bucher (Bucher *et al*, 2003), reporta de forma posterior a la realización de este trabajo, la supresión del silenciamiento post-transcripcional por el RHBV. Dicha supresión es mediada por la proteína NS3. De tal manera que es esta y no la NS4, la responsable de la eliminación de los siRNAs de 25 nt en las plantas infectadas.

susceptibles. A medida que el tiempo transcurre, el trastorno del ciclo viral por el control sobre el RNA3, causa la disminución en la concentración viral.

Una consecuencia de la disminución del silenciamiento en presencia del virus, puede ser el aumento en la acumulación del RNA derivado del transgén. Si esto ocurre, el cambio no puede ser detectado porque las moléculas derivadas del transgén se suman a las moléculas virales, sin que haya forma de diferenciarlas. Para comprobar lo anterior y realizar comparaciones de la expresión tanto en diferentes condiciones, como a diferentes tiempos, es necesario conocer la forma en que está insertado el transgén y la secuencia de los transcritos que produce.

5.3 Reacciones de hipersensibilidad

Aunque con los resultados obtenidos es posible pensar que las reacciones presentadas por las plantas resistentes son reacciones de hipersensibilidad, no es factible en estos ensayos esclarecer la naturaleza del elicitador de la respuesta.

El hecho que las reacciones no se den en el sitio de inoculación del virus, sino en el tejido al cual este ha llegado por movimiento vía floema, indica que el elicitador no es un componente presente desde el principio de la infección. También, que la reacción surja en el lugar donde la sintomatología viral ha aparecido y no previo a esta, indica que el producto reconocido es sintetizado posterior a la replicación viral o de manera simultánea pero lenta, permitiéndole al virus establecerse en varias células antes del inicio de la HR.

Además, que las reacciones no se den o se den en muy baja frecuencia en las líneas susceptibles, indica que el elicitador solo se genera en cantidades suficientes

para iniciar una respuesta en las líneas resistentes. La presencia ocasional de HRs en las líneas susceptibles puede indicar que el equivalente al gen *R* está presente en ellas, y que la iniciación de la reacción depende únicamente de la producción del elicitor.

No hay que descartar la posibilidad de que las HRs se inicien a la entrada del virus, o en su defecto, a la llegada de este a un nuevo tejido. La aparición de las reacciones sobre el síntoma puede ser un reflejo de que su desarrollo fue pausado, permitiendo la diseminación del virus. Sin embargo, esto no explica el por qué al transcurrir el tiempo la HR rápidamente abarca todo el lugar donde estaba el síntoma.

El elicitor puede ser alguna de las proteínas virales de la cual todavía no se conozca su función y que solo sea expresada bajo ciertas condiciones. Si en la respuesta de defensa de la planta, por alguna razón, se altera el patrón de expresión del virus y se induce la traducción de proteínas que normalmente no están en ella, estas moléculas pueden actuar como elicitores de la HR.

Otra posible explicación aplicable a la iniciación de la HR son las partículas mal ensambladas. Debido a la inhibición en la acumulación del RNA3, se traduce menos Nucleoproteína y posiblemente el ensamblaje de las partículas virales se da de forma menos eficiente. Partículas mal ensambladas por la deficiencia en Nucleoproteína, dejan expuestos dominios que normalmente no sobresalen o toman conformaciones diferentes, actuando como elicitores. Lo anterior concuerda con la relación en el tiempo que poseen las dos respuestas, ocurriendo primero la inhibición en la acumulación del RNA3 y luego la aparición de las HRs.

Una última opción sería que moléculas del RNA3 viral con conformación aberrante por la degradación, actúen como elicitores. Aunque el reconocimiento de secuencias de RNA que actúan como el equivalente a un gen *avr* y activan HR ha sido reportada (Szittyá y Burgyan, 2001), esta opción es tal vez menos factible por la baja acumulación del RNA3.

Todas las anteriores explicaciones se ajustan también a la aparición de HRs tardías en plantas susceptibles, puesto que al aumentar la edad de la planta y tener este un metabolismo diferente, el virus encuentra menos oportunidades de replicación (Hull, 2002). Entonces, la respuesta tardía de defensa puede ser más significativa, aumentando la concentración del elicitador en las plantas donde no se había acumulado.

No solamente la existencia de un elicitador producido tiempo después en la interacción entre una planta resistente y el virus, puede explicar la aparición de HRs. La activación podría darse en un paso posterior al reconocimiento de un elicitador. La defensa de las plantas frente a los virus mediada por el SA está relacionada con el silenciamiento (Ji y Ding 2001, Xie *et al*, 2001), así como el SA también está involucrado en la señalización que se da en la vía de activación de la HR y SAR (Ryals *et al*, 1996). De alguna forma, un componente común entre las vías activado o expresado con el silenciamiento, puede jugar un papel importante en la iniciación de la HR en las líneas resistentes, al interferir o aumentar algún paso en la cascada de activación.

Es necesario esclarecer la naturaleza de la iniciación de las reacciones, puesto que al entenderla se puede explicar mejor la interacción entre el virus y la planta resistente. La utilización de sistemas de expresión *in vitro* para proteínas virales y posterior inoculación de estas en las plantas resistentes, junto con la detección

temprana de la HR por Diaminobenzidina, pueden ser una metodología útil en el esclarecimiento de la iniciación de las reacciones en las plantas.

5.4 Modelo de la interacción

A continuación se describen los posibles pasos de la interacción y el modo en que difieren entre plantas resistentes y susceptibles.

Dependiendo de la edad de la planta el virus puede encontrar al entrar un silenciamiento mas o menos establecido. La inhibición viral de la respuesta de las plantas resistentes no es suficiente, pero permite que una vez dentro de las primeras células inicie su ciclo de replicación y ensamblaje de partículas virales, aún estando afectada la concentración del RNA3 y sus derivados. Posiblemente los demás componentes virales sigan su acumulación normal.

En los primeros días de infección la planta resistente acumula los componentes virales, diferentes al blanco de la respuesta, al mismo nivel que lo hacen las plantas susceptibles. Al transcurrir la infección, más células reciben al virus y llevan a cabo la respuesta de defensa. De esta se deriva algún producto que al acumularse, inicia reacciones de hipersensibilidad en el lugar donde ha estado el virus. Ambos mecanismos actúan de ahí en adelante en conjunto, para mediar la disminución de todos los productos virales y así controlar la infección.

En las plantas susceptibles, la respuesta de defensa por silenciamiento no es suficiente y oportuna para contener al virus desde el inicio de la infección, debido a que este la contrarresta de forma efectiva. El virus toma ventaja de este hecho y alcanza niveles altos que le permiten mantenerse. Al madurar la planta su fisiología

cambia, llevando a que el virus encuentre diferentes condiciones que dificultan su replicación (Hull, 2002). Dicho cambio la hace más lenta, en comparación a cuando en la planta había una continua división celular. Debido a esto la defensa de la planta, que no había sido efectiva, toma mayor importancia disminuyendo aún más el título viral. En este potenciamiento de la defensa, esporádicamente ocurre el mismo evento que lleva a la aparición de reacciones de hipersensibilidad en las líneas resistentes, por lo cual se da la aparición tardía de estas.

En la **Figura 5.1** se muestra un esquema basado en la **Figura 2.1** que resume los puntos tratados anteriormente. En ella se ilustran los posibles eventos relacionados con el silenciamiento en la interacción RHBV-planta transgénica.

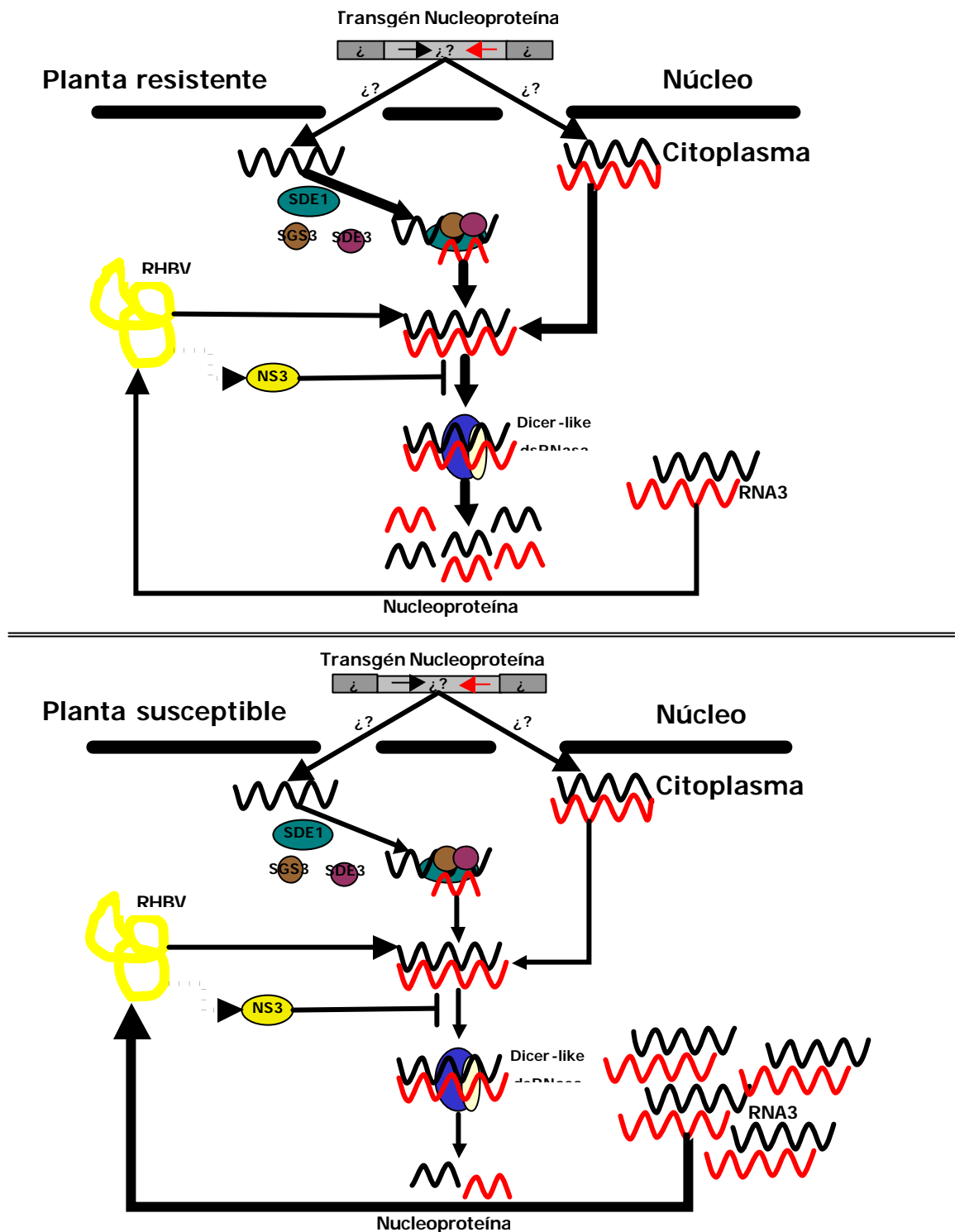


Figura 5.1. Modelo de la interacción RHRV-Planta transgénica. Modelo que resume los posibles eventos relacionados con el silenciamiento, que ocurren en las plantas transgénicas resistentes y susceptibles.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS A FUTURO

Los siRNAs y la inhibición de la acumulación del RNA viral con homología al transgén, son los indicios más fuertes del papel del silenciamiento mediado por RNA en la resistencia transgénica al RHBV. No es solo la presencia del silenciamiento en las plantas lo que las hace resistentes, su acción debe ser lo suficientemente efectiva para sobrepasar cualquier interferencia que el virus pueda ejercer sobre el mecanismo.

La recuperación de las plantas resistentes se da porque se combate al virus desde dos frentes, el silenciamiento de las secuencias homólogas al transgén y la activación posterior de la vía que inicia reacciones de hipersensibilidad. Ambos mecanismos se complementan, contribuyendo a una mayor resistencia a la enfermedad, cuando solo uno es activado.

Es necesario profundizar más en el conocimiento de estas plantas, puesto que todavía no están claras las características de la secuencia insertada en el genoma que le confieren la resistencia; tampoco lo están, el cómo y por qué se inicia la respuesta de hipersensibilidad de la forma en que lo hace.

El conocimiento generado en este trabajo, a partir de las plantas de arroz transformadas con el gen de la Nucleoproteína, permite la comprensión de la interacción RHBV-arroz en la naturaleza. Estas plantas por sus características pueden llegar a constituirse en un modelo experimental para el estudio básico de los mecanismos de resistencia. La utilización en un futuro de dicho conocimiento, puede permitir la reproducción de las características que confieren la resistencia,

en busca de variedades, no solo de arroz, con una mejor respuesta a infecciones virales.

BIBLIOGRAFÍA

- ALFANO J. R. y COLLMER A.** 1996. Bacterial pathogens in plants: life against the wall. En: *Plant Cell* 8: 1683-1698
- ANANDALAKSHMI R., MARATHE R., GE X., HERR J. M., MAU C., MALLORY A., PRUSS G., BOWMAN L., VANCE V. B.** 2000. A calmodulin-related protein that suppresses post-transcriptional gene silencing in plants. En: *Science* 290:142-144
- BEACHY R. N.** 1997. Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. En: *Curr Opin Biotechnol* 8:215-220
- BEACHY R. N.** 1999. Coat-protein-mediated resistance to tobacco mosaic virus: discovery mechanisms and exploitation. En: *Phil Trans R Soc Lond B* 354:659-64
- BENT A. F.** 1996. Plant disease resistance genes: Function meets structure. En: *Plant Cell* 8: 1757-1771
- BERNSTEIN E., CAUDY A. A., HAMMOND S. M., HANNON G. J.** 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. En: *Nature* 409:363-66
- BONAS U. y VAN DEN ACKERVEN G.** 1999. Gene-for-gene interactions: bacterial avirulence proteins specify plant disease resistance. En: *Curr Opin Microbiol* 2:94-98
- BRIGNETI G., VOINNET O., LI W. X., JI L. H., DING S. W., BAULCOMBE D. C.** 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. En: *EMBO J* 17:6739-6746
- BUCHER E., SIJEN T., DE HAAN P., GOLDBACH R., PRINS M.** 2003. Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions En: *J Virol* 77:1329-36
- CALVERT L. A., YENCHO C., MUÑOZ D., ARISTIZABAL D.** 1996. Epidemiología y control del virus de la Hoja Blanca (RHBV) en arroz. Programa de arroz, CIAT
- CHIVASA S., MURPHY A. M., NAYLOR M., CARRL J. P.** 1997. Salicylic acid interferes with tobacco mosaic virus replication via a novel salicylhydroxamic acid-sensitive mechanism. En: *Plant Cell* 9:547-57
- CHRISTIE S. R., PURCIFULL D. E., CRAWFORD W. E., AHMED N. A.** 1987. Electron Microscopy of negatively stained, clarified viral concentrates obtained from small tissue samples. With appendices on negative staining techniques. Boletín técnico No 872. Agricultural Experiment station. Institute of food and agricultural sciences. University of Florida
- CLARK M.F. y ADAMS A. N.** 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. En: *J Gen Virol* 34:475-483
- COVEY S. N., AL-KAFF N. S., LÁNGARA A., TURNER D. S.** 1997. Plants combat infection by gene silencing. En: *Nature* 385:781-82
- CULVER J. N.** 2002. Tobacco Mosaic Virus assembly and disassembly: Determinants in pathogenicity and resistance. En: *Annu Rev Phytopathol* 40:287-308
- DALMAY T., HAMILTON A., RUDD S., ANGELL S., BAULCOMBE D. C.** 2000. An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for post-transcriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. En: *Cell* 101:543-545
- DALMAY T., HORSEFIELD R., BRAUNSTEIN T. H., BAULCOMBE D. C.** 2001. SDE3 encodes an RNA helicase required for Post-transcriptional gene silencing in Arabidopsis. En: *EMBO J* 20:2069-2077

- DE CARVALHO NEIBEL F., FREND O P., VAN MONTAGU M., CORNELISSEN M.** 1995. Post-transcriptional cossuppression of b-1,3-glucanase genes does not affect accumulation of transgene nuclear mRNA. En: *Plant Cell* 7: 347-358
- DE MIRANDA J. R., HERNANDES M., HULL R., ESPINOSA A.** 1994. Sequence analysis of Rice Hoja Blanca Virus RNA3. En: *J Gen Virol* 75: 2127-2132
- DE MIRANDA J. R., MUNOZ M., WU R., HULL R., ESPINOZA A. M.** 1996. Sequence of rice hoja blanca tenuivirus RNA-2. En: *Virus Genes* 12:231-7
- DEHIO C., y SCHELL J.** 1994. Identification of plant genetic loci involved in a posttranscriptional mechanism for meiotically revers-ibletransgene silencing. En: *Proc Natl Acad Sci* 91:5538-42
- DOUGHERTY W. G., LINDBO J. A., SMITH H. A., PARKS T D., SWANEY S., PROEBSTING W. M.** 1994. RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. En: *Mol plant-microbe interact* 7:544-52
- DUNOYER P., PFEFFER S., FRITSCH C., HEMMER O., VOINNET O., RICHARDS K. E.** 2002. Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by peanut clump virus. En: *Plant J* 29:555-67
- ELBASHIR S. M., HARBORTH J., LENDECKEL W., YALCIN A., WEBER K., TUSCHL T.** 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. En: *Nature* 411:494-8
- ELMAYAN T. y VAUCHERET H** 1996. Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. En: *Plant J* 9:787-97
- ENGLISH J. J. BAULCOMBE D. C.** 1997. The influence of small changes in transgene transcription on homology-dependent virus resistance and gene silencing. En: *Plant J* 12:1311-18
- FAGARD M., BOUTET S., MOREL J. B., BELLINI C., VAUCHERET H.** 2000. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. En: *Proc Natl Acad Sci* 97:11650-54
- FAGARD M., y VAUCHERET H.** 2000. Systemic silencing signal(s). En: *Plant Mol Biol* 43(2-3):285-293
- FALK B. W y TSAI J. H.** 1998. Biology and molecular biology of viruses in the genus Tenuivirus. En: *Annu Rev Phytopathol* 36: 139-163
- GALVEZ G. E., THURSTON H. D., JENNINGS P. R.** 1961. Host range and insect transmission of the hoja blanca disease of rice. En: *Plant Disease Rep* 45: 949-53
- GUO H. S., DING S. W.** 2002. A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. En: *EMBO J* 21:398-407
- HAMILTON A. J. y BAULCOMBE D. C.** 1999. A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants. En: *Science* 286:950-2
- HAMILTON A., VOINNET O., CHAPPELL L., BAULCOMBE D.C.** 2002. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J* 21:4671-9
- HAMMOND S. M., BERNSTEIN E., BEACH D., HANNON G. J.** 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. En: *Nature* 404:293-96
- HAMMOND-KOSACK K. E. y JONES J. D.** 1996. resistance gene-dependent plant defense responses. En: *Plant Cell* 8: 1773-1791
- HAMMOND-KOSACK K. E. y JONES J. D.** 1997. Plant disease resistance genes. En: *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:575-607
- HAN Y. y GRIERSON D.** 2002. The influence of inverted repeats on the production of small antisense RNAs involved in gene silencing. En: *Mol Genet Genomics* 267:629-35
- HARRISON B. D., MAYO M. A., BAULCOMBE D. C.** 1987. Virus resistance in transgenic plants that express Cucumber mosaic virus satellite RNA. En: *Nature* 328:799-802
- HEATH M. C.** 2000. Hypersensitive response-related death. En: *Plant Mol Biol* 44(3):321-34
- HULL R.** 2002. Matthews' Plant Virology. Cuarta edición. Academic Press
- JENNINGS P. R.** 1963. Estimating yield loss in rice caused by hoja blanca. En: *Phytopath* 53:492

- JI L. H., DING S. W.** 2001. The suppressor of transgene RNA silencing encoded by Cucumber mosaic virus interferes with salicylic acid-mediated virus resistance. En: *Mol Plant Microbe Interact* 14:715-724
- JORGENSEN R. A., ATKINSON R. G., FORSTERR. L. S., LUCAS W. J.** 1998. An RNA-Based Information Superhighway in Plants. En: *Science* 279:1486-87
- KOOTER J. M., MATZKE M. A., MEYER P.** 1999. Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. En: *Trends Plant Sci* 4: 340-347
- KUMPATLA S. P., CHANDRASEKHARAN M. B., LYER L. M., LI G., HALL T. C.** 1998. Genome intruder scanning and modulation systems and transgene silencing. En: *Trends Plant Sci* 3: 97-104
- LAM E., KATO N., LAWTON M.** 2001. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. En: *Nature* 411:848-53
- LAMB C. y DIXON R. A.** 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. En: *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:251-75
- LENTINI Z., LOZANO I., TABARES E., FORY L., DOMÍNGUEZ J., CUERVO M., CALVERT L.** 2003. Expression and inheritance of hypersensitive resistance to rice hoja blanca virus mediated by the viral nucleocapsid protein gene in transgenic rice. En: *Theor Appl Genet.* En impresión
- LI H., LI W. X., DING S. W.** 2002. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. En: *Science* 296:1319-21
- LINDBO J. A., SILVA-ROSALES L., PROEBSTING W. M., DOUGHERTY W. G.** 1993. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants; implications for regulation of gene expression and virus resistance. En: *Plant Cell* 5: 1749-1759
- LLAVE C., KASSCHAU K. D., CARRINGTON J. C.** 2000. Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. En: *Proc Natl Acad Sci* 97:13401-13406
- LLAVE C., KASSCHAU K. D., RECTOR M. A., CARRINGTON J. C.** 2002. Endogenous and Silencing-Associated Small RNAs in Plants. En: *Plant Cell* 14:1605-19
- LUCY A. P., GUO H. S., LI W. X., DING S. W.** 2000. Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. En: *EMBO J* 19:1672-1680
- MALLORY A. C., ELY L, SMITH T. H., MARATHE R., ANANDALAKSHMI R., FAGARD M., VAUCHERET H., PRUSS G., BOWMAN L., VANCE V. B.** 2001. HC-Pro Suppression of Transgene Silencing Eliminates the Small RNAs but Not Transgene Methylation or the Mobile Signal. En: *Plant Cell* 13:571-83
- MARTIN G. B.** 1999. Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. En: *Curr Opin Plant Biol* 2:273-79
- MATZKE A. J. M. y MATZKE M. A.** 1998. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. En: *Curr Opin Plant Biol* 1:142-148
- MEINS F.** 2000. RNA degradation and models for post-transcriptional gene-silencing. En: *Plant Mol Biol* 43:261-73
- MOORE C. J., SUTHERLAND P. W., FORSTER R. L., GARDNER R. C., MACDIARMID R. M.** 2001. Dark green islands in plant virus infection are the result of post-transcriptional gene silencing. En: *Mol Plant Microbe Interact* 14:939-946
- MORALES F. J. y NIESSEN A. I.** 1983. Association of spiral filamentous viruslike particles with Rice Hoja Blanca. En: *Phytopathology* 73: 971-974
- MORALES F. J. y NIESSEN A. I.** 1985. Rice Hoja Blanca Virus. En: *AAB Description of Plant Viruses* No 229
- MOREL J. B., GODON C., MOURRAIN P., BÉCLIN B., BOUTET S., FEUERBACH F., PROUX F., VAUCHERET H.** 2002. Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. En: *Plant Cell* 14:629-639
- MOURRAIN P., BECLIN C., ELMAYAN T., FEUERBACH F., GODON C., MOREL J. B., JOUETTE D., LACOMBE A. M., NIKIC S., PICAULT N., REMOUE K., SANIAL M., VO T. A.,**

- VAUCHERET H.** 2000. Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for post-transcriptional gene silencing and natural virus resistance. En: *Cell* 101:533-542
- MURPHY A. M. y CARR J. P.** 2002. Salicylic Acid Has Cell-Specific Effects on Tobacco mosaic virus Replication and Cell-to-Cell Movement. En: *Plant Physiol* 128:552-63
- NAPOLI C., LEMIEUX C., JORGENSEN R. A.** 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into Petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. En: *Plant Cell* 2:279-289
- NAYLOR M., MURPHY A. M., BERRY J. O., CARR J.** 1998. SA can induce resistance to plant virus movement. En: *Mol Plant Microbe Interact* 11:860-68
- PALAUKAITIS P. y ZAILTLIN M.** 1997. Replicase-mediated resistance to plant virus disease. En: *Adv Virus Res* 48:349-377
- PALAUQUI J. C. y VAUCHERET H.** 1998 Transgenes are dispensable for the RNA degradation step of cosuppression. En: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:9675-9680
- PAPAEFTHIMIOU I., HAMILTON A., DENTI M., BAULCOMBE D. C., TSAGRIS M., TABLER M.** 2001. Replicating Potato Spindle Tuber Viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. En: *Nucleic Acids Res* 29:2395-400
- PINTO Y.M., KOK R.A., BAULCOMBE D.C.** 1999. Resistance to rice yellow mottle virus (RYMV) in cultivated African rice varieties containing RYMV transgenes. En: *Nat Biotechnol* 17:702-7
- PLASTERK R. A.** 2002. RNA silencing: The genome immune system. En: *Science* 296:1263-65
- PLASTERK R. H. y KETTING R. F.** 2000. The silence of the genes. En: *Curr Opin Genet Dev* 10:562-567
- PRUSS G., GE X., SHI X. M., CARRINGTON J. C., VANCE V. B.** 1997. Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. En: *Plant Cell* 9:859-868
- RAMIREZ B. C. y HAENNI A. L.** 1994. The molecular biology of tenuiviruses. A remarkable group of plant viruses. En: *J Gen Virol* 75: 467-475
- RAMIREZ B. C., LOZANO I., CONSTANTINO L. M., HAENNI A. L., CALVERT L. A.** 1993. Complete nucleotide sequence and coding strategy of Rice Hoja Blanca Virus RNA4. En: *J Gen Virol* 74: 2463-2468
- RAMIREZ B. C., MACAYA G., CALVERT L. A., HAENNI A. L.** 1992. Rice Hoja Blanca Virus genome characterization an expression in vitro. En: *J Gen Virol* 73: 1457-1464
- RATCLIFF F. G., HARRISON B. D., BAULCOMBE D. C.** 1997. A Similarity Between Viral Defense and Gene Silencing in Plants. En: *Science* 276:1558-1560
- RATCLIFF F. G., MACFARLANE S. A., BAULCOMBE D. C.** 1999. Gene silencing without DNA. RNA-mediated cross-protection between viruses. En: *Plant Cell* 11:1207-1216
- RUIZ M. T., VOINET O., BAULCOMBE D. C.** 1998. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. En: *Plant Cell* 10:937-46
- RYALS J. A., NEUENSCHWADER U. H., WILLITS M. G., MOLINA A., STEINER H., Y HUNT M. D.** 1996. Systemic Acquired Resistance. En: *Plant Cell* 8: 1809-19
- SAMBROOK J., FRITSCH E. F., MANIATIS T.** 1989. Molecular Cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Segunda edición
- SANINT L. R Y WOOD S.** 1997. Impact of rice research in Latin America and the caribbean during the past three decades. En: Impact of Rice resarch. Editado por Pingali P. y Hossain M. International Rice Research Institute
- SCHIEBEL W., PELISSIER T., RIEDEL L., THALMEIR S., SCHIEBEL R., KEMPE D., LOTTSPEICH F., SANGER H. L., WASSENEGGER M.** 1998. Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. En: *Plant Cell* 10:2087-2101
- SIJEN T. y KOOTER J. M.** 2000. Post-transcriptional gene silencing: RNA's on the attack or on the defense?. En: *Bioassays* 22: 520-531

- SILHAVY D., MOLNAR A., LUCIOLI A., SZITTYA G., HORNYIK C., TAVAZZA M., BURGYAN J.** 2002. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. En: *EMBO J* 21:3070-80
- SZITTYA G. y BURGYAN J.** 2001. Cymbidium Ringspot Tombusvirus coat protein coding sequence acts as an avirulent RNA. En: *J Virol* 75:2411-20
- SZITTYA G., MOLNÁR A., SILHAVY D., HORNYIK C., BURGYÁN J.** 2002. Short defective interfering RNAs of Tombusviruses are not targeted but trigger Post-transcriptional gene silencing against their helper virus. En: *Plant Cell* 14:359-72
- TAKEDA A., SUGIYAMA K., NAGANO H., MORI M., KAIDO M., MISE K., TSUDA S., OKUNO T.** 2002. Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus. En: *FEBS Lett* 532:75-9
- TEPFER M.** 2002. Risk assessment of virus-resistant transgenic plants. En: *Annu Rev Phytopathol* 40:467-91
- THOMAS C. L., JONES L., BAULCOMBE D. C., MAULE A. J.** 2001. Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. En: *Plant J* 25:417-425
- THORDAL-CHRISTENSEN H., ZHANG Z., WEY Y., COLLINGE D. B.** 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. En: *Plant J* 11:1187-94
- TSUNODA S. Y TAKAHASHI N.** 1984. Biology of Rice. Japan Scientific Societies Press. Tokyo. Primera edición
- VAISTIJ F. E., JONES L., BAULCOMBE D. C.** 2002. Spreading of RNA Targeting and DNA Methylation in RNA Silencing Requires Transcription of the Target Gene and a Putative RNA-Dependent RNA Polymerase. En: *Plant Cell* 14:857-67
- VAN BLOKLAND R., VAN DER GEEST N., MOL J. N. M., KOOTER J. M.** 1994. Transgene-mediated suppression of chalcone synthetase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. En: *Plant J* 6:861-877
- VAN DER KROL A. R., MUR L. A., BELD M., MOL J. N., STUITJE A. R.** 1990. Flavonoid genes in *Petunia*: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. En: *Plant Cell* 2:291-299
- VOINNET O.** 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. En: *Trends Genet* 17:449-59
- VOINNET O., LEDERER C., BAULCOMBE D. C.** 2000. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. En: *Cell* 103:157-167
- VOINNET O., PINTO Y. M., BAULCOMBE D. C.** 1999. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. En: *Proc Natl Acad Sci* 96:14147-14152
- WIT P. J. y JOOSTEN M. H.** 1999. Avirulence and resistance genes in the *Cladosporium fulvum*-tomato interaction. En: *Curr Opin Microbiol* 2:368-73
- XIE Z., FAN B., CHEN C., CHEN Z.** 2001. An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. En: *Proc Natl Acad Sci* 98:6516-6521

ANEXOS

A. Resumen

Las plantas de arroz transformadas con el gen de la nucleoproteína del Virus de la Hoja Blanca del Arroz (RHBV), presentan ausencia del RNA mensajero derivado del transgén y una recuperación de la infección, características descritas en la resistencia a virus mediada por RNA. Algunas de las líneas muestran lesiones tardías, semejantes a reacciones de hipersensibilidad. Con el fin de encontrar evidencias moleculares que permitan esclarecer los mecanismos de la resistencia transgénica al Virus de la Hoja blanca se utilizaron diferentes metodologías. Por medio de Northern blot para RNA total y de bajo peso molecular, se detectó respectivamente, la inhibición de la acumulación de los RNAs virales con homología al transgén y la presencia de moléculas de RNA indicadoras del silenciamiento post-transcripcional de genes. También, por detección de peróxido de hidrógeno, se comprobó el desarrollo de reacciones de hipersensibilidad en las plantas resistentes.

Teniendo en cuenta todas las evidencias encontradas, se puede inferir que en las plantas estudiadas la resistencia está mediada por dos mecanismos diferentes, el silenciamiento del transgén y las reacciones de hipersensibilidad, y que ambas se complementan en el control del virus.

Palabras claves:

Arroz, Virus de la Hoja Blanca del Arroz, Plantas transgénicas, Silenciamiento post-transcripcional de genes, Reacciones de hipersensibilidad, Resistencia.

B. Abreviaciones

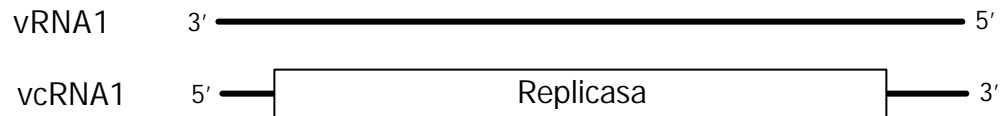
°C:	Grados centígrados
µg:	Microgramos
µL:	Microlitros
<i>avr</i> :	Gen de avirulencia
C8:	Variedad Cica 8
cDNA:	DNA copia
CMV:	<i>Cucumber Mosaic Virus</i> : Virus del mosaico del cohombro
CP:	<i>Capsid protein</i> : Proteína de cápside
DEPC:	Dietil-piro-carbonato
DNA:	Siglas en inglés del Ácido desoxiribonucleico
dNTPs:	Deoxinucleótidos trifosfatos
dsRNA:	<i>Double strand RNA</i> : RNA de doble cadena
DTT:	Ditiotreitol
EDTA:	Ácido Etilen-diamino-tetra-acético
g:	Gramos
G:	Gravedades
H ₂ O ₂ :	Peróxido de Hidrógeno
Hc-Pro:	Componente ayudador-Proteinasa
HDGS:	<i>Homology dependent gene silencing</i> : Silenciamiento de genes dependiente de homología
HR:	<i>Hypersensitive Reaction</i> : Reacción de hipersensibilidad
<i>Hrp</i> :	<i>Hypersensitive reaction and pathogenesis</i> : De reacción de hipersensibilidad y patogénesis
I:	Inoculado

IR:	<i>Intergenic region</i>
K:	Kilodalton
Kb:	Kilobases
KCl :	Cloruro de Potasio
LRR:	<i>Leucine-rich repeat</i> : Repeticiones ricas en leucina
LZ:	<i>Leucine zipper</i> : Ziper de leucina
M :	Molaridad
mg:	Miligramos
MgCl ₂ :	Cloruro de Magnesio
ML:	Mililitros
MP:	<i>Movement protein</i> : Proteína de movimiento
mRNA:	RNA mensajero
MSPV:	<i>Maize Stripe Virus</i> : Virus del rayado del maíz
N:	No inoculado
NBS:	<i>Nucleotide binding site</i> : Sitio de unión a nucleótidos
ng:	Nanogramos
nm:	Nanómetros
NO:	Óxido Nitroso
nt :	Nucleótidos
OD:	Densidad óptica
ON:	<i>Over night</i>
ORF:	<i>Open reading frame</i> : Marco abierto de lectura
pb:	Pares de bases
PCD:	<i>Programmed cell death</i> : Muerte celular programada
PCR :	<i>Polimerase Chain reaction</i> : Reacción en cadena de la polimerasa
PR:	<i>Pathogenesis-Related genes</i> : Genes relacionados con patogénesis
PTGS:	<i>Post-transcriptional gene silencing</i> : Silenciamiento post-transcripcional de genes

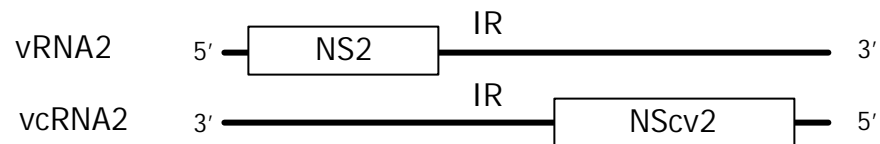
R:	Gen de resistencia
RdRp:	<i>RNA dependent RNA polymerase</i> : RNA polimerasa dependiente de RNA
RHBV :	<i>Rice Hoja Blanca Virus</i> : Virus de la hoja blanca del arroz.
RISC:	<i>RNA-induced silencing complex</i> : Complejo de silenciamiento inducido por RNA
RNA:	Siglas en inglés del Ácido ribonucleico
RNAi:	<i>RNA interference</i> : Interferencia del RNA
ROS:	<i>Reactive oxygen species</i> : Radicales oxidativos
rpm:	Revoluciones por minuto
RSV :	<i>Rice Stripe Virus</i> : Virus del rayado del arroz
RT-PCR :	<i>Reverse Transcription – PCR</i>
SA:	<i>Salicylic acid</i> : Ácido Salicílico
SAR:	<i>Systemic acquired resistance</i> : Resistencia sistémica adquirida
SAS:	<i>Systemic acquired silencing</i> : Silenciamiento sistémico adquirido
SDS:	Dodecil sulfato de Sodio
siRNA:	<i>Small interfering RNA</i> : Pequeños RNAs que interfieren
SSC :	Solución salina de Citrato
TGS:	<i>Transcriptional gene silencing</i> : Silenciamiento transcripcional de genes
TIR:	<i>Toll and interleukin-1 receptor</i> : Receptor Toll y de interleuquina
TMV:	<i>Tobacco Mosaic Virus</i> : Virus del mosaico del tabaco
TVMV :	<i>Tobacco Vein Mottling Potyvirus</i> : Potivirus del moteado de las venas del tabaco
u:	Unidades
UV:	Luz ultravioleta
v/v:	Volumen a volumen

C. Genoma de RHBV

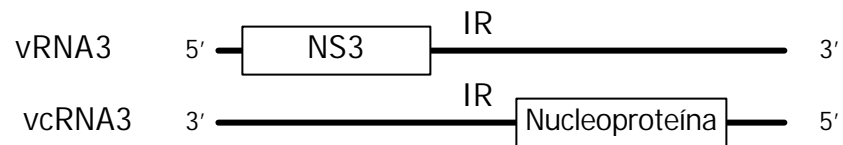
RHBV RNA1



RHBV RNA2



RHBV RNA3



RHBV RNA4

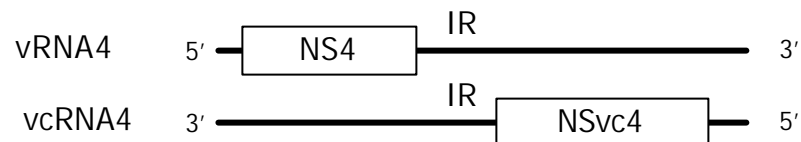


Figura C.1. Representación esquemática del genoma de RHBV. Representación no a escala de los diferentes RNAs virales de RHBV, con las ORFs que codifican. IR: *Intergenic Region*.

D. Mapa del clon pVR3 y la localización de los primers

pVR3

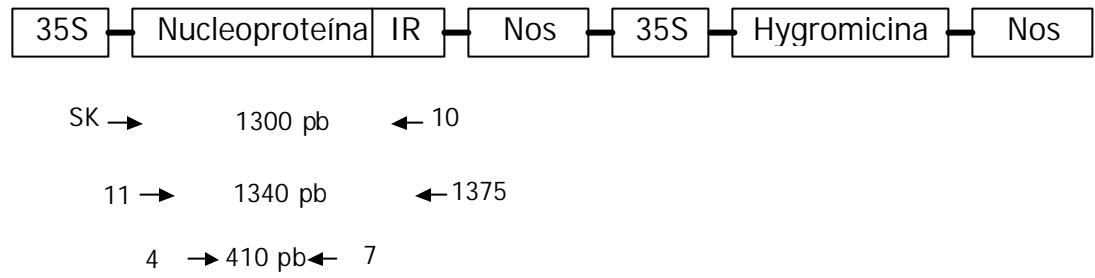


Figura D.1. Representación esquemática del constructo usado para la transformación de las plantas de arroz. Representación no a escala de la construcción usada para la transformación (Lentini *et al*, 2003). La localización aproximada de los sitios donde se alinean los primers y los productos obtenidos por PCR se muestran en la figura.

E. Preparación de las soluciones stock

Buffer Fosfato Salino (PBS) 5X

NaCl	8	g
KCl	0.2	g
Na ₂ HPO ₄	1.44	g
KH ₂ PO ₄	0.24	g
Ajustar el pH a 7.4		
Volumen final	1	L

TAE 10 X

Trizma base	96.8	g
Ácido Acético glacial	22.8	mL
EDTA 0.5 M pH 8.0	40	mL
Volumen final	1	L

TBE 10X

Trizma base	108	g
Ácido Bórico	55	g
EDTA 0.5 M pH 8.0	40	ml
Volumen final	1	L

SSC 20X

NaCl	175.3	g
Citrato de Sodio	88.2	g
Ajustar pH 7,0 con HCl		
Volumen final	1	L

F. Datos de las lecturas de DAS-ELISA

Tabla F-1. Datos completos de las lecturas de DAS-ELISA para las plantas evaluadas.

Planta	C8 V			57 V			31 V		
	13 días	27 días	41 días	13 días	27 días	41 días	13 días	27 días	41 días
1	0.000	0.362	0.089	0.001	0.369	0.210	0.421	0.349	0.063
2	0.129	0.717	0.359	0.148	0.927	0.014	0.553	0.523	0.164
3	0.000	1.093	0.395	0.478	0.720	0.213	0.000	0.752	0.248
4	0.000	0.005	0.878	0.275	0.155	0.049	0.000	0.744	0.297
5	0.002	1.261	0.468	0.000	0.009	0.003	0.675	0.903	0.849
6	0.000	0.920	0.164	0.000	0.216	0.301	0.640	.	0.671
7	0.000	1.151	0.764	0.000	0.377	0.012	0.001	0.222	0.078
8	0.070	0.458	0.771	0.000	0.350	0.671	0.116	0.325	0.874
9	0.101	0.650	0.671	0.027	0.436	0.566	0.366	0.579	1.060
10	0.697	0.710	0.685	0.560	0.206	0.298	0.001	0.752	0.933
11	0.000	0.761	0.816	0.272	0.130	0.022	0.462	0.830	0.265
12	0.704	0.743	0.466	0.030	0.189	0.000	0.304	0.234	0.203
13							0.360	0.342	0.352

Los números representan el valor de la lectura de DAS-ELISA, para cada planta en Absorbancia.