

**Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
Departamento de Plantas
Laboratorio de Virología Vegetal**

Tesis en opción al grado científico
de Doctor en Ciencias Biológicas

**Plantas transgénicas de tomate (*Solanum
lycopersicon* L.) resistentes a *Tomato yellow leaf curl
virus* mediante la producción de ARNi específico del
gen asociado a la replicación viral**

Autor: Alejandro Divo Fuentes Martínez

Tutores: Dr. Pedro Luis Ramos
Dra. Marta Álvarez



Ciudad de La Habana

2008

LISTA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	12
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	Características de la familia Geminiviridae.	18
2.1.1	Ciclo replicativo geminiviral. Aspectos moleculares y fisiológicos de la replicación de los begomovirus.	20
2.1.2	Particularidades de Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV).	24
2.2	Complejo mosca blanca-TYLCV; actualización de los métodos para su control.	25
2.3	Desarrollo de plantas de tomate resistentes a los geminivirus. Bases de la resistencia de las plantas a los virus.	27
2.3.1	Apuntes sobre la resistencia natural contra los begomovirus.	31
2.3.2	Descripción de las fuentes de resistencia en tomate contra TYLCV.	33
2.3.3	Estrategias moleculares para el control de los begomovirus.	35
2.3.3.1	Resistencia derivada del patógeno.	36
2.3.3.2	Resistencia no derivada del virus.	42
2.4	Silenciamiento génico, mediado por ARN de interferencia (ARNi).	42
2.4.1	Amplificación y diseminación sistémica del silenciamiento.	45
2.4.2	Aplicaciones biotecnológicas del silenciamiento por ARNi.	46
2.5	Cultivo de tejidos y transformación genética del tomate (<i>Solanum lycopersicon</i> L.).	47
3	MATERIALES Y METODOLOGÍAS.	51
3.1	MATERIALES.	51
3.1.1	Cepas bacterianas.	51
3.1.2	Variedades de tomate.	51
3.1.3	Medios para el cultivo de bacterias.	51
3.1.4	Medios para el cultivo de células y tejidos vegetales.	51
3.1.5	Soluciones.	52
3.1.6	Enzimas, cebadores para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y otros reactivos.	53
3.1.7	Plasmidios.	53
3.2	METODOLOGÍAS	53
3.2.1	Técnicas básicas para la manipulación y análisis del ADN.	53
3.2.1.1	Estimación de la concentración de ADN en las preparaciones.	53

3.2.1.2	Transformación de <i>Escherichia coli</i> . _____	54
3.2.1.3	Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . _____	54
3.2.1.4	Aislamiento y purificación de ADN. _____	54
3.2.1.5	Hibridación de ADN (ensayo tipo <i>Southern blot</i>). _____	54
3.2.2	Técnicas de análisis y manipulación de ARN. _____	55
3.2.2.1	Tratamiento especial de soluciones y materiales para el trabajo con ARN. _____	55
3.2.2.2	Aislamiento de ARN total. _____	55
3.2.2.3	Estimación de la concentración de ARN en las preparaciones. _____	55
3.2.2.4	Purificación de ARN de pequeño tamaño o ARNi. _____	56
3.2.2.5	Preparación de la muestra de ARN para la corrida. _____	56
3.2.2.6	Hibridación de ARN (ensayo tipo <i>Northern blot</i>). _____	56
3.2.3	Metodologías desarrolladas para la realización de los objetivos de este trabajo. _____	57
3.2.3.1	Demostración de la capacidad de replicación de TYLCV-[CU] en células de tabaco de la línea NT1. _____	57
3.2.3.1.1	Obtención y mantenimiento de una suspensión a partir de la línea celular de tabaco NT1. _____	57
3.2.3.1.2	Transfección de TYLCV-[CU] en células de tabaco de la línea NT1. _____	57
3.2.3.1.3	Análisis de la replicación de TYLCV-[CU] en células NT1. _____	58
3.2.3.2	Obtención de un dímero de TYLCV-[CU]. _____	58
3.2.3.2.1	Demostración de la replicación de TYLCV-[CU] a partir del dímero de TYLCV-[CU] (construcción p2TYL) en plantas de tomate variedad Campbell 28. _____	59
3.2.3.3	Desarrollo de construcciones génicas para el silenciamiento del gen <i>c1</i> de TYLCV-[CU] (pPZP <i>c1</i> antisentido, pPZP <i>c1</i> antisentidoI2 <i>c1</i> y pCambia3300 <i>c1</i> antisentidoI2 <i>c1</i>). _____	59
3.2.3.4	Obtención de líneas celulares transgénicas de NTI que porten la construcción <i>c1</i> antisentido. _____	60
3.2.3.4.1	Análisis de la presencia de la construcción <i>c1</i> antisentido en las células NTI mediante la técnica de PCR. _____	60
3.2.3.5	Análisis de la inhibición de la replicación de TYLCV-[CU] en las células NTI transgénicas. _____	60
3.2.3.6	Determinación del mecanismo de inhibición de la replicación de TYLCV-[CU] en células que portan la construcción <i>c1</i> antisentido. _____	61
3.2.3.7	Obtención de plantas transgénicas de tomate var. Campbell 28 que porten las construcciones génicas <i>c1</i> antisentido y <i>hpc1</i> . _____	61
3.2.3.7.1	Establecimiento de las condiciones de regeneración de hojas cotiledonales de tomate var. Campbell 28. _____	61
3.2.3.7.2	Transformación de hojas cotiledonales de tomate var. Campbell 28. _____	61

3.2.3.7.2.1	Ajuste de la concentración óptima de <i>Agrobacterium</i> y el tiempo de cocultivación para la transformación de los cotiledones. Ensayo de un pretratamiento y dos temperaturas en la cocultivación.	62
3.2.3.7.2.2	Determinación del antibiótico apropiado para la eliminación de <i>A. tumefaciens</i> después de la cocultivación con los explantes cotiledonales.	62
3.2.3.7.3	Obtención de plantas transgénicas de tomate.	62
3.2.3.7.4	Selección de las líneas transgénicas de tomate para la realización de la inoculación viral.	63
3.2.4	Análisis de la inhibición de la multiplicación de TYLCV-[Cu] en plantas transgénicas de tomate variedad Campbell 28.	63
3.2.4.1	Inoculación viral mediada por la mosca blanca.	64
3.2.4.2	Análisis de la presencia viral en plantas inoculadas con TYLCV-[CU] mediante un ensayo ELISA.	64
3.2.5	Demostración de la resistencia frente a TYLCV-[CU] de los clones transgénicos de tomate.	64
3.2.5.1	Análisis de la presencia del genoma viral en plantas inoculadas, mediante la hibridación tipo <i>dot-blot</i> .	64
3.2.6	Demostración de la resistencia contra TYLCV-[CU] del clon transgénico 126 en comparación con variedades tolerantes y resistentes obtenidas por mejoramiento tradicional.	65
3.2.7	Análisis del rendimiento productivo en parcela experimental del clon 126 inoculado con TYLCV-[CU].	65
3.3	Biometría.	65
4	RESULTADOS	67
4.1	Desarrollo de construcciones para el silenciamiento génico post-transcripcional del gen <i>c1</i> de TYLCV-[CU]. Demostración de la funcionalidad de la construcción que contiene <i>c1</i>antisentido en células de tabaco de la línea NT1.	67
4.1.1	Demostración de la capacidad de replicación de TYLCV-[Cu] en células de tabaco de la línea NT1. Obtención de un dímero de TYLCV.	67
4.1.1.1	Obtención de un dímero de TYLCV-[CU].	69
4.1.1.2	Demostración de la replicación de TYLCV-[CU] a partir de la construcción p2TYL (dímero de TYLCV-[CU]).	70
4.1.2	Desarrollo de construcción <i>c1</i> antisentido (pPZPc1antisentido).	71
4.1.3	Desarrollo de la construcción <i>hpc1</i> (pPZPc1antisentidoI-2c1).	72
4.1.4	Obtención de líneas celulares de NT1 transgénicas que porten la construcción <i>c1</i> antisentido.	72
4.1.5	Inhibición de la replicación de TYLCV-[CU] en las células NT1 transgénicas.	72
4.1.5.1	Demostración del mecanismo de inhibición de la replicación de TYLCV-[CU] en las líneas de NT1 transgénicas.	73

4.2	Obtención de plantas de tomate transgénicas de la variedad Campbell 28 que porten las construcciones <i>cI</i>antisentido y <i>hpc1</i>. Caracterización biológica y molecular de estas plantas.	74
4.2.1	Establecimiento de las condiciones de regeneración de la variedad de tomate Campbell 28.	74
4.2.2	Optimización de un protocolo de transformación para la variedad de tomate Campbell 28 mediante el uso del vector <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	76
4.2.2.1	Ajuste de la concentración óptima de <i>A. tumefaciens</i> y el tiempo de cocultivación para la transformación de los cotiledones.	76
4.2.2.1.1	Selección de una temperatura para la cocultivación con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	78
4.2.2.2	Determinación del antibiótico a utilizar para la eliminación de <i>A. tumefaciens</i> durante la selección de las células transformadas del cotiledón.	79
4.2.3	Obtención de plantas transgénicas de la variedad Campbell 28 que contienen las construcciones <i>cI</i> antisentido y <i>hpc1</i> mediante el uso de la kanamicina como agente de selección. Análisis de la eficiencia de transformación de la variedad Campbell 28.	80
4.2.4	Caracterización biológica y molecular de las plantas transgénicas de tomate resistentes a kanamicina que portan las construcciones <i>cI</i> antisentido y <i>hpc1</i> .	81
4.2.4.1	Análisis de la inhibición de la multiplicación de TYLCV-[Cu] en plantas transgénicas de tomate variedad Campbell 28.	81
4.2.4.2	Demostración de la resistencia frente a TYLCV-[CU] de los clones transgénicos de tomate.	83
4.2.4.3	Demostración de la resistencia contra TYLCV-[CU] del clon transgénico 126 en comparación con variedades tolerantes y resistentes obtenidas por mejoramiento tradicional.	85
4.2.4.4	Análisis de la integración de las construcciones <i>cI</i> antisentido y <i>hpc1</i> en el genoma de las plantas transgénicas de tomate.	86
4.2.4.5	Demostración del mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional en las plantas resistentes a TYLCV-[CU].	88
4.2.5	Análisis del rendimiento productivo en parcela experimental del clon 126 inoculado con TYLCV-[CU].	88
4.2.6	Obtención de plantas transgénicas de la variedad Campbell 28 que contienen la construcción <i>hpc1</i> -Basta mediante el uso del glufosinato de amonio como agente de selección. Análisis de la eficiencia de transformación de la variedad Campbell 28 en condiciones de selección con glufosinato de amonio.	92
4.2.7	Caracterización biológica y molecular de las plantas transgénicas de tomate resistentes a glufosinato de amonio que portan la construcción <i>hpc1</i> -Basta.	93
4.2.7.1	Análisis de la multiplicación de TYLCV-[Cu] en plantas transgénicas de tomate resistentes a glufosinato de amonio.	93

4.2.7.2	Análisis de la integración de la construcción <i>hpc1</i> -Basta en el genoma de las plantas transgénicas de tomate.	94
4.2.7.3	Demostración del mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional en las plantas resistentes a TYLCV-[CU] portadoras del gen <i>bar</i> .	94
5	DISCUSIÓN	96
5.1	El silenciamiento génico post-transcripcional del gen <i>c1</i> inhibe la replicación de TYLCV-[CU] <i>in vitro</i>.	97
5.1.1	La línea celular de tabaco NT1 constituye un sistema apropiado para la replicación de TYLCV-[CU].	97
5.1.2	Las líneas transgénicas de NT1 que portan la construcción <i>c1</i> antisentido generan ARNi específicos del gen <i>c1</i> .	99
5.1.3	Las líneas NT1 transgénicas que producen ARNi complementario al gen <i>c1</i> inhiben la replicación de TYLCV.	101
5.2	El silenciamiento génico post-transcripcional de <i>c1</i> protege las plantas transgénicas de tomate variedad Campbell 28 de la infección por TYLCV.	102
5.2.1	La variedad de tomate Campbell 28 muestra una eficiencia de transformación baja, dependiente de la eficiencia de regeneración del tejido cotiledonal.	103
5.2.2	Las plantas transgénicas de tomate var. Campbell 28 que producen una horquilla de ARN, a partir de la secuencia sentido y antisentido del gen <i>c1</i> , inhiben la replicación de TYLCV-[CU].	109
5.2.3	Las líneas del tomate transgénico 126 no acumulan TYLCV-[CU], mientras que las variedades tolerantes o resistentes obtenidas por mejoramiento convencional muestran diferentes niveles de acumulación viral.	113
5.2.4	Las plantas de tomate transgénicas inmunes a TYLCV-[CU] produjeron significativamente mayor cantidad de tomates en comparación con las plantas susceptibles.	113
5.3	El gen <i>bar</i>- una alternativa al gen <i>nptII</i> como marcador de selección en la transformación de tomate. Obtención de plantas de tomate inmunes a TYLCV que portan el gen de resistencia al herbicida Basta.	115
5.3.1	Obtención de plantas de tomate transgénicas que portan la construcción <i>hpc1</i> -Basta mediante la selección de los transformantes en glufosinato de amonio.	116
5.3.2	Las plantas de tomate var. Campbell 28, transformadas con <i>hpc1</i> -Basta, inhiben la replicación de TYLCV-[CU].	117
5.3.3	Las plantas derivadas del clon B1 poseen dos copias del transgén y producen ARNi específico del gen <i>c1</i> .	117
5.3.3.1	El mecanismo de producción de ARNi, específico del gen <i>c1</i> , en los clones B1 y 126 parece ser el mismo.	117

6	CONCLUSIONES	119
7	RECOMENDACIONES.	120
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
9	ANEXOS	149
10	AUTOBIBLIOGRAFIA	151

SÍNTESIS

Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV, constituye la mayor afectación para la producción de tomate a nivel mundial. Las plantas de tomate que se infectan por TYLCV desarrollan hojas con tamaños reducidos y encrespadas, con los bordes cloróticos o moteados de amarillo, muestran abscisión floral y enanismo severo. Como consecuencia, las plantas producen pocos frutos o ninguno. TYLCV está definido en el género *Begomovirus* de la familia *Geminiviridae*, se transmite por la mosca blanca y su genoma está constituido por una molécula de ADN de cadena sencilla. En Cuba la alta incidencia de las afectaciones provocadas por TYLCV ocasionó la pérdida de campos completos de tomate y la proscripción de las variedades susceptibles a principios de la década de los 90. Entre estas variedades susceptibles, la Campbell 28, reconocida por su versatilidad para su procesamiento industrial y para el consumo como fruta fresca, ocupaba el 50% del territorio destinado al cultivo del tomate. En el presente trabajo se describe la obtención de plantas de tomate de la variedad Campbell 28 inmunes a TYLCV, además, la caracterización biológica y molecular de estas plantas. Se demostró en un sistema de células de tabaco que un diseño génico, dirigido a la formación de una molécula de ARN de dos cadenas, que contiene la secuencia del gen de la proteína asociada a la replicación de TYLCV (*c1*), induce el silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) del gen *c1* y, como consecuencia, provoca la inhibición de la replicación de TYLCV. Se desarrolló una metodología eficiente para la obtención de plantas transgénicas de tomate de la variedad Campbell 28 y se demostró la superioridad del gen *bar* como marcador de selección en la transformación de tomate en comparación con el gen *nptII*. Mediante la aplicación de la metodología de transformación para Campbell 28 se produjeron plantas transgénicas de tomate con el diseño génico que produce una horquilla de ARN, constituida por dos cadenas de ARN derivadas de la secuencia del gen *c1*, las cuales alcanzaron un estado de inmunidad contra la infección por TYLCV a través del mecanismo de PTGS. Se demostró la utilidad de estas plantas en la conservación de la producción de tomates a escala de parcela experimental y en condiciones de inoculación de TYLCV en comparación con las plantas Campbell 28 no transgénicas. Como resultado, se obtuvieron plantas de tomate de la variedad Campbell 28 inmunes a TYLCV con sendos marcadores de selección (*nptII* y *bar*).

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Lista de abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNdc	ADN de doble cadena
ADNsc	ADN de cadena sencilla
ARN	ácido ribonucleico
ARNdc	ácido ribonucleico de doble cadena
ARNi	ácido ribonucleico de interferencia
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
cc	Cadena complementaria
cv	Cadena viral
CIGB	Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
CENSA	Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria
CP	Proteína de la cápside, del inglés "Coat Protein"
dc	doble cadena
INCA	Instituto Nacional de Ciencia Agrícola
INISAV	Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal
Kb	Kilopares de bases
Kan	Kanamicina
MIP	Manejo integrado de plagas
MLA	Marco de lectura abierto
MP	Proteína de movimiento, del inglés "Movement Protein"
NSP	Proteína transportadora nuclear, del inglés "Nuclear Shutter Protein"
nt	nucleótidos
pb	pares de bases
pRb	proteína supresora del retinoblastoma
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular, del inglés "Proliferating Cellular Nuclear Antigen"
PTGS	Silenciamiento génico posttranscripcional, del inglés "Posttranscriptional Gene Silencing"
RC	Región común
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RDP	Resistencia derivada del patógeno
RDR	ARN polimerasa dependiente del ARN
PDS	Fitoeno desaturasa
REn	Proteína potenciadora de la replicación del inglés "Replication Enhancement"
Rep	Proteína asociada a la replicación, del inglés "Replication-associated protein"
RI	Región intergénica

Lista de abreviaturas y acrónimos

RI	Repetida invertida
RIP	Proteínas inhibidoras de los ribosomas
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN
sc	simple cadena
Spm	Espectinomicina, del inglés "Spectinomycin"
Str	Estreptomicina, del inglés "Streptomycin"
T-ADN	ADN de transferencia
TGS	Silenciamiento génico transcripcional
Ti	Inductor de tumores
TrAP	Proteína transactivadora, del inglés "Trans-activator Protein"
VIGS	Silenciamiento inducido por virus

Lista de acrónimos

Los nombres y acrónimos de los virus que a continuación se listan y que se emplean en el documento, se han conservado en la forma en la que están registrados por el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV, siglas en inglés), por lo que estos representan los nombres científicos de estas especies. Siguiendo las normas del ICTV (Fauquet y Stanley, 2005), el nombre de aquellos miembros definitivos de cada género se han escrito en *itálico*.

AbMV	<i>Abutilon mosaic virus</i>
ACMV	<i>African cassava mosaic virus</i>
AIMV	<i>Alfalfa mosaic virus</i>
BCTV	<i>Beet curly top virus</i>
BDMV	<i>Bean dwarf mosaic virus</i>
BGMV	<i>Bean golden mosaic virus</i>
BGYMV	<i>Bean golden yellow mosaic virus</i>
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CuLCV	<i>Cucurbit leaf curl virus</i>
PHYVV	<i>Pepper huasteco yellow vein virus</i>
PVX	<i>Potato virus X</i>
PYMTV-TT	<i>Potato yellow mosaic Trinidad virus</i> aislado de Trinidad y Tobago
TBRV	<i>Tomato black ring virus</i>
TCV	<i>Turnip crinkle virus</i>
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TGMV	<i>Tomato golden mosaic virus</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
ToLCV	<i>Tomato leaf curl virus</i>
ToLCNDV	<i>Tomato leaf curl New Delhi virus</i>
ToLCTWV	<i>Tomato leaf curl Taiwan virus</i>
ToMHV	<i>Tomato mosaic Havana virus</i>
ToMoTV	<i>Tomato mottle Taino virus</i>
ToMoV	<i>Tomato mottle virus</i>
ToYMV	<i>Tomato yellow mottle virus</i>
TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i>
TYLCSV	<i>Tomato yellow leaf curl Sardinia virus</i>
TYLCV	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>

Lista de abreviaturas y acrónimos

TYLCV[CU]	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> aislado de Cuba
TYLCV[IL]	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> aislado de Israel
TYTV	<i>Tomato yellow top virus</i>
WDV	<i>Wheat dwarf virus</i>

1 INTRODUCCIÓN

El begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV, causa la enfermedad del encrespamiento y amarillamiento de la hoja del tomate (del inglés “*tomato yellow leaf curl disease*”), y es el patógeno que representa el mayor peligro para la producción de tomate a nivel mundial (Czosnek y Laterrot, 1997). La amplia diseminación y las pérdidas cuantiosas que provoca TYLCV han obligado al desarrollo de diferentes estrategias para su control. Estas estrategias se han dirigido principalmente a la exclusión del insecto transmisor *Bemisia tabaci* Gennadius y a la utilización de variedades de tomate tolerantes o resistentes a este patógeno. Sin embargo, cualquiera de las vías propuestas hasta el momento no han sido 100% efectivas. Una alternativa es la obtención de plantas de tomate inmunes a la infección por TYLCV y con ello contribuir a la eliminación de esta enfermedad en las plantaciones de tomate.

Las plantas de tomate que se infectan por TYLCV desarrollan hojas con tamaños reducidos y encrespadas, con los bordes cloróticos o moteados de amarillo, y muestran abscisión floral y enanismo severo. Como consecuencia, las plantas producen pocos frutos o ninguno. Si las plantas son infestadas en etapas tempranas de su desarrollo la producción de frutos es nula. Los síntomas de esta enfermedad son similares a los causados por otras ocho especies de begomovirus. No obstante, TYLCV sobresale por su agresividad, afectación económica y amplia distribución (Alvarez, 1995; Anupam V., 2003; Arsenio, 2001; Fauquet y Stanley, 2005; Gianessi, 2003; Mason, 2000; Noris y col., 1994; Picó y col., 1996; Polston y Anderson, 1997; Sanchez-Campos, 1999).

Desde el punto de vista taxonómico TYLCV está definido en el género *Begomovirus* de la familia *Geminiviridae*, la cual agrupa a otros tres géneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus* y *Topocuvirus*. Los géneros se distinguen atendiendo a la gama de hospedantes, la organización genómica y al tipo de insecto que emplean como vector (Matthews, 1979; van Regenmortel y col., 2000). Los virus de esta familia se caracterizan por presentar genomas de ADN circular, de cadena simple, con tallas entre 2.5 y 3 Kb, y por ser encapsidados en partículas gemelas. Los miembros del género *Begomovirus* se transmiten por la mosca blanca, infectan plantas dicotiledóneas y sus genomas están constituidos por una o dos moléculas de ADN (monopartitos o bipartitos, respectivamente). Los virus de los restantes géneros son monopartitos. Los curtovirus y los topocuvirus infectan plantas dicotiledóneas y los mastrevirus infectan principalmente a monocotiledóneas. Los miembros de estos tres géneros se transmiten por varias especies de saltahojas (*Nesocluta tenellus*, *Circulifer tenellus*, etc.).

Con anterioridad a la década del 90 del siglo XX, se prestó poca atención a los geminivirus porque afectaban esporádicamente a los cultivos de importancia económica (Moffat, 1999). Sin embargo, el establecimiento de la agricultura extensiva y el intercambio de productos agrícolas sin rigor fitosanitario contribuyeron a la propagación de estos patógenos y en especial de uno de sus vectores, la mosca blanca (*Homóptera: Aleyrodidae*). Este insecto es una especie que exhibe polimorfismo biótico y los diferentes biotipos son indistinguibles morfológicamente (Brown, 2000; Jones, 2003). Este insecto se alimenta de más de 500 especies vegetales, que pertenecen a 74 familias. Entre los biotipos definidos, el B se caracteriza por su agresividad, fitotoxicidad y por potenciar la dispersión de los begomovirus. Este biotipo se reproduce abundantemente en plantas de tomate (Schuster y col., 1990). Es probable que esta característica propiciara la infección de los cultivos de tomate con nuevas especies de geminivirus.

En algunos países de clima templado, como Inglaterra, Bélgica y Holanda, el cultivo de tomate se realiza en casas de cultivo cerradas. Contrariamente, en países como Italia, España, Grecia y otros, donde una parte de la producción se realiza a cielo abierto, ha sido necesario el empleo de mallas para excluir la mosca blanca de las plantaciones de tomate y la aplicación de insecticidas. Estas prácticas, sin embargo, no han solucionado las afectaciones en su totalidad (Gianessi, 2003), y la aplicación reiterada de insecticidas ha inducido la aparición de insecto-resistencia (Cahill y col., 1996; De Barro, 1995).

En los últimos años se ha puesto en práctica el uso de plantas resistentes al TYLCV. Estas plantas se han logrado obtener por dos vías: una es la introducción del carácter de resistencia contra TYLCV, proveniente de especies silvestres de tomate, hacia variedades comerciales mediante el cruzamiento y la selección por la vía sexual (Friedmann y col., 1998; Gómez y col., 2004; Pilowsky y Cohen, 1990; Zakay y col., 1991); y la otra vía, es la incorporación de fragmentos de genes del genoma de TYLCV en el genoma del tomate mediante la aplicación del concepto de la resistencia derivada del patógeno (RDP) (Antignus y col., 2004; Beachy, 1997; Bendahmane y Gronenborn, 1997; Kunik y col., 1994; Sanford y Johnston, 1985; Yang y col., 2004). Ambas vías, independientemente de sus ventajas y desventajas, han dado como resultado la producción de plantas asintomáticas a la infección por TYLCV. Sin embargo, solamente por la vía de la RDP se ha logrado la inhibición total de la replicación del virus. Las plantas de tomate transgénicas obtenidas portan un diseño génico que, posiblemente, induce silenciamiento post-transcripcional (del inglés *post-transcriptional gene silencing*, o PTGS) del gen viral que codifica para la proteína asociada a la replicación (*c1*) (Yang y col., 2004). Las plantas de tomate inoculadas no acumularon genoma viral en sus tejidos.

Descubierto por primera vez en las plantas donde se conoció como silenciamiento génico post-transcripcional, el silenciamiento del ARN o el ARN de interferencia (ARNi) ocurre en una amplia variedad de organismos eucariontes (Tijsterman y col., 2002; Ullu y col., 2004). El PTGS es un mecanismo que se induce a partir de precursores de ARN de dos cadenas (ARNds) que varían en tamaño y origen. Estos ARNds son procesados en ARNds de menor tamaño que oscilan entre 21 y 28 pares de nucleótidos, los cuales más adelante guían la degradación o la inhibición traduccional de un ARN complementario que puede ser un ARN mensajero de cadena sencilla o el genoma de un virus. El ARNi también puede estar implicado en la dirección del proceso de modificación de la cromatina, que conlleva a la inactivación del proceso de transcripción a partir de la secuencia modificada (Lippman y Martienssen, 2004).

Una de las formas más efectivas de estimular PTGS se realiza mediante la producción de una molécula de doble cadena de ARN en forma de horquilla (del inglés "*hairpin RNA*") (Smith y col., 2000). Esta estructura favorece la formación de dos cadenas de ARN unidas en su extensión por puentes de hidrógeno. La producción de moléculas de este tipo ha permitido la estimulación del silenciamiento de diferentes genes, algunos de origen viral, alcanzando silenciamiento génico en el 90-100% de las plantas transgénicas (Smith y col., 2000).

En Cuba las enfermedades asociadas a geminivirus se detectaron a partir del año 1987, y su aparición se asoció al aumento de las poblaciones de mosca blanca en cultivos de importancia económica, así como en diferentes especies de malezas (Cordero y col., 2003; Domínguez y col., 2002; Echemendía y col., 2001; Echemendía y col., 2003; Echemendía y col., 2004; Ramos y col., 2002). La alta incidencia de esta enfermedad ocasionó la pérdida de campos completos de tomate y la proscripción de las variedades susceptibles. Entre estas variedades susceptibles, la Campbell 28, reconocida por su versatilidad para su procesamiento industrial y para el consumo como fruta fresca, ocupaba el 50% del territorio destinado al cultivo del tomate (Gómez y col., 2004). El agente causal de este desastre se identificó como TYLCV-[CU] (Ramos y col., 1996), aunque otros dos begomovirus se identificaron en los campos de tomate: ToMHV (*Tomato mosaic Havana virus*) (Martínez y col., 1997) y ToMoTV (*Tomato mottle Taino virus*) (Ramos y col., 1997). Hacia mediados de los años 90 la epifitía causada por TYLCV se detectó en todo el territorio cubano. En la actualidad se considera que este patógeno es la principal causa de la disminución del rendimiento en las cosechas de tomate en nuestro país y se estimó que las pérdidas pueden alcanzar el 100% de la cosecha cuando se utilizan variedades susceptibles (Gómez y col., 2004).

En Cuba se desarrollan diferentes acciones dirigidas al control del complejo mosca blanca-geminivirus que afecta al cultivo del tomate. Los centros de investigación como el Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), el Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova", el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), el Instituto Nacional de Ciencia Agrícola (INCA) y el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) en conjunto, y en coordinación con el Ministerio de la Agricultura, realizan investigaciones para minimizar los daños ocasionados por TYLCV. La detección y la caracterización biológica y molecular de las especies geminivirales, la búsqueda de reservorios naturales, la identificación de fuentes de resistencia y la introducción de variedades resistentes han constituido la base para el manejo integrado del cultivo de tomate frente a esta enfermedad. Entre los avances más notorios se considera la obtención e introducción en la agricultura cubana de la variedad Vyta (Gómez y col., 2004). Esta variedad muestra sólo un 12% de infestación en plantaciones a cielo abierto y una acumulación viral que oscila desde 90 pg hasta 1 ng por mg de tejido (Gómez y col., 2004). Hasta la fecha no existen variedades comerciales de tomate que sean inmunes a TYLCV. Si bien la capacidad de las plantas de tolerar o resistir la enfermedad resulta en un incremento significativo para la producción, la multiplicación y acumulación del virus en las plantas tolerantes las convierte en fuente para la infección de cultivos de tomate susceptibles. De igual forma en estas plantas existe la posibilidad de ocurrencia de la recombinación entre diferentes aislados o especies begomovirales presentes en el cultivo, lo que puede originar nuevas cepas virales con diferente grado de agresividad (García-Andrés y col., 2006; Navas-Castillo y col., 2000; Padidam y col., 1999; Pita y col., 2001; Saunders y col., 2002). Sobre la base de los resultados promisorios obtenidos por la aplicación de la Ingeniería Genética, la resistencia derivada del patógeno y específicamente la estimulación del silenciamiento génico post-transcripcional, y considerando la situación del tomate en nuestro país con relación a TYLCV, se propuso un proyecto para desarrollar plantas de tomate inmunes a esta enfermedad.

Para la realización de este trabajo se formuló la siguiente **hipótesis**: la producción de ARNi específico del gen *c1* de TYLCV-[CU] en plantas transgénicas de tomate puede provocar la inmunidad a este patógeno.

En consecuencia se propusieron los siguientes objetivos:

1. Demostrar previamente, en un sistema celular, la inhibición de la replicación de TYLCV-[CU] mediante el silenciamiento génico post-transcripcional del gen *c1* de TYLCV-[CU].

2. Obtener plantas transgénicas de tomate variedad Campbell 28 que porten las construcciones génicas para el silenciamiento génico post-transcripcional del gen *c1* de TYLCV-[CU].
3. Caracterizar biológica y molecularmente las plantas transgénicas de tomate que portan las construcciones para el silenciamiento del gen *c1*.

Para cumplir con los objetivos trazados se realizaron las siguientes tareas:

1. Construcción de un dímero del genoma de TYLCV-[CU] capaz de replicarse en células de tabaco.
2. Aislamiento del gen *c1* de TYLCV-[CU] y obtención de un diseño génico que provoque la formación de doble cadena de ARN a partir de su secuencia.
3. Análisis de la replicación de TYLCV-[CU] en líneas celulares de tabaco transgénicas que porten la construcción para provocar el silenciamiento génico post-transcripcional del gen *c1*.
4. Establecimiento de un procedimiento para la transformación genética del tomate variedad Campbell- 28.
5. Obtención de plantas transgénicas de tomate variedad Campbell 28 que porten las construcciones génicas para estimular el silenciamiento génico post-transcripcional del gen *c1*.
6. Evaluación de las líneas transgénicas de tomate en condiciones de inoculación con TYLCV-[CU] y determinación del grado de infección.
7. Caracterización molecular de las líneas transgénicas de tomate y confirmación del silenciamiento génico post-transcripcional del gen *c1*.
8. Comparación del comportamiento frente a la inoculación con TYLCV-[CU] de los clones transgénicos promisorios y algunas de las variedades de tomates tolerantes o resistentes a este virus, disponibles comercialmente.

La **novedad científica** de este trabajo radica en la demostración por primera vez en la Ciencia que la producción de ARNi específico del gen *c1* de TYLCV-[CU] puede provocar inmunidad a este virus en plantas transgénicas de tomate. Además, por primera vez se logra la inhibición total de la replicación de TYLCV-[CU] mediante la producción de ARNi específico del gen *c1* tanto en un sistema hospedante como no hospedante. En adición, se identificaron por única vez los factores que contribuyen a la transformación exitosa de la variedad de tomate Campbell 28, recalcitrante a la regeneración, y se demostró la potenciación de la eficiencia de transformación en esta variedad mediante el uso del glufosinato de amonio como agente de selección de los transformantes.

La **importancia teórica** de este trabajo radica en la confirmación de la efectividad de una molécula de ARN con estructura de horquilla para inducir el silenciamiento génico post-transcripcional de un gen diana; y con ello el papel determinante que juega la proteína C1 involucrada en la replicación de TYLCV. Se demuestra la suficiencia del silenciamiento del gen *c1* para inhibir eficientemente la replicación de este patógeno.

Se establece una metodología mediante el uso de un sistema celular para el estudio de la replicación de TYLCV.

La **importancia práctica** de este trabajo se deriva en primer lugar, de la factibilidad de combatir al TYLCV y por ende elevar los rendimientos o proteger las plantaciones de tomate en condiciones de inoculación con este patógeno, mediante el empleo de la transgénesis y las herramientas de la Biología Molecular. En segundo lugar, se cuenta con dos clones transgénicos de tomate inmunes a TYLCV, uno de los cuales posee un marcador molecular de la inmunidad fácil de aplicar a los programas de mejoramiento de variedades. Tercero, se demuestra la posibilidad de contar con un sistema modelo para el desarrollo de construcciones génicas que afecten la replicación de TYLCV, y de igual manera para el análisis de la interacción de TYLCV con la célula vegetal. Cuarto, se describe un protocolo para la obtención de plantas transgénicas de tomate para la variedad Campbell 28 recalcitrante a la regeneración, que promueve la producción de plantas transgénicas con una eficiencia comparable a la descrita para variedades con alto potencial regenerativo. Se establece una metodología para la evaluación de plantas de tomate inmunes a TYLCV.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características de la familia Geminiviridae.

Geminiviridae es una familia de virus vegetales que contienen como material genético ADN. Sus miembros se caracterizan por poseer genomas de una o dos cadenas sencillas de ADN circular cerradas covalentemente, de talla entre 2,5 y 3 Kb ($0,7$ a $0,9 \times 10^6$ g/mol) (Goodman, 1977; Harrison y col., 1977; Lazarowitz y col., 1992). Estas moléculas se conocen como cadenas virales. Los productos génicos están codificados en la cadena viral (cv) o en la cadena complementaria (cc), la cual se genera durante el proceso replicativo.

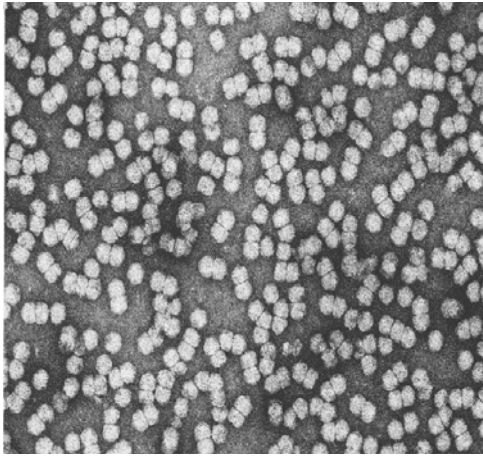


Figura 1. Fotografía de una preparación de viriones de TYLCV observada al microscopio electrónico. Cortesía del Dr. R. G. Milne. Instituto de Fitovirología Aplicada, Italia.

Los genomas geminivirales están empaquetados en dos partículas de morfología única, gemelas y pareadas (Figura 1), que aparentan dos icosaedros incompletos de tamaño 18x20 nm cada uno (Franki y col., 1980; Hatta y Franki, 1979).

Los síntomas característicos de la infección por geminivirus pueden consistir en la decoloración foliar (amarillamientos o dorados con patrones de mosaicos, moteados o rayados), el enanismo, el enrollamiento o el encrespamiento foliar, la reducción del área foliar, la abscisión floral y la reducción del tamaño de los frutos. Éstos pueden presentarse aislados o combinados. Los síntomas producidos por una especie geminiviral pueden

variar de una a otra planta atendiendo a la especie hospedante y a la edad fisiológica en la que ocurre la infección. Las diferencias también pueden aparecer dentro de una misma combinación virus-planta sometida a diferentes condiciones ambientales.

Los geminivirus se agrupan en cuatro géneros sobre la base de su organización genómica, la gama de plantas hospedantes y el insecto transmisor (Fauquet y col., 2000; Fauquet y col., 2003; Rybicki y col., 2000; van Regenmortel y col., 2000). Aquellos que son monopartitos (contienen una molécula de ADN) y que se transmiten por salta hojas, principalmente a plantas monocotiledóneas, están incluidos en el género *Mastrevirus*. El tamaño de sus genomas es de 2.5-3.0 kb y contienen dos marcos abiertos de lectura en la cadena viral y dos en la complementaria, con una región intergénica larga y otra corta (Figura 2). *Maize streak virus* es el miembro tipo de este género (Bock y col., 1974; Fauquet y col., 2003; Harrison y col., 1977); provoca la enfermedad del rayado de la hoja del maíz, que es una de las enfermedades más viejas y económicamente más devastadora

en las plantaciones de maíz en el África Sub-Sahariana. En ocasiones este virus provoca hasta un 100% de pérdidas en los rendimientos (Thottappilly, 2003). Los virus que tienen un genoma monopartito con cuatro marcos abiertos de lectura en la cadena viral y tres en la complementaria, y que son transmitidos por salta hojas a plantas dicotiledóneas, pertenecen al género *Curtovirus* (Figura 2). *Beet curly top virus* es la especie tipo de este

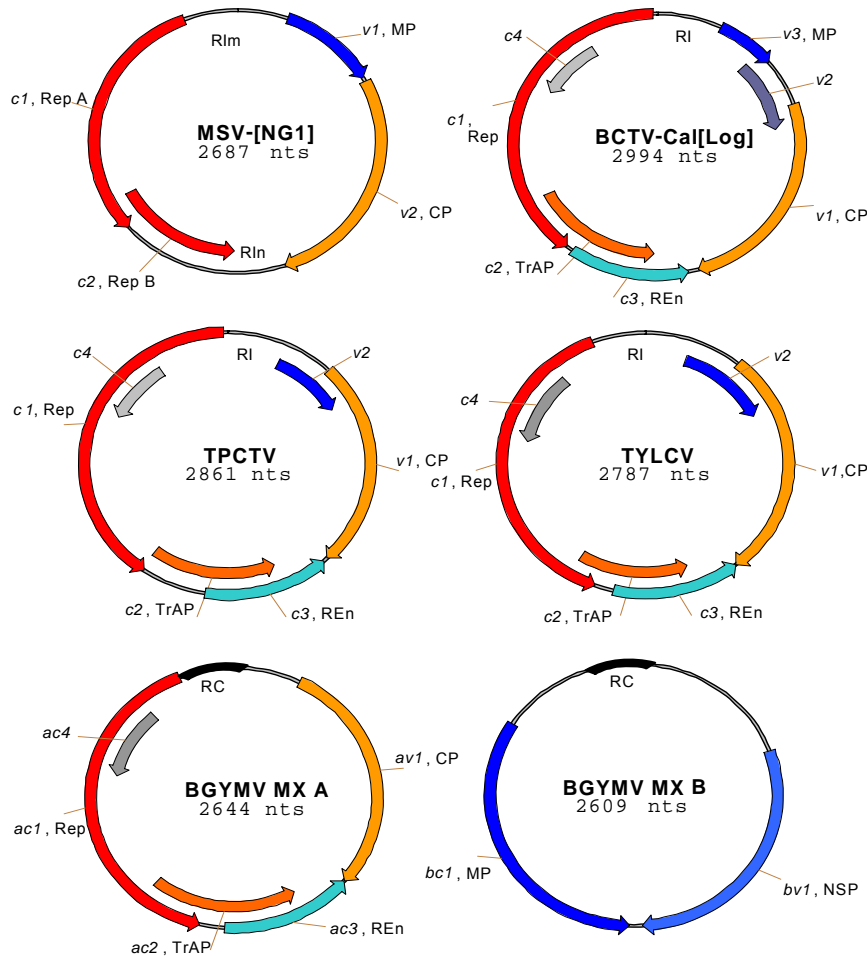


Figura 2. Esquema que representa los genomas de los virus miembros tipo de cada género de la familia *Geminiviridae* y del begomovirus monopartito TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*). MSV-NG1 (*Maize streak virus-Nigeria, Mastrevirus*), BCTV-Cal[Log] (*Beet curly top virus-California Logan, Curtovirus*), TPCTV (*Tomato pseudo-curly top virus, Topocuvirus*) y BGYMV-MX (*Bean golden yellow mosaic virus-Mexico, Begomovirus*). Debajo de cada acrónimo se señala el número de nucleótidos de cada molécula de ADN simple cadena. Las flechas indican los marcos de lectura abiertos y en cada caso se señalan el nombre del gen (en *italico*) y de la proteína codificada (igual color significa proteínas con funciones equivalentes). RI: Región intergénica, RIm: RI mayor, RIIn: RI menor y RC: Región común.

género. Se conoce que este virus enferma el cultivo de la remolacha, y constituye también un serio problema en la actualidad para otros cultivos como el ají (*Capsicum annum* L.), el melón (*Cucumis melo* L.), el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), la espinaca (*Spinacia oleracea* L.) y algunas plantas ornamentales. Se ha

observado que las infecciones tempranas provocadas por este virus conllevan a una muerte prematura (Brunt y col., 1996). Otro género, el *Topocuvirus*, el más recientemente reconocido por la Comisión Internacional de Taxonomía de Virus, tiene un único miembro - *Tomato pseudo-curly top virus* (Pringle, 1999). Este geminivirus presenta un genoma monopartito con cuatro marcos abiertos de lectura en la cadena viral y dos en la complementaria, y se transmite por salta árboles (*Micrutalis malleifera* Fowler) a plantas dicotiledóneas. Finalmente, el género *Begomovirus*, cuyos miembros se transmiten por diferentes biotipos de la mosca blanca (también conocida como mosca del boniato, mosca del tabaco o mosca del algodón) *Bemisia tabaci* (Gennadius) a plantas dicotiledóneas, agrupa aproximadamente al 80% de los geminivirus conocidos hasta el momento. La mayoría de los miembros de este género contienen genomas bipartitos designados como ADN A y ADN B: en el componente A se localizan uno o dos marcos abiertos de lectura en la cadena viral y cuatro en la complementaria, mientras que en el componente B se encuentra un marco abierto de lectura en cada una de las cadenas (Harrison y Robinson, 1999). A este género pertenece el *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). Este virus es el único miembro monopartita del género *Begomovirus* y provoca la enfermedad del amarillamiento y encrespamiento de la hoja del tomate ampliamente diseminada por todo el planeta. Su único componente genómico contiene las mismas funciones que el componente A de los begomovirus bipartitas (Figura 2).

2.1.1 Ciclo replicativo geminiviral. Aspectos moleculares y fisiológicos de la replicación de los begomovirus.

Una vez que los begomovirus son inoculados en las células de la planta por el vector *Bemisia tabaci*, se sucede una serie de interacciones específicas entre el virus y el hospedante que provoca el desarrollo de la infección. Primeramente, ocurre el movimiento del virus al núcleo, donde ocurre la replicación y transcripción del genoma viral. El movimiento de la partícula viral, mediado por la interacción con elementos interconectados dentro de la célula, parece depender por completo de la proteína de la cápside (CP) (Gafni y Epel, 2002).

La cariofilia demostrada por varias proteínas CP geminivirales y su capacidad de transportar ADNsc desde el citoplasma al núcleo, permitieron determinar que en esta primera etapa ella y otros factores del hospedante son los responsables del movimiento viral. El sitio y los mecanismos que propician el desnudamiento del virión y el grado de desnudamiento de la partícula viral al llegar al poro nuclear están por descubrir. El siguiente paso es el proceso de replicación, el cual ocurre dentro del núcleo mediante la estrategia de círculo rodante: el hospedante lleva a cabo la síntesis de la cadena complementaria y el ADN de dos cadenas

(ADNdc) se asocia a algunas histonas del hospedante y se forman los llamados minicromosomas (Abouzeid y col., 1988). La forma replicativa, de dos cadenas de ADN circular, es activa para la transcripción e inmediatamente se expresan los genes tempranos (*c1*, *c2*). Después de sintetizada la proteína Rep (C1 para begomovirus monopartita, o AC1 para bipartitas), la replicación para la generación de la progenie y la transcripción ocurren de manera simultánea y probablemente en el nucleolo (Rojas y col., 2001). El producto del gen *ac1* en los virus bipartitos, o su homólogo en los monopartitos es la única proteína viral esencial para la replicación (Elmer y col., 1988). Debido a que AC1 lleva a cabo la replicación de ambos componentes, A y B, en la región común a ambos virus se encuentran las señales necesarias para iniciar este proceso. Se ha demostrado que una región de 90 nucleótidos (nts), que comprende una estructura en forma de tallo y 60 nts ubicados hacia el extremo 5' de la región común interviene en el proceso de reconocimiento del molde por la AC1 (Orozco y Hanley-Bowdoin, 1996). La región de 60 nts contiene segmentos altamente conservados, no solamente en secuencia sino también en arreglo y espaciamiento, entre geminivirus relacionados geográficamente. Los segmentos repetidos llamados iterones son los sitios de unión de la replicasa y son específicos para la mayoría de las especies geminivirales (Arguello-Astorga y col., 1994).

El hecho de que la secuencia TAATATTAC, conservada en todos los geminivirus, presenta homología con la secuencia de reconocimiento y corte de la proteína A del fago ϕ X174 condujo a proponer un modelo de replicación para los geminivirus basado en la replicación de plásmidos bacterianos y fagos que presentan ADN simple cadena (Koonin y Ilyina, 1992). Una vez que el genoma viral está en forma bicatenaria, la Rep se une específicamente a la región de los iterones e interactúa con moléculas proteicas del potenciador REn (AC3) (Fontes y col., 1994b; Fontes y col., 1994a; Gutierrez y col., 2004; Laufs y col., 1995a; Orozco y col., 1997; Settlage y col., 1996; Sunter y col., 1994). Por otro lado, otras moléculas del potenciador se sitúan sobre la horquilla. Luego se produce una interacción proteína-proteína entre moléculas de REn y de esta forma la Rep se acerca a la secuencia TAATATTAC, donde esta última produce un corte para iniciar la replicación (Laufs y col., 1995a). El extremo 3' resultante es utilizado por la Rep como cebador para la síntesis de la cadena naciente. El extremo 5' producido permanece unido a la replicasa viral hasta que se ha sintetizado una cadena completa, momento en que se produce un nuevo corte y los extremos de la cadena desplazada son ligados antes de ser liberada (Laufs y col., 1995b). Por otra parte, a partir del análisis de las características del ADN generado por la infección de geminivirus se identificó otra vía por la cual el genoma geminiviral se multiplica, la de replicación dependiente de la recombinación (Jeske y col., 2001; Preiss y Jeske, 2003). El

mecanismo de este proceso no se ha dilucidado aún con precisión, pero sí se le concede un papel determinante en la formación de nuevas variantes de geminivirus durante la evolución de éstos.

La activación de la síntesis de los genes de la cadena viral, como son el *av1*, el *bv1*, el *v1* y otros, según el género del que se trate, propicia la movilización del ADN progenie desde el núcleo de la célula primaria hacia las contiguas. Los virus tienen la propiedad de diseminarse sistémicamente a células que se encuentran distantes del sitio de inoculación. Los tipos de células y tejidos que son infectados definen una propiedad viral que se conoce como tropismo viral (Fields y col., 1996). Mientras que en los sistemas animales el tropismo viral está determinado por la ausencia o presencia de receptores de superficie en las células dianas, el ingreso de los virus vegetales a la planta se realiza a través de heridas en la pared celular y en la membrana plasmática, y ocurre solamente en la célula "puerta de entrada". Todos los demás movimientos en estos sistemas suceden por la vía simplástica. Éstos ocurren a través de los plasmodesmos, canales preexistentes en la célula vegetal. Los efectos citopáticos de la infección por geminivirus se han observado tanto en células de los tejidos vasculares como en las del mesófilo (Jeske y col., 1977; Kim y Fulton, 1984). El tropismo tisular de una especie geminiviral dada puede variar de acuerdo al hospedante, pero por lo general se cree que la mayoría de las especies son confinadas al tejido vascular. No obstante, un número creciente de estudios permitió conocer con exactitud la preferencia tisular de varios geminivirus y demuestra que los geminivirus bipartitos pueden exhibir patrones de tropismo tisular muy diversos (Wege y col., 2001). Así, *Abutilon mosaic virus* (AbMV) es estrictamente restringido al floema incluso en *Nicotiana benthamiana* (hospedante muy permisivo), mientras que *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) y *African cassava mosaic virus* (ACMV) dejan de serlo en el transcurso de la infección y pueden ser detectados en todos los tipos celulares (Wege y col., 2001). Por otra parte, *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV) puede ser detectado tanto en el tejido vascular como en células de varios tejidos del mesófilo en *Nicotiana benthamiana* y en su hospedante natural, el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) (Wang y col., 1996). Los begomovirus monopartitos *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) y *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) son confinados al floema en tomate y *Nicotiana benthamiana* (Morilla y col., 2004). A pesar de que se cree que las causas del tropismo de los geminivirus están determinadas genéticamente, éstas han sido poco estudiadas (Rushing y col., 1987). En el caso de TGMV, se conoce que su preferencia por el mesófilo foliar la determinan tres elementos genéticos (Morra y Petty, 2000). Una región no codificante de su genoma, la zona cuesta arriba del gen *bv1*, es esencial para este fenotipo, pero debe estar acompañada por una de dos regiones

codificantes, las zonas de los genes *ac2/ac3* o la de los genes *bc1/bv1* (Morra y Petty, 2000).

La replicación de los geminivirus ocurre en el núcleo de las células infectadas, y para ello, dependen de la maquinaria de replicación del ADN celular. La división celular activa en los vegetales está confinada a los meristemos apicales y al cambium, y por eso es de esperar que la replicación geminiviral esté restringida a esos tejidos. Sin embargo, se conoce que muchos geminivirus tienen un marcado tropismo por los tejidos vasculares, mientras otros se encuentran en los tejidos del mesófilo de las hojas, tallos y raíces, los cuales están constituidos por células que ya han transitado por un proceso de diferenciación (Sanderfoot y Lazarowitz, 1996; Wege y col., 2001). Varias evidencias indican que estos virus poseen mecanismos que reprograman el ciclo celular e inducen un ambiente nuclear similar a la fase S. La infección por TGMV induce en células maduras del hospedante la transcripción del gen que codifica para la proteína PCNA (del inglés "Proliferating Cell Nuclear Antigen"), la cual es el factor de procesatividad de la ADN polimerasa δ (Egelkroun y col., 2001). La proteína PCNA también se induce en plantas transgénicas que expresan la proteína Rep, lo que indica que ella es suficiente para la activación de la síntesis de este factor (Nagar y col., 1995). Esta propiedad de la proteína Rep está muy ligada a su capacidad de interacción con la proteína inhibidora del ciclo celular pRBR1, un homólogo de la proteína pRb (proteína supresora del retinoblastoma) en los vegetales (Kong y col., 2000). Al igual que en los animales, la activación del promotor de la proteína PCNA necesita del factor transcripcional E2F, que en las células que no se dividen está secuestrado de modo que forma un complejo con pRBR1 (Egelkroun y col., 2001). La interacción con pRb también se demostró para la proteína Rep A de los mastrevirus (Grafi y col., 1996; Liu y col., 1999; Xie y col., 1996). El dominio de unión de la proteína Rep de TGMV con pRBR se localizó entre los aa 101 y 180, mientras que en la mayoría de los mastrevirus está centralizado en el motivo LXCXE de la proteína Rep A (Arguello-Astorga y col., 2004; Kong y col., 2000; Liu y col., 1999; Xie y col., 1995). Se han identificado otras tres proteínas del hospedante: una cinasa, una cinesina y la histona H3, como dianas de la interacción con la proteína Rep de TGMV (Kong y Hanley-Bowdoin, 2002).

La reprogramación de la fase S del ciclo celular por los geminivirus trae aparejada la alteración de la arquitectura del ADN del hospedante. El ADN viral se presenta como cuerpos de inclusión en la región central del núcleo, mientras que el ADN vegetal se localiza en la periferia. En muchas células infectadas los cromosomas se observan de forma condensada, aunque al parecer no son incapacitados completamente para la transcripción y la duplicación (Nagar y col., 2002).

2.1.2 Particularidades de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV).

La enfermedad del amarillamiento y encrespamiento de la hoja del tomate (del inglés *tomato yellow leaf curl disease*) es provocada por nueve especies de TYLCV (Fauquet y Stanley, 2005). Entre estas especies se encuentran *Tomato yellow leaf curl virus*, *Tomato yellow leaf curl Axarquia virus*, *Tomato yellow leaf curl China virus*, *Tomato yellow leaf curl Guandong virus*, *Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus*, *Tomato yellow leaf curl Malaga virus*, *Tomato yellow leaf curl Mali virus*, *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* y *Tomato yellow leaf curl Thailand virus*. Las especies de TYLCV contienen un único componente genómico de aproximadamente 2.8 kb excepto *Tomato yellow leaf curl Thailand virus*, que aunque contiene dos componentes el segundo no es requerido para la infección (Rochester y col., 1994). Este único componente genómico está conformado por seis marcos abiertos de lectura (MLA) parcialmente solapados y organizados bidireccionalmente en dos unidades transcripcionales, las cuales están separadas por una región intergénica de 300 pb aproximadamente (Rybicki y col., 2000). En la cadena viral se encuentran dos MLA solapados *v1* y *v2*, mientras que en la complementaria los MLA *c1-c3* están parcialmente solapados y *c4* se encuentra dentro de *c1* (Figura 2). Las proteínas codificadas por estos MLA son: la proteína de la cápside (CP) (MLA *v1*), responsable de la encapsidación del genoma viral, e involucrada en el movimiento viral y el reconocimiento del vector; la proteína asociada a la replicación (Rep) (MLA *c1*), esencial para la multiplicación del virus; la proteína activadora de la transcripción (MLA *c2*), involucrada en la activación de la transcripción a partir del promotor del MLA *v1*; la proteína potenciadora de la replicación (MLA *c3*), la cual interactúa con la proteína Rep y potencia la acumulación del genoma viral; y los productos codificados por el MLA *v2* y *c4*, los cuales están involucrados en la manifestación de los síntomas y en el movimiento viral. La región intergénica no-codificante (RI) contiene los elementos de reconocimiento importantes para la replicación y la transcripción del genoma viral (Figura 2) (Moriones y Navas-Castillo, 2000).

Existen varios aislados de TYLCV obtenidos en diferentes regiones del mundo, los cuales se han clasificado en distintas especies según los resultados de la comparación del porcentaje de identidad de la secuencia del genoma entero (Fauquet y Stanley, 2005). Los estudios realizados con la especie TYLCV para averiguar la gama de hospedantes arrojaron que 13 especies de plantas en seis familias botánicas son susceptibles (Moriones y Navas-Castillo, 2000), entre los que se encuentran cultivos importantes como frijol (Navas-Castillo y col., 1999) y ají (*Capsicum annum* y *Capsicum chinense*) (Reina y col., 1999; Roye y col., 1999), además de tomate. Para las otras especies no se ha reportado un estudio detallado de los

posibles hospedantes, y los datos disponibles no demuestran qué requisitos o condiciones del hospedante y del virus fundamentan la especificidad de la interacción.

2.2 Complejo mosca blanca-TYLCV; actualización de los métodos para su control.

La mosca blanca es una especie que exhibe polimorfismo biótico y los diferentes biotipos son indistinguibles morfológicamente (Brown, 2000; Jones, 2003). Este insecto se alimenta de más de 500 especies vegetales, que pertenecen a 74 familias. Entre los biotipos definidos A y B, el B se caracteriza por su agresividad, por su fitotoxicidad y por potenciar la dispersión de los begomovirus. Este biotipo se reproduce abundantemente en plantas de tomate (Schuster y col., 1990). Probablemente esta característica propició la infección de los cultivos de tomate con diferentes especies de geminivirus.

TYLCV es transmitido por la mosca blanca de forma circulativa y los parámetros temporales de la transmisión están bien caracterizados (Moriones y Navas-Castillo, 2000). La transmisión óptima de TYLCV y TYLCSV, según reflejan estudios realizados utilizando diferentes fuentes de *Bemisia tabaci*, se establece después de un tiempo de adquisición de 16-24 horas seguido de un período de inoculación de 20-24 horas. En este proceso las ninfas son tan eficientes en la adquisición del virus como los adultos (Caciagli y col., 2000); no obstante, se ha descrito una disminución de la eficiencia de transmisión con el aumento de la edad del insecto (Rubinstein y Czosnek, 1997).

Por otra parte, se ha observado la transmisión trans-ovárica de TYLCV en, por lo menos, las siguientes dos generaciones en el biotipo B de *Bemisia tabaci*; y entre individuos a través de la copulación (Ghanim y col., 1998; Ghanim y Czosnek, 2000). Aunque no se han encontrado formas replicativas de TYLCV en *Bemisia tabaci* se especula que este es un patógeno de la mosca, y disminuye su expectativa de vida y la fecundidad. Mehta y colaboradores (Mehta y col., 1994) detectaron un incremento del título de TYLCV-[IL] en los individuos de la mosca blanca a través del tiempo, lo cual sugiere la ocurrencia de la replicación viral. Sin embargo, este proceso no ha sido confirmado por otros autores que investigan el mismo fenómeno sobre TYLCSV (Caciagli y col., 2000). También, se ha observado diferencia en la eficiencia de transmisión de diferentes geminivirus por *Bemisia tabaci* (McGrath y Harrison, 1995), lo cual se ha tomado como fundamento para explicar el desplazamiento de un geminivirus por otro en regiones donde se ha detectado la existencia de varias especies virales y del insecto transmisor (Sánchez-Campos y col., 1999).

Se ha demostrado que la proteína CP es esencial para la adquisición del virión por el insecto vector y determina la especificidad (Azzam y col., 1994; Briddon y col., 1990; Hofer y col., 1997; Liu y col., 1997). Se evidenció la interacción de las proteínas CP de TYLCV y de AbMV

con la proteína GroEl producida por *Buchnera* sp, una bacteria endosimbionte que habita en la hemolinfa de la mosca blanca (Morin y col., 1999; Morin y col., 2000). Para esta proteína GroEl se demostró que forma complejos *in vivo* e *in vitro* con TYLCV. Al parecer dicha interacción garantiza protección al virión durante su paso por el hemocele del insecto.

Las epifitias de TYLCV han emergido en diferentes regiones de nuestro planeta (Polston y Anderson, 1997). Estas epifitias han estado acompañadas de grandes poblaciones de mosca blanca, las cuales no ha sido posible reducir a los niveles suficientemente bajos para eliminar la transmisión de geminivirus. Este insecto, no solo transmite diferentes geminivirus a través de la succión de la savia para su alimentación, sino también debilita la planta, lo cual provoca retardo en su crecimiento normal. Además, gran parte del alimento que ingiere el insecto se secreta y sirve como medio de crecimiento de hongos de color negro del género *Cladosporium* (Arnal y col., 1991).

La aplicación frecuente de insecticidas, como estrategia ampliamente practicada para el control de *Bemisia tabaci*, origina la contaminación del medio ambiente, el surgimiento de plagas secundarias, la destrucción de sus enemigos naturales y un elevado costo de producción del tomate (Moriones y Navas-Castillo, 2000; Taylor y col., 2001). Se ha observado que estas prácticas conllevan además, a la aparición de poblaciones de moscas resistentes al pesticida y el tratamiento resulta inefectivo en lo adelante (Cahill y col., 1996; Roditakis y col., 2005). Una alternativa que ha demostrado su rentabilidad para algunos cultivadores es la utilización de mallas con poros de 50 micrómetros de abertura, combinado con aplicaciones de insecticida para la contención del insecto transmisor en el cultivo de tomate protegido (Taylor y col., 2001). Sin embargo, su empleo no es 100% eficaz contra la mosca y no permite una abundante aeración de las estructuras que encierra, lo cual provoca que se sobrecalienten (Moriones y Navas-Castillo, 2000). Así, también, el uso de mallas o cubiertas reflectoras de la luz ultravioleta ha conllevado a la disminución de las poblaciones de mosca en el cultivo (Antignus y col., 1996; Antignus y col., 1998; Antignus y et al., 2000). Las bases fisiológicas de este control mediante el reflejo de la luz ultravioleta es la presencia de fotoreceptores que funcionan precisamente en ese rango del espectro de la luz y que intervienen en la orientación de la mosca.

El estudio de la relación entre la ocurrencia de las epifitias de TYLCV con el clima, o el conocimiento de las prácticas de manejo del cultivo dentro de un sistema integral puede reducir la incidencia de este patógeno. Por ejemplo, el establecimiento de un patrón estacional de las epifitias de TYLCV, como se observó en Chipre, ayudó a la determinación del momento más apropiado para el trasplante de las posturas y evitar la infección viral (Ioannou y Iordanou, 1985). Otros autores proponen un modelo de probabilidad de clima

para la identificación en el mundo de las regiones potencialmente susceptibles de ser invadidas por el complejo *Bemisia tabaci*-begomovirus (Morales y Jones, 2004). Algunas de estas regiones potencialmente susceptibles han sido cultivadas por décadas sin experimentar las consecuencias de una invasión de este tipo. Sin embargo, la introducción de un hospedante reproductivo apropiado para *Bemisia tabaci*, la llegada de períodos extensos de sequía y la existencia de reservorios naturales de geminivirus podrían desatar la explosión de una epifitía en estas regiones (Morales y Jones, 2004).

En Cuba existen sistemas de Manejo Integrado de Plagas (MIP), los cuales presuponen la utilización óptima de diversos métodos técnicamente efectivos, económicamente viables y compatibles con el ambiente (Murguido y Vázquez, 2000). Esto incluye las acciones que favorecen un adecuado desarrollo de las plantas para lograr el máximo de productividad posible en las condiciones de infestación con plagas. En el caso específico de la mosca blanca que infesta las plantaciones de tomate se utiliza un biopreparado a base del hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii*. Su aplicación de forma regular ha permitido la recuperación de varios enemigos naturales de *Bemisia tabaci* que han estado ausentes durante años de las plantaciones debido a la indiscriminada aplicación de insecticidas nocivos (Murguido y Vázquez, 2000).

Sin embargo, todas estas prácticas descritas anteriormente, desarrolladas en diferentes regiones del mundo y en Cuba, y encaminadas al control del insecto transmisor de TYLCV no han resultado en un control eficiente de la enfermedad. Principalmente en las regiones donde la incidencia de TYLCV es alta los productores de tomate han tenido que restringir el cultivo a los meses de menor incidencia del vector, y con esto reducir las cosechas anuales y proscribir las variedades susceptibles, algunas consideradas en el pasado de gran calidad para el consumo humano e industrial. Por ende, se erige una alternativa imperiosa como complementación del manejo integrado del tomate y sus plagas: la obtención y utilización de variedades de tomate resistentes al TYLCV.

2.3 Desarrollo de plantas de tomate resistentes a los geminivirus. Bases de la resistencia de las plantas a los virus.

La resistencia de las plantas a las enfermedades se divide en dos categorías mayores: la resistencia del no hospedante y la resistencia del hospedante (Fraser, 1990). La mayoría de las especies de plantas no son hospedantes para la mayoría de los virus, por lo que no se infectan por estos. La condición de susceptibilidad a un virus es propiedad del hospedante y es la excepción de una característica general de resistencia.

Las bases de la resistencia del no hospedante pueden ser tan diversas como tan diversos pueden ser los patógenos, particularmente los virus (Mysore y Ryu, 2004). La resistencia

del no hospedante se describe generalmente para todos los miembros de una especie vegetal o para todas las especies dentro de alguna categoría taxonómica. Además de la existencia de una defensa pasiva basada en barreras físicas como son la pared celular rígida o las estructuras del citoesqueleto, las plantas exhiben mecanismos de defensa como consecuencia del metabolismo constitutivo y otros procesos que se activan después del reconocimiento del patógeno (Kirankumar y Choong-Min, 2004). El conocimiento de la vía por la cual los virus no logran infectar estas plantas podría contribuir al desarrollo de una resistencia duradera contra diversos patógenos en las plantas susceptibles. Sin embargo, esta resistencia es menos accesible genéticamente que la resistencia del hospedante (Byoung-Cheorl y col., 2005).

En muchos casos la resistencia activa, basada en la interacción de productos génicos dominantes de la planta (producidos a partir de genes de resistencia dominantes, genes R) con productos génicos virales (genes de avirulencia), se describe en el marco de la resistencia del hospedante, la cual puede ser específica de un cultivar, una accesión o una especie (Goldbach y col., 2003). Existe una docena de genes R ya caracterizados, los productos de los cuales reconocen diferentes tipos de patógenos. Estas proteínas R se categorizaron en cinco clases teniendo en cuenta los motivos que las componen y su afinidad específica por determinadas estructuras químicas, independientemente de la diversidad de patógenos existentes (Dangl y Jones, 2001). La mayoría de las proteínas R descubiertas para la resistencia contra virus, contienen un motivo rico en leucina con afinidad por grupos nucleotídicos. Sin embargo, todavía se desconoce cómo actúan los productos de estos genes R y cómo activan una respuesta efectiva contra los virus (Dangl y Jones, 2001).

El mecanismo de resistencia de la planta puede interferir con diferentes estadios del ciclo viral (Astier y col., 2001). En este sentido, las resistencias se han expresado: contra el proceso de inoculación del patógeno por el vector (Jones, 1998); en la fase tardía del crecimiento de la planta, lo cual puede contribuir a la desaparición de los síntomas declarados en la etapa temprana del desarrollo (Caranta y col., 1997); en el proceso de multiplicación viral, inhibiendo el proceso de replicación en su totalidad (inmunidad) o manteniéndolo en un nivel bajo (Gray y col., 1986); o en el proceso de movimiento del virus (Fraser, 1990). De esta manera la afectación en el desarrollo de la infección puede ocurrir a nivel de las células, los órganos de la planta, la planta individual y la población de individuos infectados.

Algunas formas de resistencia pueden reducir la severidad de los síntomas y por consiguiente las pérdidas de los rendimientos del cultivo, sin modificar la susceptibilidad de

la planta al patógeno. Este fenómeno es referido como tolerancia. En general, los mecanismos que han sustentado estos tipos de resistencia están poco estudiados, aunque se describen la reacción de hipersensibilidad, la resistencia sistémica adquirida y el silenciamiento génico inducido por el virus como posibles procesos que le permiten a las plantas resistir o tolerar diferentes patógenos virales (Lecoq y col., 2004; Staskawicz, 1995).

Desde el punto de vista genético los determinantes de la resistencia contra virus pueden estar sustentados por uno o varios genes. Por lo general se asume que la resistencia basada en la actividad de varios genes perdura en el tiempo, y no tiene un efecto antiviral cepa-específico evidente (Lindhout, 2002). Este enfoque de la resistencia o de la tolerancia, sustentada por la actividad de varios genes, tiene como ventaja el requisito de la interacción de los productos de varios genes R con varios factores de avirulencia en el virus. Por lo general el rompimiento de la resistencia a través de la aparición de varios factores de avirulencia es un evento poco probable. Sin embargo, su aplicación en programas de mejoramiento es menos frecuente debido a la complejidad de su seguimiento genético. Hasta la fecha se han enfocado pocos estudios al análisis de la herencia de la resistencia poligénica y menos aún a su transferencia a un cultivo de importancia económica (Byoung-Cheorl y col., 2005; Harrison, 2002).

El análisis de la resistencia monogénica es más usado y ha tenido mayores resultados en la caracterización de los genes involucrados. Se ha descrito en el caso de los virus que contienen genoma ARN que un simple cambio de uno o dos aminoácidos en la secuencia del gen de avirulencia puede provocar la aparición de la cepa virulenta (Moury y col., 2004), y por lo general son pocos los ejemplos de gran duración para este tipo de resistencia (Jenner y col., 2000; Jenner y col., 2002; Meshi y col., 1988). En particular estos patógenos virales están sujetos a una evolución rápida, que está relacionada con un alto nivel de mutaciones por ciclo replicativo (10^{-4}) como consecuencia de los errores de la ARN polimerasa viral por la falta de mecanismos de edición o lectura con alto grado de fidelidad (Drake y Holland, 1999). Por esta razón, los virus ARN se adaptan con facilidad a las nuevas condiciones del medio ambiente (Lecoq y col., 2004). No obstante, se han caracterizado genes que confieren una alta capacidad de resistencia frente a virus ARN. Tal es el caso de nueve genes dominantes aislados y secuenciados de *Arabidopsis thaliana* (*HRT*, *RTM1*, *RTM2*, *RCY1*) y diferentes plantas solanáceas (*N*, *Rx*, *Rx2*, *Sw5* y *Tm2²*), los cuales, después del reconocimiento del virus por un mecanismo no descubierto aún, activan una cascada de reacciones que conllevan al bloqueo de la dispersión del patógeno por toda la planta (Byoung-Cheorl y col., 2005). Excepto los genes *RTM1* y el *RTM2* los demás genes R

mencionados comparten similitudes estructurales. Estos genes codifican para una secuencia rica en leucinas y un dominio con afinidad por nucleótidos, y se destacan por conferir una resistencia duradera contra *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Padgett y col., 1997), *Potato virus X* (PVX) (Lecoq y col., 2004), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (Brommonschenkel y col., 2000) y *Tomato mosaic virus* (ToMV) (Lanfermeijer y col., 2003).

Además, se ha desarrollado otro enfoque de la resistencia sobre el análisis de los factores del hospedante indispensables para la multiplicación e invasión del patógeno. Se conoce que los virus codifican para varias proteínas que intervienen en su multiplicación y dispersión en la planta, pero son dependientes del metabolismo de la célula vegetal y algunos de sus componentes para la realización de su ciclo infectivo. La identificación y caracterización de las proteínas del hospedante en las cuales una mutación provoca la interrupción de la patogénesis viral pudiera ayudar al entendimiento del desarrollo de la infección viral, así como a la respuesta del hospedante hacia ella. Este enfoque se llamó resistencia recesiva, y, en general, involucra sólo genes que no juegan un papel determinante o dominante para el metabolismo primario de la planta. Fraser en 1992 (Fraser, 1992) señaló una tendencia de la resistencia recesiva a ser más durable sobre la base de la imposibilidad del virus de complementar la función perdida por el hospedante. Desde entonces se han identificado y caracterizado en *Arabidopsis thaliana* varios genes que, afectados por mutaciones, interfieren con el ciclo infectivo de *Beet curly top virus* (BCTV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tobacco etch virus* (TEV), *Turnip mosaic virus* (TuMV), TMV, *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), y *Turnip crinkle virus* (TCV). Estos genes pueden afectar la replicación viral, el movimiento de célula a célula y la salida hacia el tejido vascular (Byoung-Cheorl y col., 2005). Por ejemplo, el factor de la iniciación de la traducción eIF4E se identificó reiteradamente como un elemento determinante para la infección de algunos potyvirus. Aunque el papel que pudiera desempeñar el factor eIF4E o su isoforma durante la infección viral se desconoce, el efecto negativo de las mutaciones en uno de los dos sobre la infectividad de varios potyvirus en diferentes hospedantes parece ser conservado para esta familia viral (Borgstrom y Johansen, 2001; Keller y col., 1996; Keller y col., 1998; Moury y col., 2004). Con el uso del sistema de dos híbridos de levadura se ha demostrado la capacidad de unión del factor eIF4E a la proteína viral VPg (Leonard y col., 2002; Wittmann y col., 1997), la cual está covalentemente unida al extremo 5' del ARN viral, simulando, probablemente, la unión de m⁷G cap al ARNm eucarionte. En las células eucariontes eIF4E se une a m⁷G cap como primer paso para reclutar el ARN mensajero en el complejo iniciador de la traducción. Entonces, se podría sugerir una actividad similar para eIF4E cuando el potyvirus infecta la célula vegetal.

2.3.1 Apuntes sobre la resistencia natural contra los begomovirus.

El progreso alcanzado en la determinación de mecanismos de resistencia contra virus ARN ha dejado rezagado en ese sentido a los virus que contienen genoma de ADN. Existen varios estudios que han conllevado a la dilucidación de posibles fuentes de resistencia para varias enfermedades causadas por virus con genoma de ADN, particularmente por begomovirus. Entre los begomovirus más estudiados con el propósito de descubrir y explotar las fuentes de resistencia natural se destacan por su importancia económica y social aquellos que infectan la yuca (*Manihot esculenta* Crantz), el frijol y el tomate.

La yuca, ha sido objeto de estudio en esta dirección desde la década de los años veinte del siglo pasado. Los primeros trabajos consistieron en la realización de hibridaciones intraespecíficas y, más tarde, interespecíficas entre variedades tolerantes y resistentes, que permitió obtener líneas altamente resistentes contra ACMV (Cours-Darne, 1968). Como resultado se logró correlacionar algunas características fenotípicas de la planta, como el estigma rojo, la corteza gris de las raíces y la fertilidad de las flores masculinas con la resistencia a ACMV (Morales, 2001). Más tarde ocurrió que las variedades que se obtenían con resistencia en una región sucumbían en otras localidades bajo la presión de ACMV. Esto confirmó, años más tarde, la existencia de diferentes cepas y diferentes especies de lo que se consideró en un inicio ACMV (Hong y col., 1993). Además, la resistencia contra ACMV resultó ser multigénica y recesiva. En la actualidad no existen variedades comerciales de yuca inmunes a este virus, aunque sí se han desarrollado algunas con alto grado de tolerancia (Morales, 2001).

Un caso de mejores expectativas en el desarrollo de plantas resistentes a virus podría considerarse el frijol con relación a *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV). Este virus por lo general no resulta ser un problema para las plantaciones. Sólo si se siembran variedades susceptibles y en condiciones de alta incidencia de mosca blanca puede causar pérdidas significativas en los rendimientos de este cultivo (Morales y Anderson, 2001). Existen dos grandes centros de diversidad genética de frijol: uno está localizado en Centroamérica y México, mientras que el otro está situado en el sur de Latinoamérica (Perú, Bolivia y el norte de Argentina). El grupo centroamericano contiene genotipos que son resistentes a este virus mientras que la región andina no muestra presencia de resistencia (las plantas se infectan sistémicamente y desarrollan síntomas) (Wang y col., 1999). En algunos genotipos resistentes, como la variedad centroamericana "Othello", existe un mecanismo que bloquea el movimiento a larga distancia (Sudarshana y col., 1998; Wang y col., 1999), que en un inicio se asociaba a una respuesta de hipersensibilidad en el tejido vascular. Posteriormente se realizaron estudios en la variedad resistente "Black Turtle Soup" utilizando como

marcador de localización viral la proteína verde fluorescente fusionada al genoma de BDMV. Estos estudios revelaron que existe un mecanismo que bloquea el transporte a larga distancia y que la reacción de hipersensibilidad no está asociada a ello (Garrido-Ramírez y col., 2000; Wang y col., 1999). Más adelante, se determinó que en las líneas resistentes no sucede la respuesta de hipersensibilidad, mientras que en otras, que son susceptibles, encontraron algunas zonas de necrosis, lo cual es indicativo de hipersensibilidad (Seo y col., 2004). Estos datos sugieren que la respuesta de hipersensibilidad es un fenómeno secundario después de la respuesta de defensa primaria, consistente con el hecho de que la respuesta de hipersensibilidad aparece 4-5 días después de la inoculación, cuando el patógeno alcanza el sistema vascular y comienza el movimiento a larga distancia.

Para el caso de BGYMV, el cual afecta considerablemente los rendimientos de frijol en toda América del Sur y Central (Morales, 1994; Morales, 2001) se obtuvo en el Centro de Investigaciones de la Agricultura Tropical (CIAT), Colombia, la línea A429. Esta línea es altamente resistente a este patógeno (Morales y Niessen, 1988) y se convirtió en la fuente de resistencia más usada en América Latina en los programas de mejoramiento de frijol contra los begomovirus (Singh y col., 2000). Uno de los parentales de A429 (Garrapato-variedad mexicana) aporta un gen que condiciona la resistencia al mosaico, el *bgm-1* (Blair y Beaver, 1993). En este mismo estudio se determinó que algunas variedades andinas podrían aportar también resistencia a este virus. Tal fue el caso de la línea DOR303 obtenida del cruce de Porillo sintético (variedad mesoamericana) y Nube Roja, variedad de origen andino y fuente no sólo del fenotipo de frijol rojo riñón sino, también, del gen de resistencia contra BGYMV- el *bgm-2* (Velez y col., 1998). Algunas de estas variedades andinas poseen genes de resistencia a la malformación severa de la vaina inducida por BGYMV en cultivares susceptibles. Molina y Beaver, 1998 (Molina y Beaver, 1998) refirieron la presencia de un gen dominante *Bgp*, responsable de ese carácter y que requiere el producto del gen *bgm-1* para su expresión, lo cual sugiere que la resistencia podría ser potenciada por otro gen adicional. Hoy día ya se utilizan varias líneas altamente resistentes en diferentes países de América Central e incluso en varias de ellas se demostró que la replicación viral está muy restringida (Morales, 2000). Algunas fuentes de resistencia a BGMV y BGYMV identificadas en frijol han sido efectivas también contra otro begomovirus que enferma esta especie. Es el caso de la resistencia mostrada por el cultivar Azufrado Higuera, desarrollado a partir de fuentes del cultivar Nueva Granada, identificadas previamente en América del Sur. Este cultivar resultó ser resistente a *Bean calico mosaic virus* (BCMV) (Morales, 2000).

2.3.2 Descripción de las fuentes de resistencia en tomate contra TYLCV.

La mayoría de los trabajos de mejoramiento del tomate con el objetivo de obtener plantas resistentes a los begomovirus se han realizado en el Viejo Mundo, a pesar de que esta especie vegetal es oriunda de América donde, además, se ha encontrado la mayoría de los geminivirus que azotan a las plantaciones. El desarrollo logrado en la región del Mediterráneo y del Oriente Medio en el análisis de las fuentes de resistencia contra TYLCV ha constituido el impulso principal para obtener nuevas líneas de tomate comerciales capaces de tolerar y resistir a este patógeno. Los programas de mejoramiento se basan en la transferencia de genes de resistencia desde las especies silvestres de tomate hacia la comercial. Estas especies silvestres, identificadas como *Solanum pimpinellifolium* L., *Solanum habrochaites* S.Knapp and D.M Spooner, *Solanum arcanum* Peralta y *Solanum chilense* (Dunal) Reiche, se muestran asintomáticas durante la infección con TYLCV. En ellas se han descrito diferentes comportamientos o mecanismos de defensa frente a los diferentes aislados de diferentes áreas geográficas (Abou Jawdah y col., 1996; Laterrot, 1995; Michelson y col., 1994; Navas-Castillo y col., 1999; Pico y col., 1998; Pilowsky y Cohen, 1974; Pilowsky y Cohen, 1990; Vidavsky y col., 1998; Vidavsky y Czosnek, 1998). Como parte de los primeros esfuerzos por identificar fuentes de resistencia se reveló que el resultado del cruzamiento entre *Solanum Lycopersicon* L. y *Solanum pimpinellifolium* L. (accesión LA121) porta una resistencia dominante incompleta, lo cual sugiere que existe un control monogénico de este carácter (Pilowsky y Cohen, 1974). Más adelante se propuso el gen dominante *tylc* como la base de esa resistencia (Kasrawi, 1989). Aunque los cruzamientos entre *Solanum pimpinellifolium* L. y *Solanum Lycopersicon* L. son los más compatibles entre las especies de tomate (Picó y col., 1996) la productividad de las líneas resultantes fue muy baja, a pesar de que los síntomas de la infección fueron moderados. Sin embargo, la tolerancia contra TYLCV obtenida a partir de *Solanum arcanum* Peralta (accesión PI 126935), controlada por 5 factores recesivos (Pilowsky y Cohen, 1990), resultó ser radicalmente diferente ya que generó varias líneas R1-híbridas que demoraron en reflejar los síntomas, así como en acumular ADN viral en las plantas infectadas, y como consecuencia mostraron un rendimiento conveniente (Friedmann y col., 1998; Pilowsky y Cohen, 1990).

En 1991 otras dos especies silvestres, *Solanum chilense* (Dunal) Reiche y *Solanum habrochaites* S.Knapp and D.M Spooner, se analizaron en condiciones de infección con TYLCV. A los 85 días de la inoculación, estas no mostraron síntomas y la acumulación de ADN viral en ellas fue muy baja (Zakay y col., 1991). La resistencia en *Solanum chilense* (Dunal) se describió a partir de la accesión LA1969, sobre la base de un gen principal *TY-1*

(Michelson y col., 1994) y por lo menos dos genes modificadores adicionales (Zamir y col., 1994). Para *Solanum habrochaites* S.Knapp and D.M Spooner la resistencia mostró ser controlada por más de un gen (Mazyad y col., 1982). Del cruce entre *Solanum Lycopersicon* L. y *Solanum habrochaites* S.Knapp and D.M Spooner se logró una línea inmune: BC1F4 (902). Esta característica de inmunidad estaba asociada a 2-3 genes con comportamiento aditivo (Vidavsky y Czosnek, 1998). Por otro lado, la segregación de las líneas tolerantes evidenció que esta característica está basada solamente en la actividad de un gen dominante, y que la resistencia o inmunidad y la tolerancia son controladas por diferentes sistemas génicos (Vidavsky y Czosnek, 1998). La inmunidad lograda a partir de *Solanum habrochaites* S. Knapp and D.M Spooner puede romperse, aunque sin potenciar los síntomas característicos de la infección. Esto se demostró en experimentos en los que se realizó una inoculación por injerto con tejido infectado una vez que el virus se detectó dentro del sistema vascular (Vidavsky y Czosnek, 1998). Este hecho confirmó, además, que existe un mecanismo adicional de tolerancia por el cual una vez que se rompe el mecanismo de "inmunidad" la planta no presenta síntomas. El rompimiento de la resistencia también se describió en experimentos de agroinoculación de TYLCV en LA1969 derivada de *Solanum chilense* (Dunal) Reiche y LA1777 derivada de *Solanum habrochaites* S.Knapp and D.M Spooner (Kheyr-Pour y col., 1994). Esto sugirió que la resistencia pudiera estar expresada en la interfase donde ocurre la interacción de la planta con la mosca blanca (Vidavsky y Czosnek, 1998). En el caso de *Solanum chilense* (Dunal) Reiche existe otra referencia a un mecanismo probable mediante el cual se inhibe la replicación viral y el movimiento sistémico, diferente a un mecanismo de incompatibilidad con la mosca blanca (Kheyr-Pour y col., 1994; Michelson y col., 1994).

En otra dirección, Muniyapa y colaboradores, 1991 (Muniyapa y col., 1991) descubrieron que las líneas derivadas de *Solanum habrochaites* S.Knapp and D.M Spooner x *Solanum arcanum* Peralta son resistentes a otro geminivirus: *Tomato leaf curl virus* (ToLCV), lo cual suma una evidencia más a la existencia de un mecanismo propio de estas especies que afecta la interacción de la mosca blanca con la planta. Este fenómeno de resistencia en estas especies se asoció a la presencia de exudados producidos por los tricomas de la superficie de la hoja, donde las moscas quedan atrapadas (Channarayappa y Shivashankar, 1992). Un hecho relevante, asociado posiblemente a este mecanismo, lo constituyó la resistencia de la accesión LA1969 también a la especie *Tomato leaf curl Taiwan virus* (ToLCTWV) (Chiang y col., 1984) y *Tomato yellow mottle virus* (ToYMV) (Piven y col., 1995). En el último caso la resistencia se rompió después de la transmisión mecánica de este virus, lo cual sugiere un mecanismo de resistencia relacionado con la transmisión del

virus o la inhibición de la entrada del patógeno a la célula. Este tipo de mecanismo pudiera estar presente en otras fuentes de resistencia como *Solanum arcanum* Peralta, para el cual se describió inmunidad frente a *Tomato yellow top virus* (TYTV) y BCTV (Thomas y Mink, 1998).

En la búsqueda de la inmunidad frente a la infección por begomovirus los mejoradores han obtenido diferentes variedades de yuca, frijol y tomate con altos niveles de resistencia. La estrategia general que se ha seguido en estos tres cultivos para la obtención de genotipos resistentes es muy parecida. En ella se utilizan especies silvestres como parentales que muestran tolerancia y resistencia a estos patógenos, y una vez transferida a la descendencia la propiedad de tolerancia-resistencia se insiste en la recuperación de las características agronómicas deseadas mediante retro-cruzamientos. El trabajo ha sido arduo si tenemos en cuenta que la mayoría de las accesiones se ha obtenido mediante polinización abierta, lo cual genera en el siguiente cruzamiento con la variedad comercial líneas susceptibles y tolerantes. En particular, en el tomate ha resultado difícil por lo complicado de la genética de la resistencia y la necesidad de recuperar el fenotipo comercial demandado por el agricultor. Esta situación impone estrategias complicadas para obtener los fenotipos requeridos. Aunque en la actualidad se dispone de diferentes variedades e híbridos comerciales de tomate resistentes a TYLCV, éstas siguen constituyendo una fuente de inóculo para las plantas susceptibles (Gómez y col., 2004; Lapidot y Friedmann, 2002; Morales, 2001). Desde el punto de vista del control de la enfermedad no sería recomendable tener en el campo plantas que por ser asintomáticas sean a la misma vez fuentes de TYLCV. Mientras más sanas se muestren más atractivas serían para la mosca trasmisora, a diferencia de las altamente susceptibles que sufren daños por el virus e insecto hasta dejar de ser fuente atractiva de alimentación para éste.

Una alternativa interesante como complemento de los trabajos de mejoramiento tradicional para la obtención de variedades inmunes a los begomovirus pudiera ser la aplicación de las técnicas de la ingeniería genética de plantas.

2.3.3 Estrategias moleculares para el control de los begomovirus.

El desarrollo de la tecnología del ADN recombinante y el establecimiento de sistemas para la regeneración y transformación genética de las plantas han permitido la utilización de la ingeniería genética para el mejoramiento de éstas. En el sentido amplio existen dos formas de modificar las plantas por ingeniería genética para conferirles resistencia a virus: mediante la expresión de secuencias genómicas derivadas del propio virus al que se desea combatir o de la expresión de genes no-virales que poseen actividad antiviral. A partir de lo

antes expuesto se generaron dos conceptos: resistencia derivada del patógeno (RDP) y resistencia no derivada del patógeno.

2.3.3.1 Resistencia derivada del patógeno.

La posibilidad de prevenir el desarrollo de enfermedades virales se demostró por primera vez a principios del siglo XX frente a la infección con una cepa severa del virus del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV) en plantas de tabaco previamente inoculadas con una cepa menos virulenta del mismo virus (McKinney, 1929). Este tipo de estrategia, comúnmente denominada "protección cruzada", se ha empleado para proteger varios cultivos de importancia económica, incluyendo el tomate (Gadani y col., 1990). Sanford y Johnston describieron que la expresión de ciertos genes del patógeno en un hospedante alteraría el balance normal de los componentes virales, y demostraron que esto conduciría al impedimento de la replicación o del movimiento del virus dentro de la planta más allá de la primera célula infectada (Sanford y Johnston, 1985). Este hecho constituyó un hito determinante en el desarrollo de estrategias antivirales en las plantas.

Las primeras plantas transgénicas con resistencia a virus sobre la base de este concepto (resistencia derivada del patógeno (RDP, del inglés "pathogen derived resistance")) se obtuvieron en 1986 mediante la expresión en plantas de tabaco del gen que codifica para la proteína de la cápside de TMV (Powell-Abel y col., 1986). Estas plantas resultaron resistentes a la inoculación con partículas virales de TMV. En general las plantas "protegidas" mostraron un retardo temporal del desarrollo de los síntomas, una atenuación en la sintomatología característica y un menor título de este virus. No obstante, la resistencia era disminuida si se les inoculaba con ARN viral infectivo. Entonces, se postuló que la protección se debía a la inhibición del desnudamiento viral en las células infectadas inicialmente (Register y Beachy, 1988) y por lo tanto si se inoculaba ARN viral desnudo éste podría multiplicarse y dispersarse por la planta para lo cual no necesitaría ser desnudado previamente. No obstante, el efecto de la resistencia por la vía de la expresión de la CP resultó ser versátil e impredecible, como ocurrió por ejemplo en el caso del *Alfalfa mosaic virus* (AIMV) (Taschner y col., 1994). Para este caso la resistencia se reflejó sólo contra un inóculo pequeño del virión de AIMV en líneas de plantas que producían la CP a un nivel bajo. Sin embargo, en las líneas que producían la proteína de la cápside mutada o altos niveles de la proteína sin modificar, la resistencia resultó efectiva tanto para la inoculación con el virus empaquetado como para la inoculación con ARN viral desnudo (Taschner y col., 1994). Además de los dos efectos diferentes descritos para la resistencia a virus mediada por la expresión de la CP se descubrió otro, específicamente para la CP de potexvirus (PVX). En este caso, igual que para AIMV, se describió su efectividad contra el virión y el ARN

desnudo, pero además, se sugirió la interacción de la CP con el origen de ensamblaje ubicada en la región 5' del genoma viral. Esta interacción podría resultar potencialmente supresora de la traducción del gen de la ARN polimerasa dependiente del ARN (RDR), que es codificada en el marco abierto de lectura de ese extremo del genoma (Sit y col., 1994).

La complejidad y la efectividad de los mecanismos que desencadenan la resistencia a virus por la vía de RDP son variadas. Aunque en un inicio la eficacia de la estrategia de RDP se describió sólo para los virus que contienen ARN como genoma, fundamentalmente enfocada a la proteína de la cápside, su empleo para virus con genoma de ADN y la utilización de genomas virales parciales o secuencias no traducibles también han sido objetos de extensa investigación (Baulcombe, 1996; Beachy, 1997).

Dentro de los geminivirus los begomovirus han sido precisamente blancos de innumerables estudios para aplacar las infecciones virales, sobre todo en cultivos tan importantes como la yuca y el tomate. Sobre la base de las evidencias mostradas por Kunik y colaboradores (1994), podríamos considerar que la estrategia RDP basada en la proteína de la cápside también induce un nivel de resistencia contra TYLCV en plantas transgénicas de tomate (Kunik y col., 1994). En este caso se demostró el retardamiento de la aparición de los síntomas de la infección, y se recobró el fenotipo original cuando se expresaban altos niveles de la proteína recombinante (Kunik y col., 1994). Aunque se sugiere una relación entre los altos niveles de expresión y la resistencia que se obtuvo, en el caso de otro geminivirus, ToMoV, es solamente suficiente la existencia de los transcritos correspondientes a la CP (Sinisterra y col., 1999). No obstante, la proteína de la cápside no ha sido ampliamente reconocida como diana potencial para sustentar con efectividad la estrategia de RDP contra begomovirus, quizá por esto existen pocos trabajos en esta dirección.

Para combatir los begomovirus se ha hecho mayor énfasis en la afectación de la proteína responsable del movimiento (MP) y la proteína asociada a la replicación (Rep). Ambas poseen funciones que determinan el alcance de la infección. En el caso de la proteína responsable del movimiento viral, la disminución de su actividad ha sido posible mediante la obtención de mutantes negativos dominantes (Baulcombe, 1996). La efectividad de esta estrategia parece estar mediada por la competencia por el mismo sitio de unión a los plasmodesmos entre la proteína recombinante mutada expresada en la planta y la funcional codificada por el virus inoculado (Lapidot y col., 1993). Se ha demostrado que la resistencia por este mecanismo podría ser potencialmente efectiva debido al amplio espectro de virus que pudiera cubrir su actividad antiviral. Por ejemplo, la protección conferida por la MP de TMV media la resistencia también contra los miembros de otras familias virales como

potexvirus, cucumovirus, tobnavirus y tobamovirus (Cooper y col., 1995). Este ejemplo de amplio espectro de resistencia indica que la proteína de movimiento de diferentes virus pudiera interactuar con el mismo componente del plasmodesmo (Carrington y col., 1996). En el caso de los begomovirus se han utilizado los genes responsables del movimiento de célula a célula y el movimiento núcleo-citoplasmático para obtener plantas resistentes. Tal es el caso de la expresión de los genes *bv1* y *bc1* de BDMV en plantas transgénicas de tomate (Hou y col., 2000). El comportamiento de resistencia frente a la infección por ToMoV en estas plantas podría explicarse sobre la base de la perturbación del ciclo geminiviral debido al secuestro prematuro de su genoma por estas proteínas, tanto fuera del núcleo como en el citosol. Aunque todas las plantas de tomate que se han obtenido que expresan esta proteína muestran retardamiento en la aparición de los síntomas en comparación con las no-transgénicas, es notable que las plantas que portan los transgénicos sin alteraciones en sus secuencias muestran mayor nivel de resistencia frente a la infección por ToMoV que aquellas portadoras de las secuencias mutadas (Hou y col., 2000). Este hecho refleja también, similitud en los elementos que intervienen en el movimiento de ambos virus; y sugiere, además, que la imposibilidad de BDMV de infectar y provocar síntomas en las plantas de tomate no se debe a la disfunción de *bc1*, sino a otros factores virales o del hospedante (Hou y col., 2000).

La idea de utilizar los genes responsables del movimiento para obtener plantas resistentes se aplicó también a plantas de tabaco, pero esta vez se transformaron con los genes *bv1* o *bc1* de ToMoV. Sin embargo, los resultados fueron diferentes ya que estas plantas no mostraron resistencia frente a ToMoV (Duan y col., 1997). Por otra parte, estas plantas de tabaco que contenían las secuencias de ToMoV manifestaron síntomas propios de la infección sin haber sido inoculadas con este virus. Este efecto de la expresión constitutiva de la proteína de movimiento sobre el fenotipo de la planta se ha descrito para varios geminivirus (Pascal y col., 1993) y confirma estudios previos que indican que el producto de *bc1* es un determinante de síntomas en algunos geminivirus bipartitas (Ingham y col., 1995; von Arnim y Stanley, 1992). Además, este producto pudiera estar asociado a la interferencia con el tráfico normal de macromoléculas a través del plasmodesmo (Lucas y col., 1995).

Aunque la proteína de movimiento ha mostrado su utilidad para disminuir las afectaciones provocadas por varios géneros o familias virales sobre la base del concepto de RDP (se incluye el género *Begomovirus*), todavía no se ha logrado una resistencia o inmunidad que permita su generalización. Como resultado, el movimiento viral como objeto de trabajo en busca de la resistencia contra virus ha sido desplazado en los últimos años debido a los

avances descritos en tal sentido con la utilización de la secuencia que codifica para la proteína asociada a la replicación (Rep).

La Rep es la única proteína indispensable en el proceso de replicación geminiviral (Brough y col., 1988), por lo tanto las estrategias sobre la base de la manipulación de la secuencia del gen que la codifica van dirigidas a inhibir este proceso. En el trayecto hacia este objetivo se han estudiado diferentes estrategias en su manipulación, guiada en dos direcciones. En una se disminuye o inhibe por completo la actividad específica de la Rep mediante la afectación de la secuencia aminoacídica. En la otra, el blanco de la manipulación son los transcritos.

Para la disminución de la actividad de la proteína Rep, mediante la afectación de su secuencia aminoacídica se ha descrito llevar a cabo la eliminación de parte de su secuencia nucleotídica o provocar mutaciones puntuales sobre ésta, hasta lograr que carezca de la actividad replicasa (Brunetti y col., 1997; Hanson y col., 1995; Noris y col., 1996; Sangare y col., 1999). Así, se comprobó que en plantas de *N. benthamiana* que expresaban el gen de la replicasa (*c1*) de TYLCSV con el extremo 3' terminal cercenado (manteniendo sólo la secuencia correspondiente a los 210 aminoácidos del extremo amino-terminal) ocurría una reducción sustancial de la replicación viral (Noris y col., 1996). Sin embargo, sólo esto era un reflejo de resistencia ya que era superado por la infección. Los mismos autores postularon un año después que era necesario una acumulación elevada de la Rep mutada para obtener resistencia, que una alta acumulación de la Rep originaba un fenotipo encrespado de la planta y, además, que la resistencia obtenida era específica para TYLCSV (Brunetti y col., 1997). Se demostró que este diseño sobre la Rep, aunque se comportaba como un mutante negativo dominante, afectaba pero no abolía la transcripción del gen *c1*. También, en este sentido se analizó el extremo 5' del gen *c1* de *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV). Este extremo N-terminal de la Rep está involucrado en la unión al ADN, lo cual se ha descrito también para TGMV, ACMV y TYLCV, entre otros (Arguello-Astorga y Ruiz-Medrano, 2001; Chatterji y col., 2001). La función de este extremo está determinada por su afinidad a las secuencias de iterones localizadas en el sitio de origen de la replicación. Con una delección del extremo 5' hasta el triplete correspondiente al aminoácido 160 la secuencia de *c1* fue co-transfectada con los componentes A y B de ToLCNDV, lo cual resultó en una reducción considerable de la replicación viral en las plantas de *N. benthamiana*. Incluso, estas plantas fueron capaces de mostrar algún grado de resistencia contra una cepa más débil de este virus. Se determinó que esta secuencia de la Rep disminuía también la replicación de otros geminivirus como el ACMV, PHYVV y PYMTV-TT, aunque en menor grado. Estos hechos indicaron la existencia de varios mecanismos que fundamentan esta estrategia. Un mecanismo podría ser que la Rep 5'-mutilada redujera la

replicación mediante la competencia por el sitio de unión al iterón en el origen de replicación; de esta manera estaría comportándose como un mutante dominante negativo, al bloquear la replicación (Chatterji y col., 2001). Otra explicación podría ser que se afectó el dominio de unión a los deoxinucleótidos, lo cual también interferiría con la replicación como ha sido demostrado para BGYMV y ACMV en plantas de *N. benthamiana* (Hanson y col., 1995; Sangare y col., 1999). Por otra parte, se ha demostrado que pudiera estar involucrado otro mecanismo relacionado con la afinidad de la Rep mutada por el ADN y con su capacidad de formar oligómeros proteicos entre las Rep mutadas y originales. Este fenómeno podría perjudicar la replicación de diferentes geminivirus debido al secuestro de la proteína original por la mutada (Chatterji y col., 2001).

La segunda vía descrita para lograr la reducción de la actividad de la Rep, basada en la afectación de los transcritos, es la generación de ARN antisentido complementario al gen *c1*. De esta manera se puede inducir la formación de moléculas de ARN doble cadena pareadas entre la secuencia recombinante y la similar a partir del genoma viral. Se conoce que el producto de este apareamiento puede inducir un proceso de degradación, a la luz del silenciamiento génico post-transcripcional, del transcrito viral. Day y col. (Day y col., 1991) introdujeron secuencias del gen que codifica para la Rep de TGMV en antisentido en plantas de tabaco y obtuvieron una reducción del desarrollo de los síntomas y la replicación viral después de la inoculación con el patógeno. Cuando estas mismas plantas se inocularon con otros geminivirus se obtuvo una reducción de cuatro veces de la cantidad de ADN genómico de BCTV en comparación con el control no transgénico, mientras que para el ADN de ACMV no se observó ninguna reducción (Bejarano y Lichtenstein, 1994). Bendahmane y Gronenborn (1997) (Bendahmane y Gronenborn, 1997) obtuvieron plantas de *N. benthamiana* que expresaron *c1* de TYLCV en antisentido y mostraron una reducción casi total de la replicación de TYLCV y de los síntomas que éste provoca. Aunque no se estableció una correlación entre los niveles del transcrito a partir de *c1* y la resistencia alcanzada, sí se observó que las plantas con mayor nivel de resistencia contenían mayor cantidad de transcritos a partir de *c1* en antisentido.

Un caso parecido se describió en plantas de frijol transformadas con la secuencia en antisentido de la Rep de BGMV: algunas plantas mostraron retardamiento y atenuación de los síntomas ocasionados por BGMV pero no se observó ninguna relación entre los niveles de los transcritos y el nivel de resistencia alcanzado (Aragao y col., 1998). A pesar de estos avances fue sólo en el año 2004 que se describieron plantas de tomate inmunes a TYLCV al emplear un diseño génico que contenía la secuencia de *c1* en sentido o antisentido, ligada a un fragmento de la región intergénica (Yang y col., 2004). La afectación total de la Rep en

esta experiencia no se fundamentó con datos experimentales, aunque los autores sugirieron como la base de este resultado la ocurrencia del silenciamiento génico post-transcripcional. En resumen, entre las estrategias que han reflejado mayor eficacia para controlar la infección por TYLCV, que puedan ser igual de efectivas para otros begomovirus, la más exitosa es la inactivación de la proteína asociada a la replicación (Rep). Esta vía puede conllevar a la inmunidad porque, precisamente, obstaculiza la multiplicación viral y por ende la infección. El "fenotipo" multifuncional de la proteína Rep que la involucra en diferentes procesos como: la iniciación y la terminación de la replicación por el mecanismo de círculo rodante, cortando y religando el origen de replicación del ADN viral (Laufs y col., 1995b); la represión de la transcripción de su propia secuencia génica (Eagle y col., 1994); la interacción con los factores del hospedante para interferir en el control del ciclo celular y la replicación del ADN en las células infectadas, (Gutierrez, 2000b) puede propiciar un efecto más abarcador cuando es afectada en su totalidad. Los diferentes dominios que la componen: el dominio para la formación de oligómeros localizado en su parte central; el dominio con actividad ATPasa encontrado en el C-terminal; el dominio responsable de la unión al ADN, corte y religación y de las funciones represivas pertenecientes al extremo N-terminal; la convierten en un blanco complejo de manipular pero a la vez muy atractivo (Orozco y col., 1997). De todas las estrategias descritas con esta intención, la obtención de plantas de tomate transformadas con la secuencia de *c1* en antisentido puede tener un efecto preventivo. Aunque los niveles de infección o de expresión del transgén pueden determinar el grado de efectividad de esta estrategia, la señal originada por el proceso de silenciamiento post-transcripcional que se induce a partir de la formación de estructuras de doble cadena de ARN podría, también, inducir un retardamiento más efectivo de la infección en otras partes de la planta (Watson y col., 2005).

Las estrategias analizadas anteriormente se consideran dentro del grupo de RDP que necesariamente conducen a la formación de una proteína o de un transcrito con secuencias del patógeno. Sin embargo, hay otro enfoque dentro de este mismo concepto de RDP que se utilizó para atenuar la infección por ACMV, y es la producción de ADN viral defectivo (llamado también ADN defectivo de interferencia) dentro de la célula infectada (Stanley y col., 1990). El ADN viral defectivo es un ADN subgenómico que comprende una familia de moléculas de menor tamaño que se derivan solamente de una región específica del ADN B, en el caso de ACMV. En plantas de *N. benthamiana* coinoculadas con el genoma completo y el ADN viral defectivo de ACMV se demostró la inhibición de la proliferación de este virus. Esta estrategia no requiere transcripción o expresión de genes a partir del ADN subgenómico. Cuando en las plantas transformadas con este tipo de secuencia el ADN viral

penetra, el ADN defectivo se multiplica (Stanley y col., 1990) y compite ventajosamente contra el genoma viral debido a su menor tamaño, interfiriendo y provocando partículas defectivas del virus. Esta aplicación conllevó a la disminución de los síntomas en las plantas infectadas. Este mecanismo no ha sido explotado en el caso de TYLCV. Sin embargo, el fenómeno de la existencia de ADN sub-genómico, que ha sido el fenómeno base para sostener la aplicación de esta estrategia en ACMV, está descrito para varios begomovirus entre ellos TYLCV (Czosnek y col., 1989; Frischmuth y Stanley, 1994; Roberts y col., 1988) por lo que este enfoque podría desarrollarse para el control de otros geminivirus.

2.3.3.2 Resistencia no derivada del virus.

La mayor parte de las estrategias transgénicas para generar resistencia contra los virus se han enfocado sobre la aplicación del concepto de RDP. No obstante, existen algunos casos donde ésta se ha logrado mediante la utilización de genes no relacionados con el patógeno. Por ejemplo, las proteínas inhibidoras de los ribosomas (RIP), como la diantina extraída de *Dianthus caryophyllus* L., poseen naturalmente un efecto controlador sobre algunos virus de plantas y animales. Aunque su uso en la ingeniería genética no ha sido descrito para ningún begomovirus que infecte tomate, el gen que codifica para esta proteína unido a un promotor de ACMV para su control resultó funcional para la contención de ACMV en plantas de *Nicotiana benthamiana* (Hong y col., 1996). La estrategia para su utilización está basada en la promoción de su expresión por el virus inoculado.

Otra estrategia, descrita para *Beet severe curly top virus* y demostrada en *Arabidopsis thaliana*, consiste en la expresión de proteínas artificiales con estructura de dedos de zinc diseñadas para unirse al origen de replicación (Sera, 2005). Las plantas que expresaban este tipo de proteína mostraban desde ausencia de síntomas hasta síntomas leves después de la inoculación. Sin embargo, debido a la variación en la secuencia de los orígenes de replicación entre los geminivirus su aplicación se vería limitada.

2.4 Silenciamiento génico, mediado por ARN de interferencia (ARNi).

Entre las estrategias desarrolladas para lograr el silenciamiento génico los llamados ARNi o "siRNA" (del inglés *short interfering RNAs*) se han convertido en los últimos años en una herramienta eficiente para silenciar genes específicos con fines académicos y prácticos (Dorsett y Tuschl, 2004). Estas moléculas son las unidades más importantes de los complejos efectores de la ruta de interferencia del ARN. Este fenómeno se descubrió en 1998 por Andrew Fire y Craig Mello, cuando inyectaron moléculas de ARN de doble cadena dentro del nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Fire y col., 1998). En aquel entonces la introducción del ARN de doble cadena provocó una acentuada degradación específica del ARNm citoplasmático que contenía las mismas secuencias que el ARN de doble cadena

introducido (Fire y col., 1998). Este fenómeno, llamado silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS, del inglés *post-transcriptional gene silencing*), también se encontró en las plantas y hongos, y aparecía como un proceso relacionado e inducido por ARN de doble cadena. Se evidenció su existencia además, en protozoos y en casi todos los eucariontes superiores analizados (Li y col., 2002; Ngo y col., 1998; Waterhouse y col., 1998).

Después que se descubrió la existencia en las plantas de un sistema de degradación del ARN de manera específica y dirigida por otro ARN, se encontraron y analizaron numerosos ejemplos de regulación por este mecanismo en el reino vegetal. En 1995 Kumagai y colaboradores (Kumagai y col., 1995) demostraron que un vector viral basado en el ARN de TMV puede inducir silenciamiento de un gen de la planta. Mediante la infección de *Nicotiana benthamiana* con TMV recombinante, que contenía una porción de la secuencia que codifica para la fitoeno desaturasa (PDS), se demostró fenotípicamente y bioquímicamente la disminución de los niveles de fitoeno en la plantas. De esa misma manera, utilizando otro vector viral de expresión basado en *Potato virus X* (PVX), se demostró la posibilidad de inducir silenciamiento a un gen endógeno o a un transgén en las plantas (Angell y Baulcombe, 1997; Baulcombe, 1999a; Baulcombe, 1999b). Así se demostró la amplitud potencial de posibilidades para provocar silenciamiento génico. Incluso, se postuló el silenciamiento génico post-transcripcional como un mecanismo natural de defensa de las plantas frente a una infección viral. Covey y colaboradores (Covey y col., 1997) establecieron que las especies de *Brassica* infectadas con CaMV muestran naturalmente por lo general un fenotipo de recuperación después de la infección. Ellos además, notaron una disminución drástica del ARN de CaMV en el tejido recuperado, que se puede explicar por el mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional. Ratcliff y colaboradores describieron otro caso interesante en plantas de *Nicotiana clevelandii* recuperadas naturalmente de la infección por *Tomato black ring virus* (TBRV) (Ratcliff y col., 1997). Las plantas podían ser infectadas por PVX pero no por PVX que contenía secuencias de TBRV, lo cual demostró que las secuencias de TBRV son diana de la degradación en el tejido recuperado. Igualmente se demostró que las plantas pueden inducir el mecanismo de silenciamiento contra virus sin que ellas recuperen el fenotipo normal (Ratcliff y col., 1997). La significación del fenómeno de silenciamiento génico post-transcripcional en las plantas como mecanismo de defensa contra ácidos nucleicos foráneos se resaltó aún más cuando se descubrió que algunos virus de plantas producen proteínas que interfieren con este proceso. En 1998 se descubrió que la proteína HC-Pro de *Tobacco etch virus* (TEV) y la proteína 2b de *Cucumber mosaic virus* (CMV) pueden suprimir el silenciamiento de un transgén

(Anandalakshmi y col., 1998; Brigneti y col., 1998). Este descubrimiento confirmó que las plantas desarrollaron mecanismos de defensa contra virus y éstos a su vez co-evolucionaron con éstas desarrollando mecanismos para contrarrestarlos. Incluso, algunos supresores pueden actuar directamente sobre los componentes del silenciamiento: la proteína p19 de tombovirus y la p21 de closterovirus secuestran los ARNi impidiendo su incorporación a la maquinaria de silenciamiento (Dunoyer y col., 2004).

Se conocen ya algunas particularidades sobre los mecanismos y componentes que están involucrados en el silenciamiento génico post-transcripcional en las plantas. Este proceso actúa básicamente sobre el ARN y puede ser activado por ARN de doble cadena (ARNdc). Se ha descrito que este último aparece como consecuencia de la coexpresión de genes en sentido-antisentido, de la homología entre genes endógenos y transgénos, de la producción de ARN aberrante (transcritos prematuros), de ARN antisentido, de los altos valores de expresión de un transgén (que excedan un valor crítico para la célula o el sistema) y de la inserción de copias múltiples de ADN como regiones repetidas invertidas (RI) (Matzke y col., 2002). Por lo general, en la formación del inductor de PTGS interviene siempre un ARNm exógeno; no existe o es muy raro encontrar una fuente de ARNi endógena (Aravin y Tuschl, 2005). Una vez inducido el PTGS el ARNdc es degradado, por una ARNasa tipo III (Dicer) (específica de ARNdc) (Aravin y Tuschl, 2005), a pequeños ARNs de 21 a 25 pb (ARNi). Ambas cadenas de estos ARNi, se incorporan al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, del inglés *RNA induced silencing complex*), y luego sólo la que va a formar parte del mecanismo de silenciamiento permanece en éste. Los ARNi de simple cadena, incorporados ya a RISC, localizan a los ARNm complementarios (que pueden ser ARNm endógenos), y como resultado ocurre una degradación nucleotídica del ARNm diana por la proteína ARNasa H o Argonauta (Ago; *Slicer*) (Aravin y Tuschl, 2005; Hammond, 2005; Hannon, 2002). La forma en que se elimina la cadena no incorporada en el caso de los pequeños ARNi puede explicarse por la misma actividad ARNasa de Ago (Hutvagner, 2005). Se han descrito diferentes miembros para la familia de proteínas Ago y no todos tienen actividad endoribonucleasa responsable de la degradación de los ARN (Liu y col., 2004; Meister y col., 2004). Las proteínas Ago que no tienen esta actividad parece que median otro tipo de procesos reguladores, sobre la base de la especificidad de las secuencias diana y efectora tal como el silenciamiento transcripcional (TGS, del inglés *transcriptional gene silencing*) y la inhibición de la traducción. Este último se favorece cuando hay falta de complementareidad en las secuencias diana del ARNm y en la secuencia efectora del complejo RISC (Hammond, 2005) (observado en el caso de silenciamiento por microARN). El silenciamiento génico transcripcional, a diferencia del PTGS, se consolida mediante

cambios epigenéticos en el ADN cromosomal y no por la degradación de los transcritos específicos. Como resultado no se producen los ARNm.

En el TGS la interacción ADN-ARNi provoca una serie de eventos que regulan la metilación del ADN y de algunas histonas asociadas a éste (Matzke y Birchler, 2005). Se ha demostrado que los ARNi pueden participar como reguladores de la expresión génica a nivel transcripcional en el núcleo, a través del remodelado de la cromatina o la metilación del ADN (Aufzats y col., 2002; Matzke y col., 2004). Estos dos procesos epigenéticos originan metilación de la citosina en el ADN y de la lisina 9 de la histona H3 (Matzke y Birchler, 2005). El complejo que promueve este proceso se encuentra en el núcleo de la célula (Verdel y col., 2004).

La metilación del ADN se ha observado también en las secuencias promotoras de los transgénos (Park y col., 1996). El activador de la metilación en estos casos probablemente es un ARNi (Lippman y col., 2004). Este fenómeno está asociado con frecuencia al alto número de copias distribuidas en estructuras repetitivas complejas, o a la inserción de los transgénos en determinados sitios del genoma (Matzke y Birchler, 2005; Metzloff, 2002; Vaucheret y Fagard, 2001). Estos transgénos, al igual que las secuencias repetitivas endógenas y los elementos transponibles, muestran algunas de las características de una heterocromatina (Baulcombe, 2004; Bender, 2004; Bird y Wolffe, 1999; Lippman y col., 2004; Rangwala y Richards, 2004; Richards y Elgin, 2002). Usualmente la heterocromatina no produce transcritos y está compuesta por secuencias de retrotransposones degenerados, bloques de repeticiones de una unidad génica simple, o por una combinación de ambos (Volpe y col., 2002). La estructuración de la heterocromatina se favorece por la unión de determinadas proteínas a la histona 3 metilada, con lo cual disminuye la capacidad transcripcional del ADN y se contribuye a mantener dicha metilación. Por otra parte, los ARNi pueden promover la metilación de todas las citosinas del ADN presentes en la zona de complementareidad con el ARNi (Aufzats y col., 2002; Pelissier y col., 1999), aunque en las plantas se ha observado preferencia por la metilación de sitios CG y CNG (Matzke y Birchler, 2005). La metilación del ADN, las modificaciones de las histonas y los factores que remodelan la cromatina están interconectados y originan marcas propias en la heterocromatina (Kapoor y col., 2005).

2.4.1 Amplificación y diseminación sistémica del silenciamiento.

Al mecanismo de silenciamiento por ARN se suman otros fenómenos como son la amplificación y la diseminación del silenciamiento.

En plantas, hongos y nemátodos los ARNi además de promover la degradación de ARNs específicos también son capaces de promover la formación de ARNdc *de novo* a partir de

estos ARN diana. En este proceso intervienen ARN polimerasas dependientes de ARN (RDR), que sintetizan una cadena complementaria al ARN diana, posiblemente, utilizando ARNi como iniciadores de la reacción (Ahlquist, 2002). A partir de ese ARNdc se forma un nuevo conjunto de ARNi lo que conlleva una amplificación de la respuesta de silenciamiento por ARN. Este mecanismo de amplificación parece tener gran importancia en el control de los elementos transponibles y en la defensa frente a ciertos virus en plantas, ya que en plantas con mutaciones en algunas secuencias que codifican para RDR estas funciones se alteran (Xie y col., 2004). La amplificación permite al organismo establecer procesos de silenciamiento incluso cuando la cantidad de ARNdc inicial es muy pequeña.

Otro proceso aparentemente exclusivo de plantas y nemátodos es el silenciamiento sistémico. En estos organismos la inducción del silenciamiento en una zona puede generar una señal móvil que inicia el silenciamiento en otros lugares distantes del organismo. Esta señal podría estar constituida por ARNi que transita de unas células a otras. En las plantas los ARNi generados en una célula son capaces de pasar a células adyacentes a través de los plasmodesmos y de mediar silenciamiento en ellas. Además, si hay ARNs diana en estas células receptoras se puede producir amplificación, lo que provocaría una mayor diseminación del silenciamiento (Himber y col., 2003). También es posible el tránsito de ARNi a través del floema, lo que permitiría el movimiento del silenciamiento desde la zona donde se induce inicialmente hasta otras partes muy distantes en las plantas (Voinnet y col., 1998; Yoo y col., 2004). Este movimiento del silenciamiento podría tener una gran importancia en la defensa frente a los virus, ya que a partir del sitio inicial de la infección, donde se induce el silenciamiento, se produciría una señal que prepararía la defensa antiviral en los tejidos adyacentes, imponiendo una barrera a su dispersión por el organismo antes de su llegada.

2.4.2 Aplicaciones biotecnológicas del silenciamiento por ARNi.

El silenciamiento por ARNi puede ser utilizado como herramienta para diversos fines. Una de sus posibles aplicaciones es el estudio de la función de genes, mediante la evaluación del efecto que tiene la eliminación del producto génico mediante la expresión de ARNdc que porte secuencias del gen (interferencia por ARN o ARNi) sobre el organismo (Downward, 2004). La expresión de ARNdc se puede producir de manera estable, mediante la transformación genética con una construcción que exprese un ARN con secuencias sentido y antisentido. El ARNi, como en los nemátodos, se puede inducir en algunos organismos mediante la introducción directa de ARNdc sintetizado *in vitro*, aunque el efecto que se logra sobre el gen diana es transitorio. La introducción de ARNi mediante expresión de ARNdc no es viable en mamíferos, ya que el ARNdc activa la respuesta por interferón la cual provoca

un apagamiento generalizado de la síntesis de proteínas (Paddison y Hannon, 2002). Sin embargo, se puede inducir ARNi mediante la expresión o introducción directa de ARNi que no activan las respuestas mediadas por interferón.

En plantas, además de la expresión estable de ARNdc mediante transgénesis, se pueden utilizar a los virus como portadores de la secuencia inductora del silenciamiento (Waterhouse y Helliwell, 2003). Se puede inducir silenciamiento del gen diana en la planta durante la infección, modificando los virus para que porten secuencias del gen de interés. Este procedimiento se conoce como silenciamiento inducido por virus o VIGS (del inglés *virus-induced gene silencing*) (Liu y col., 2002). Algunas de sus ventajas son: la facilidad de su uso, es mucho menos laborioso que la transformación genética con construcciones que expresen ARNdc y la posibilidad de controlar a partir de qué momento se induce el silenciamiento, lo que permite por ejemplo trabajar con genes implicados en el desarrollo, que harían a la planta inviable en caso de ser silenciados en un estadio temprano. Como inconveniente del VIGS existe la posibilidad de que los síntomas causados por la infección viral enmascaren el fenotipo producido por el silenciamiento del gen de interés.

Otra de las aplicaciones del silenciamiento por ARNi es la creación de plantas transgénicas resistentes a virus, mediante la transformación con construcciones que expresen ARNdc con secuencias del virus de interés. Los nuevos enfoques van incluso hacia la protección de cultivos sin necesidad de utilizar plantas transgénicas, mediante la aplicación directa de ARNdc, utilizando métodos que faciliten la entrada de éste a las células (Tenllado y col., 2004).

2.5 Cultivo de tejidos y transformación genética del tomate (*Solanum lycopersicon* L.).

Los avances teórico-prácticos en la Biología aplicados a la ingeniería genética de las plantas han permitido obtener organismos transgénicos por la vía de la manipulación *in vitro* e *in vivo*. En el caso de la manipulación *in vitro* la introducción de genes por métodos biotecnológicos ocurre a través de un fenómeno llamado regeneración de plantas, ligado al método para la introducción de los genes. Este proceso de regeneración de plantas se ha descrito para diferentes especies a partir de diferentes explantes o tejidos de partida. Funciona sobre la base del fenómeno de autonomía y totipotencia de la célula vegetal descrito por Morgan en 1901 en el marco de la teoría celular establecida por Shleiden y Schwann en 1887, que fundamenta el desarrollo de una planta a partir de una célula inicial. Existen variados enfoques y estrategias hormonales diseñadas para cada caso en particular y explante de partida. Su eficacia está relacionada con el grado de desarrollo del tejido inicial, su contenido hormonal y el genotipo.

La regeneración es un proceso que determina la eficiencia de la transformación genética; mientras más eficiente sea un proceso de regeneración a plantas a partir de un explante determinado, más eficiente o mayor es la probabilidad de obtención de una planta transgénica. Un sistema exitoso de transformación de plantas comprende: 1) disponibilidad de genes controlados por elementos moleculares definidos que permitan regular el patrón de expresión tanto en las plantas transgénicas primarias como en sus descendencias; 2) un protocolo de transferencia de ADN a células que sean competentes para la transformación; 3) un protocolo de selección para incrementar la frecuencia de plantas transgénicas recuperadas; y 4) un método de regeneración de plantas a partir de las células blanco que sea eficiente y permita la recuperación de plantas transgénicas.

En el caso particular del tomate se ha demostrado que existen diferencias en cuanto a la capacidad de división celular y regeneración en las plantas de diferentes variedades (Davis y col., 1991a; Ellul y col., 2003; Koornneef y col., 1993; Pratta y col., 1997; Toreli y col., 1996; Zelcer y col., 1984). Dicha capacidad está influenciada por el genotipo, las condiciones de cultivo, el estado fisiológico de la planta y el tipo de explante utilizado. Los genotipos para los cuales se han descrito procedimientos de regeneración y transformación muestran, por lo general, diferente comportamiento a partir de los mismos explantes. Así, las variedades comerciales UC82, MP1, VF36, Moneymaker y otras han mostrado diferente eficiencia de regeneración a partir de los cotiledones (Alvarez y col., 1999; Barg y col., 1997; Frary y Earle, 1996; Hamza y Chupeau, 1993; Kut y Evans, 1982; Sachs y Thimann, 1967; Yoder, 1990). Lo más relevante de este proceso en estas variedades es la inconsistencia en cuanto a la cantidad de brotes normales generados por unidad de explante (cotiledón). En la eficiencia de este proceso influye determinantemente el tipo de proceso morfogénico, dependiente de la calidad del explante y las condiciones de cultivo. La regeneración puede ocurrir con un predominio inicial de la formación de tejido caloso previo a la formación de los brotes. Este fenómeno de regeneración indirecta conlleva al aumento de la probabilidad de aparición de brotes anormales o al desarrollo de estructuras que no logran definir el crecimiento del primordio apical y que quedan en forma de hoja sencilla o como brote "ciego" (Barg y col., 1997). La causa de la aparición de brotes anormales en la mayoría de las variedades comerciales podría tener estrecha relación con este fenómeno, que se origina como resultado de la utilización de hormonas vegetales en el proceso de inducción de los brotes. Este efecto en éstas es precedido por masas de callo que anteceden la aparición de los primordios (organogénesis indirecta). Se ha descrito que el fenómeno de la formación de callos lleva aparejado un proceso de metilación de determinados genes que promueve la pérdida de la totipotencia, y que induce la formación de los brotes anormales

(Lambe y col., 1997). En este sentido, se demostró la existencia de la predisposición genética que favorece el desarrollo de callos bajo el efecto de las hormonas vegetales. El caso de la variedad MP1, la cual regenera en presencia de hormonas sin desarrollar la callosidad con un alto grado de eficiencia en la conversión a plantas normales, demuestra precisamente la influencia del fondo genético sobre este proceso (Barg y col., 1997). Para esta variedad se demostró una capacidad de regeneración alta que la distingue entre otras, lo cual se ha aprovechado para obtener plantas transgénicas de manera eficiente.

En cualquier circunstancia es indispensable una metodología que provoque una transformación eficiente y masiva en el tejido herido o competente, expuesto a la acción del agente transformador. Se ha evidenciado que para lograr esta condición un requisito indispensable, que se ajusta particularmente al método de transformación utilizando la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* como vector natural, es que el tejido diana se encuentre en estado de crecimiento o división celular (Grimsley y col., 1987; Sangwan y col., 1992). Esta situación se favorece de modo diferente en los distintos explantes y para las diferentes variedades o especies de plantas, y es este uno de los factores que pudiera influir en la eficiencia de transformación de tomate.

La transformación de tomate utilizando *Agrobacterium tumefaciens* se describió por primera vez en el año 1985 por Horsch y colaboradores de la compañía Monsanto (Horsch y col., 1985). Ellos generaron plantas transgénicas mediante la inoculación y cocultivación de discos de hojas con *A. tumefaciens* que contenía un plasmidio Ti cointegrativo desarmado (Horsch y col., 1985). Esta primera descripción del procedimiento indicaba entre otras particularidades la utilización de células nodrizas en el medio de cultivo sobre las cuales se llevaba a cabo la cocultivación de los explantes con la bacteria para potenciar el proceso de transformación. La cocultivación duraba de 2 a 3 días y después se generaron las plantas transgénicas en medio de selección para favorecer el desarrollo del tejido transformado.

A partir del año 1986 se describió la transformación exitosa de tomate por diferentes grupos (An y col., 1986; McCormick y col., 1986; Shahin y col., 1986). Ya para entonces se utilizaron plámidios Ti binarios que resultaron más cómodos de manipular en el laboratorio por su pequeño tamaño en comparación con el cointegrativo, y así se demostró que ambos tipos pueden ser utilizados en la transformación de tomate.

La actividad de las células nodrizas, ampliamente utilizadas en estos procedimientos como un potenciador, antes o durante la cocultivación, se basa en la propiedad de éstas de secretar compuestos que afectan la eficiencia de transformación (Fillatti y col., 1987a; Fillatti y col., 1987b; Hamza y Chupeau, 1993; Horsch y col., 1985; Koornneef y col., 1987; McCormick y col., 1986; McCormick, 1991; van Roekel y col., 1993). Se postuló que la

actividad de estas células favorece la vitalidad de los tejidos heridos expuestos a la acción de la bacteria, y además, se consideran una fuente de compuestos fenólicos (Cortina y Culiáñez-Maciá, 2003). En el pasado se demostró que los compuestos fenólicos del tipo 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyacetofenol (acetosiringona) que se producen en los cultivos nodrizos también incrementan la frecuencia de transformación de tomate por esta vía (Davis y col., 1991b; Lipp Joao y Brown, 1993). Estos compuestos activan la proteína de membrana virA mediante la autofosforilación, la cual activa a su vez la virG que es la inductora de la transcripción de la región Vir del plásmido Ti, responsable de la formación y activación del aparato de transferencia del T-ADN hacia el núcleo de la célula vegetal (Tzfira y Citovsky, 2000; Zupan y col., 2000). Incluso, actualmente la sustitución de las células nodrizas por la acetosiringona muestra un incremento de dos veces del recobrado de plantas transgénicas de tomate (Cortina y Culiáñez-Maciá, 2003). En esta misma dirección, también se ha demostrado que los azúcares y el pH ácido potencian la inducción de los operones que comprenden la región Vir (Zupan y col., 2000), aunque en el caso de tomate no ha sido explotado ampliamente.

Otros factores como por ejemplo, la concentración de *A. tumefaciens* para la cocultivación, el tipo de explante a transformar, la edad de ese explante, el antibiótico para eliminar la bacteria en el medio de selección, la temperatura y la cepa de *A. tumefaciens* utilizada afectan la eficiencia de transformación del tomate (Bird y col., 1988; Ellul y col., 2003; Fillatti y col., 1987b; Hamza y Chupeau, 1993; Ling y col., 1998; Pfitzner, 1998; Shahin y col., 1986; Stachel y col., 1986).

A pesar de que la transformación de tomate se logró hace dos décadas y se ha publicado más de una veintena de trabajos encaminados hacia la optimización del proceso, todavía la eficiencia de transformación del tomate es baja comparada con otras especies. La baja tasa de conversión a plantas normales durante la regeneración y la abundante proliferación de callos que muestran la mayoría de las variedades comerciales podrían ser factores determinantes de la eficiencia de este proceso. Precisamente estos dos factores enmascaran la eficiencia real de la transgénesis cuando se comparan variedades que muestran una capacidad de regeneración diferente.

3 MATERIALES Y METODOLOGÍAS.

3.1 MATERIALES.

3.1.1 Cepas bacterianas.

La cepa de *Escherichia coli* XL 1-Blue se usó en las diferentes etapas de clonación descritas en este trabajo. Su genotipo se describe a continuación.

XL 1-Blue: [*thi reA1 endA1 gyrA96(Nal^r) hsdR17(rk-mk-) supE44 relA1 lac* [F' *proAB laI^qZ* Δ (*lacZ*) M15 Tn 10 (Tc^r)]] (Bullock y col., 1987).

La cepa C58C1 (pGV2260) (Deblaere y col., 1985) de *Agrobacterium tumefaciens* se empleó en la agroinoculación de las plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.).

La cepa LBA4404 (Hoekema, 1983) de *Agrobacterium tumefaciens* se empleó en la transformación genética de las plantas de tomate *in vitro*.

3.1.2 Variedades de tomate.

Genotipo	Características
MP-1	Línea de plantas de tomate tolerante a la infección con TYLCV (<i>Solanum lycopersicon</i> L.) obtenida a partir del cruce entre una línea de tomate susceptible a TYLCV y la accesión tolerante PI126935 de <i>Solanum arcanum</i> Peralta (Pilowsky y Cohen, 1990).
Híbrido 3180	Híbrido comercial israelí (plantas de tomate tolerantes a TYLCV).
Vyta	Línea de plantas de tomate resultante del cruce de <i>Solanum chilense</i> (Dunal) Reiche (LA1969) con <i>S. lycopersicon</i> seguido por cuatro retrocruces con <i>S. lycopersicon</i> (Gómez y col., 2004).
Campbell-28	Plantas de tomate no transgénicas susceptibles a la infección con TYLCV.

3.1.3 Medios para el cultivo de bacterias.

LB (para 1 L): Triptona 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 10 g, pH 7.5. Para el medio sólido se añadió 15 g de agar.

YEB (para 1 L): Lab-lemco 0.4 g, bacto peptona 0.5 g, sacarosa 0.5 g, extracto de levadura 0.1 g, MgSO₄-7H₂O 0.05 g, pH 7.2.

3.1.4 Medios para el cultivo de células y tejidos vegetales.

Medio C-28 (para 1 L): Sales y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962) (número de catálogo M-5519, Sigma, EUA) 4.3 g, azúcar (industrial) 20 g, zeatina (Z, número de catálogo Z 3541, Sigma, EUA) 0.5 mg, ácido indolacético (AIA; número de catálogo I 2886, Sigma, EUA) 0.1 mg, Fitogel (número de catálogo P 8169, Sigma, EUA) 2g; pH 5.8.

Medio C-28L (para 1L): Sales y vitaminas MS (4.3 g), pH 5.8.

Medio C-28R (para 1L): Sales y vitaminas MS (4.3 g), azúcar (industrial) 30 g, Fitogel 2 g, pH 5.8.

Medio NT1 (para 1 L): Sales y vitaminas MS (4.3 g), azúcar (industrial) 30 g, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D; número de catálogo D 7299, Sigma, EUA) 2 mg; pH 5.8. (Para un litro de medio sólido se adicionan 2 g de Fitogel).

Todos los medios de cultivo se esterilizaron con vapor a 120°C y 1 atm de presión durante 20 min.

3.1.5 Soluciones.

Las soluciones y tampones necesarios se prepararon de acuerdo a la siguiente formulación.

Solución de acetosiringona (número de catálogo D 134406, Aldrich-Sigma, EUA) 3 mg/mL; se disuelve en etanol absoluto.

Solución de di-acetato de fluoresceína (número de catálogo F 7378, Sigma, EUA) 5 mg/mL; se disuelve en acetona.

Solución de kanamicina (sulfato de kanamicina) (número de catálogo K 0126, DUCHEFA, Holanda) 100 mg/mL, se disuelve en agua; se esteriliza por filtración.

Solución de carbenicillina (número de catálogo C 0109, DUCHEFA, Holanda) 50 mg/mL, se disuelve en agua; se esteriliza por filtración.

Solución depurizante: HCL 0.125 M.

Solución desnaturalizante: NaOH 1.5 M y NaCl 1.5 M.

Solución neutralizante: Tris-HCl 0.5 M pH 8 y NaCl 1.5 M.

SSC 1x: NaCl 0.15 M y citrato de sodio 0.015 M.

Soluciones de lavado para las hibridaciones: 2x (SSC 10x y SDS 0.1%); 1x (SSC 1x y SDS 0.1%); 0.1x (SSC 0.1x y SDS 0.1%).

Solución para corrida electroforética TBE: Tris-borato 0.09 M y EDTA 0.002 M pH 8.

Solución para corrida electroforética de ARN totales (MOPS 10x): MOPS 0.2 M, acetato de sodio 0.05 M pH 7, EDTA 0.01 M (ajustar a pH 7 con NaOH 5 M).

Tampón para corrida electroforética de muestra de ARN: MOPS 0.5x, formamida 50 %, formaldehído 2.2 M.

Tampón para corrida electroforética de muestra de ARN de pequeño tamaño o ARNi (4X): TBE 2x, sacarosa 40%, bromofenol azul 0.1%.

Tampón Church: Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄ 10 mM pH 6.5, SDS 20%, EDTA 1 mM, BSA 1%.

Tampón de reacción para la localización histoquímica de la β-D-glucuronidasa: ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolyl glucurónico (X-Gluc) 1 mg/mL, disuelto en tampón para la disolución de X-Gluc; se esteriliza por filtración.

Tampón para la disolución de X-Gluc: Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄ 100mM pH 7, Na₂EDTA 10 mM, K₄Fe(CN)₆-3H₂O 0.05mM, Tritón X100 0.1% (el X-Gluc se disuelve previamente en dimetilformamida).

Tampón de extracción de ADN total de las células NT1: Urea 7 M, NaCl 0.35 M, Tris-HCl 0.05 M pH 8, EDTA 0.02 M, Sarcosyl 1%.

Tampón para el lavado de las células de Agrobacterium (TE): Tris-HCL 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM.

Tampón para la extracción de ARN total: LiCL 100 mM, Tris-HCL 100 mM pH 8, EDTA 10 mM, SDS 1%.

3.1.6 Enzimas, cebadores para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y otros reactivos.

Las enzimas de restricción utilizadas provinieron de New England Biolabs y Promega, EUA. El [α -³²P] ATP se compró a Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra y CENTIS, Cuba. Los cebadores empleados se sintetizaron en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) con el sistema automático Gene Assembler Plus DNA Synthetizer (Pharmacia-LKB, Suecia) por el método del β -cianoetilfosforamidito (Sinha y col., 1983). Las secuencias de los cebadores utilizados en el presente trabajo se encuentran en el Anexo 1.

Otros reactivos necesarios se compraron a las casas comerciales Aldrich (EUA), Fluka (Suiza), Caledon (España), Merk (Alemania), Oxoid (Inglaterra), BDH (EUA), Gibco-BRL (EUA), Heber Biotec (Cuba), Sigma (EUA) y Duchefa (Holanda).

3.1.7 Plasmidios.

Diversos plasmidios se emplearon o generaron en las diferentes etapas de este trabajo (Anexo 2).

3.2 METODOLOGÍAS

3.2.1 Técnicas básicas para la manipulación y análisis del ADN.

Los procedimientos generales requeridos para el manejo del ADN se realizaron de acuerdo a lo descrito por Sambrook y col. (Sambrook y col., 1989). Las digestiones de ADN con las enzimas de restricción se realizaron de acuerdo a las recomendaciones de las casas comerciales de procedencia. Las electroforesis de ADN se efectuaron en geles de agarosa al 0.8 o al 1.2% (p/v) en tampón TBE 1x a 5 V/cm. La recuperación de fragmentos de ADN a partir de los geles de agarosa se hizo según los juegos de reactivos Sephaglas™ BandPrep Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc., EUA) y Concert™ Rapid PCR Purification System (GibcoBRL, EUA). Las sondas de ADN marcadas con [α -³²P] ATP se generaron de acuerdo al juego de reactivos Prime-a-Gene® Labeling System (Promega, EUA).

3.2.1.1 Estimación de la concentración de ADN en las preparaciones.

La concentración de todas las preparaciones de ADN se estimó visualmente por medio de la electroforesis en geles de agarosa al 0.8% con tinción de bromuro de etidium a 0.5 mg/mL (Sambrook y col., 1989). En algunos casos la concentración de ADN se estimó en un espectrofotómetro Gene Quant (Pharmacia); se consideró que una unidad de densidad óptica (D.O.) obtenida a 260 nm corresponde a 50 μ g/mL. En los casos del genoma viral

clonado, su concentración se estimó a partir de la concentración de los plasmidios en los que estaban contenidos, teniendo en cuenta la fracción másica (masa ADN viral/masa ADN plasmídico).

3.2.1.2 Transformación de *Escherichia coli*.

La preparación de las células de *E. coli* competentes y su transformación con plasmidios se realizaron según el método de Hanahan (Hanahan, 1983). También se usó el método de la electroporación según Sharma y Schimke (Sharma y Schimke, 1996).

3.2.1.3 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*.

Las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 y C58C1 se transformaron con los plasmidios binarios descritos en el Anexo 2. Las células previamente se crecieron en un precultivo (2 mL) durante 12 horas a 28°C en medio YEB, con el propósito de obtener el inóculo para un cultivo de 200 mL. Una vez que el cultivo de 200 mL alcanzó una densidad óptica (D.O.) igual a 0.4-0.5 unidades medida a 620 nm las células se lavaron con tampón TE dos veces, y se resuspendieron en 20 mL de medio YEB. Todo este proceso se realizó a 22-25°C. De esta manera las células se prepararon para ser transformadas. Las células preparadas para ser transformadas se conservaron a -70°C.

La transformación se llevó a cabo de acuerdo al siguiente protocolo. Se mezclaron 100 µL de las células con 5 µg de ADN y se incubó la mezcla por 5 min en hielo, 5 min en N₂-líquido y 5 min a 37°C. El ciclo se repitió dos veces. Se añadió 1 mL de medio LB y se incubó sin agitación a 28°C durante 4 h. Al cabo de este tiempo se crecieron las células transformadas en medio LB (sólido) que contenía los antibióticos de selección correspondientes a cada línea de células esperada.

3.2.1.4 Aislamiento y purificación de ADN.

La purificación del ADN de los plasmidios a partir de *E. coli* y *A. tumefaciens* se llevó a cabo por el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979).

La obtención del ADN vegetal genómico se llevó a cabo por el procedimiento descrito por Dellaporta y col. (Dellaporta y col., 1983), con modificaciones detalladas previamente por Herrera y col. (Herrera y col., 1999).

El ADN geminiviral se coextrajo con el ADN del vegetal por el procedimiento descrito por Rom y col. (Rom y col., 1993).

3.2.1.5 Hibridación de ADN (ensayo tipo *Southern blot*).

La hibridación de ADN se realizó según la técnica descrita por Southern (Southern, 1975). El ADN extraído de las plantas de tomate, digerido con enzimas de restricción, se separó en gel de agarosa al 0.8%. Los extractos digeridos de ADN separados de acuerdo a su talla, se transfirieron usando vacío con el empleo de la unidad de transferencia TE80 (Amersham

Pharmacia Biotech, Inglaterra) a membranas de nitrocelulosa Hybond N+ (Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra). El gel se trató con soluciones depurinizante, desnaturalizante, neutralizante y SSC 20x de acuerdo a las instrucciones descritas por el fabricante para el trabajo con la membrana de nitrocelulosa Hybond N+. El ADN se fijó a las membranas con luz ultravioleta (120 mJ/cm^2) con el uso del equipo "UV-crosslinker" ($E=120 \text{ mJ/cm}^2$) (Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra). Las pre-hibridaciones y las hibridaciones con sondas radiactivas se realizaron en tampón Church a 60 ó 65°C. Los lavados se realizaron a conveniencia con las soluciones SSC 2x (bajo restringente), SSC 1x (poco restringente) o SSC 0.1x (restringente). Después de los lavados, las membranas de Hybond se auto-radiografiaron en películas de rayos X (Kodak o AGFA, Japón) a -70°C hasta su revelado.

3.2.2 Técnicas de análisis y manipulación de ARN.

3.2.2.1 Tratamiento especial de soluciones y materiales para el trabajo con ARN.

Todas las soluciones empleadas para el trabajo con ARN fueron tratadas con dietil-pirocarbonato (DEPC, número de catalogo D 5758, Sigma, EUA) al 0.1% (toda la noche en agitación) y luego autoclaveadas durante 30 min a 120°C y 1 atm. La cristalería y plásticos empleados se esterilizaron con vapor a 120°C y se hornearon a 70°C durante toda la noche. Los materiales que no se pueden esterilizar se trataron con SDS 0.1% durante toda la noche.

3.2.2.2 Aislamiento de ARN total.

Se colectaron 0.5 g de células de suspensión o de hojas del extremo apical de plantas de tomate y se maceraron en presencia de N_2 -líquido. Se adicionaron 500 μL de fenol-tampón de extracción (1:1) y se agitó vigorosamente durante 30 s. Luego se añadieron 250 μL de cloroformo-isoamil alcohol (24:1) y se agitó. Las muestras se centrifugaron a 3000 g a temperatura ambiente durante 10 min. El sobrenadante se mezcló con igual volumen de LiCl 4M. Se dejó precipitando a -20°C durante toda la noche. Se centrifugaron las muestras a 3000 g a 4°C durante 10 min. El precipitado se disolvió en agua y se precipitó a -20°C durante 20 min por adición de 0.1 volumen de acetato de sodio 3M pH 5.2 y dos volúmenes de etanol absoluto. A continuación, las muestras se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos. El precipitado se lavó con etanol 70% y se secó al vacío. Las muestras se resuspendieron en agua y se guardaron a -70°C.

3.2.2.3 Estimación de la concentración de ARN en las preparaciones.

La concentración de la solución de ARN se determinó en un espectrofotómetro Gene Quant (Pharmacia). Se consideró que una unidad de D.O. obtenida a 260 nm equivale a 40 $\mu\text{g/mL}$.

3.2.2.4 Purificación de ARN de pequeño tamaño o ARNi.

El ARN total se mezcló con polietilenglicol y NaCl hasta quedar a una concentración del 5% y 0.5 M respectivamente. Se dejó en hielo por 30 minutos y luego se centrifugó en condiciones de 4°C a 3000 g durante 10 min. Las moléculas de ARN de pequeño tamaño (que permanecen en el sobrenadante) se precipitaron por adición de 0.1 volúmenes de acetato de sodio pH 5.2 y 3 volúmenes de etanol absoluto toda la noche a -20°C. Luego, las muestras se lavaron con etanol 75% y se secaron a temperatura ambiente.

3.2.2.5 Preparación de la muestra de ARN para la corrida.

El ARN total extraído se precipitó por adición de 0.1 volumen de acetato de sodio 3M pH 5.2 y dos volúmenes de etanol durante 10 min a -70°C. El precipitado se sumergió en etanol 75% por 10 min, se centrifugó y se resuspendió en tampón de la muestra. Se calentó a 65°C durante 10 min y se le adicionó solución de corrida de ADN "blue/orange" 6X (Promega, EE.UU.).

Para el caso del ARN de pequeño tamaño, las muestras después de la precipitación toda la noche, se resuspendieron en formamida, se calentaron 10 min a 65°C y se le adicionó solución de corrida para ARN de pequeño tamaño.

3.2.2.6 Hibridación de ARN (ensayo tipo *Northern blot*).

La separación por peso molecular del ARN total se efectuó en gel de agarosa (agarosa al 1%, MOPS 10x 10% y formaldehído 38%) a 100 V. Como tampón de corrida se empleó MOPS 1x.

Después de la electroforesis el gel se lavó con agua tres veces por 5 min cada vez con agitación suave. Se eliminó el agua, se añadió SSC 10x y se agitó durante 15 min suavemente. Este paso se repitió una vez más. La transferencia se realizó durante 2h usando vacío con el empleo de la unidad de transferencia TE80 (Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra) a membrana de nitrocelulosa Hybond N+ (Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra). La solución de transferencia empleada fue SSC 10x. El ARN se fijó a las membranas con luz ultravioleta (120 mJ/cm²) con el uso del equipo UV-crosslinker (Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra)

El ARN de pequeño tamaño se separó en gel de acrilamida (acrilamida 15%, urea 7M, TBE 0.5x). Como tampón de corrida se empleó TBE 0.5X.

Después de la electroforesis el gel se transfirió a una membrana Hybond N+ usando como solución de transferencia TBE 0.5x durante 2 horas al vacío de igual forma a la descrita anteriormente. La membrana se equilibró durante 20 min sobre papel de filtro 3MM (Whatman, EUA) humedecido en SSC 20x. El ARN se fijó a la membrana con luz ultravioleta

(120 mJ/cm²) con el uso del equipo UV-crosslinker (Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra)

Las pre-hibridaciones y las hibridaciones con sondas radiactivas se realizaron en tampón Church a 55 y 50°C, según los análisis requeridos. Los lavados se realizaron con la solución SSC 2x (bajo restringente). Después de los lavados, las membranas de Hybond se autoradiografiaron en películas de rayos X (Kodak o AGFA, Japón) a -70°C hasta su revelado.

3.2.3 Metodologías desarrolladas para la realización de los objetivos de este trabajo.

3.2.3.1 Demostración de la capacidad de replicación de TYLCV-[CU] en células de tabaco de la línea NT1.

3.2.3.1.1 Obtención y mantenimiento de una suspensión a partir de la línea celular de tabaco NT1.

La línea celular NT1 (Paszty y Lurquin, 1987) se propagó en medio NT1 sólido por tres meses con subcultivos cada 20 días para establecer una masa de células homogénea. Para la obtención de una suspensión celular se inoculó aproximadamente 5 g de la masa celular en 100 ml de medio NT1 líquido, y se desagregó durante un mes y medio en condiciones de oscuridad, $t = 24\text{ }^{\circ}\text{C}$ y agitación en zaranda a 110 rpm (New Brunswick Scientific, EE.UU.). Una vez que se comprobó, a través del aumento del volumen de sedimentación, que el crecimiento de la masa celular en medio líquido alcanzó la mitad del volumen total, se procedió a subcultivar la desagregación. Para los subcultivos se tomaron cada vez alrededor de 2×10^6 células y se inocularon en 100 mL de medio NT1 líquido. Cada 10 días se evaluó la vitalidad de la suspensión, para lo cual se realizó el conteo de células vivas. Para este conteo las muestras de células se trataron con di-acetato de fluoresceína y se observó la preparación en la cámara de Neubauer, usando el microscopio óptico Olympus (Tokio, Japón). Las células vivas, tratadas con di-acetato de fluoresceína emitieron una fluorescencia verde cuando se excitaron con luz ultravioleta procedente del mismo microscopio. Mientras, las células muertas permanecieron indetectables en el fondo oscuro. (De esta manera se puede dar seguimiento al desarrollo de cualquier suspensión). El subcultivo de la suspensión lograda se realizó cada vez que el volumen de sedimentación rebasó la mitad del volumen total (aproximadamente cada 10 días).

3.2.3.1.2 Transfección de TYLCV-[CU] en células de tabaco de la línea NT1.

La inoculación de las células NT1 con TYLCV-[CU] se realizó mediante el método de biobalística utilizando una pistola de genes construida según el diseño de Finer y col. (Finer y col., 1992). Para la transformación se emplearon células en fase temprana de crecimiento

exponencial, al 4^{to} día del subcultivo. Las células se colectaron sobre discos de papel Whatman #1 mediante el empleo del erlenmeyer de Buchner. Por cada disco se colectó aproximadamente medio millón de células. Previo al bombardeo los discos se incubaron en medio MS con sorbitol y manitol 0.2 M durante 6 horas en la oscuridad y a 24 °C. Para realizar el bombardeo con las partículas de oro portadoras del ADN viral se preparó una mezcla con el plasmidio pZTYL (linealizado previamente mediante la digestión con *SacI*), según protocolo reportado por Sanford y col. (Sanford y col., 1993) modificado en este trabajo. Esta mezcla contenía 50 µL de partículas de oro (suspendidas en glicerol 50% estéril, a 60 mg/mL) + 10 µL de pZTYL (30 µg) + 50 µL CaCl₂ (2.5 M) + 20 µL de espermidina (0.1 M). La mezcla se agitó durante un minuto, y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de centrifugar brevemente a 3000 g las partículas se resuspendieron en 140 µL de etanol absoluto. Se repitió la centrifugación en las mismas condiciones y se resuspendieron en 25 µL de etanol absoluto. Para el proceso de aceleración de las partículas se tomaron 3 µL de mezcla por cada disparo. El bombardeo se realizó en condiciones de vacío (28 mm de Hg). La presión de cada disparo alcanzó 85 psi y la muestra se situó a 10 cm aproximadamente del dispositivo de salida de los gases. Después del bombardeo las células transfectadas se incubaron en medio líquido NT1 durante 6 días en la oscuridad, a 25°C.

3.2.3.1.3 Análisis de la replicación de TYLCV-[CU] en células NT1.

Las células NT1 transfectadas se colectaron y congelaron en N₂-líquido. Se maceraron con punta de vidrio y se le agregaron 500 µL de tampón de extracción. El macerado se incubó 30 min a temperatura ambiente mezclando periódicamente. Luego se trató con una mezcla de fenol/cloroformo (v/v) hasta eliminar los contaminantes proteicos. El ADN total se obtuvo después de una precipitación con isopropanol (v/v).

El ADN o su digestión con las enzimas *Mung Bean* o *Mbo I* se sometió al ensayo tipo Southern blot según descripción en la sección 3.2.1.5. La secuencia génica correspondiente a la proteína de la cápside de TYLCV se empleó como sonda para la detección del genoma viral.

3.2.3.2 Obtención de un dímero de TYLCV-[CU].

Para la construcción del dímero de TYLCV-[CU] se partió del plasmidio pZTYL, el cual fue generado previamente con la clonación de TYLCV-[CU] en el vector pZeroTM-2.1 (Invitrogen, San Diego, CA) en el laboratorio de Virología de Plantas del CIGB. pZTYL se digirió con la enzima *Sac I* durante 20 minutos para obtener una digestión parcial. Por otro lado una banda de virus fue escindida del vector mediante una digestión total durante 1 hora con la misma enzima. El producto de la digestión parcial de 6.2 Kb aproximadamente

(pZero + TYLCV-[CU]) fue tratado con fosfatasa alcalina y ligado con la banda de TYLCV-[CU] obtenida de la digestión total durante 4h a temperatura ambiente, obteniéndose el plasmidio pZ2TYL. El dímero de TYLCV-[CU] se escindió del pZ2TYL mediante una digestión *HindIII/BamHI* y ligado en el plasmidio binario pZP200, digerido en los sitios *HindIII/BamHI*. Se obtuvo así el plasmidio p2TYL.

3.2.3.2.1 Demostración de la replicación de TYLCV-[CU] a partir del dímero de TYLCV-[CU] (construcción p2TYL) en plantas de tomate variedad Campbell 28.

Las plantas se infectaron con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 previamente transformada con el plasmidio binario p2TYL que contiene el dímero de TYLCV-[CU]. Las colonias de *Agrobacterium tumefaciens* seleccionadas, se inocularon en cultivos de 2 mL de medio LB líquido que contenía rifampicina 50 mg/L, espectinomicina 100 mg/L, estreptomomicina 100 mg/L y carbenicilina 100 mg/L. Se crecieron con agitación durante aproximadamente 16 h a 28°C hasta alcanzar una D.O. de 2 unidades a 620 nm. Cien microlitros de estos cultivos se depositaron en la zona de inoculación (heridas en la base del tallo y la parte apical de la planta). La aparición y evolución de los síntomas se examinó sistemáticamente.

3.2.3.3 Desarrollo de construcciones génicas para el silenciamiento del gen *c1* de TYLCV-[CU] (pZP*c1*antisentido, pZP*c1*antisentidoI2*c1* y pCambia3300 *c1*antisentidoI2*c1*).

El gen *c1* de TYLCV-[CU] se amplificó por PCR con los oligonucleótidos A y B (Anexo 1) a partir de p2TYL (programa: 1 min a 94°C, 1 min a 46°C, 3 min a 72°C, en 35 ciclos). El producto se digirió con las enzimas *XhoI* y *BamHI*, y la secuencia resultante se clonó en el plasmidio pBPΩ8 (Coego y col., 1996) digerido *XhoI* y *BamHI*. La construcción resultante (pBP*c1*antisentido) se digirió con la enzima *HindIII* para extraer el casete que contenía en este orden, el promotor 35S, la secuencia de *c1* en antisentido y el terminador tNOS. Este casete se insertó en el vector binario pZP200 en el sitio *HindIII*. Así se obtuvo el plasmidio pZP*c1*antisentido (diseño *c1*antisentido). A continuación, se amplificó por PCR la secuencia *c1* a partir de p2TYL, utilizando los oligonucleótidos B y C (Anexo 1) (se utilizó el mismo programa descrito para los oligos A y B). La secuencia obtenida se digirió con *KpnI* y *BamHI*, y se clonó en el vector pBP*c1*antisentido digerido previamente con *BamHI/KpnI* (se obtuvo pBP*c1*antisentido-*c1*). Después, se amplificó por PCR el intrón de la catalasa del frijol variedad Castor utilizando los oligonucleótidos D y E (Anexo 1) (programa: 1 min a 94°C, 1 min a 55°C, 1 min a 72°C, en 35 ciclos) a partir del plasmidio pWJJK.IN-2, amablemente suministrado por el Dr. Wang (CSIRO, Australia). La secuencia amplificada del intrón se digirió con la enzima *ClaI* y se clonó en el sitio *ClaI* de pBP*c1*antisentido-*c1* que se

encuentra en la posición 348 del gen *c1*. De esta manera se obtuvo el plasmidio pBP*c1*antisentido-intron-*c1* que contiene 727 pares de nucleótidos hacia el extremo 3' de la *c1* en ambas direcciones, simulando los brazos del diseño de horquilla o gancho de pelo – del inglés “hairpin” ARN. El fragmento enmarcado en los sitios *Hind*III se clonó en el vector binario pZP200 digerido con *Hind*III. Así se obtuvo el plasmidio pZP*c1*antisentidoI-2*c1* (diseño *hpc1* o “hairpin *c1*”). Para obtener el plasmidio pCambia3300*c1*antisentidoI-2*c1* (*hpc1*-Basta) el mismo fragmento se clonó en el plasmidio pCambia3300 digerido con *Hind*III.

3.2.3.4 Obtención de líneas celulares transgénicas de NT1 que porten la construcción *c1*antisentido.

La línea celular NT1 se transformó con la construcción pZP*c1*antisentido utilizando una pistola de genes construida según el diseño de Finer y col. (Finer y col., 1992). Se empleó la metodología descrita en la sección 3.2.3.1.2. Después del bombardeo las muestras se incubaron durante 2 días con medio NT1 líquido y después se pasaron a medio NT1 sólido que contenía 25 mg/L de kanamicina. En los siguientes subcultivos (cada 20 días) el contenido de kanamicina en el medio se aumentó hasta 150 mg/L.

3.2.3.4.1 Análisis de la presencia de la construcción *c1*antisentido en las células NT1 mediante la técnica de PCR.

A partir del ADN cromosómico de las células tabaco seleccionadas en medio NT1 sólido que contenía 150 mg/L de kanamicina se realizó una PCR con la pareja de oligonucleótidos (B y C; Anexo 1) que hibridan en el extremo 5' y 3' del gen *c1* (programa: 1 min a 94°C, 1min a 50°C, 3 min a 72°C, en 35 ciclos). Los productos de la PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 0.8%.

3.2.3.5 Análisis de la inhibición de la replicación de TYLCV-[CU] en las células NT1 transgénicas.

Las células de las líneas transgénicas seleccionadas en 150 mg/L de kanamicina durante 6 meses se inocularon en medio líquido para el establecimiento de una suspensión celular según metodología descrita anteriormente (acápite 3.2.3.1.1). Las células de las suspensiones establecidas se transfectaron con TYLCV-[CU] como se describe en el acápite 3.2.3.1.2, y después de 6 días de incubación en medio líquido, se les extrajo el ADN total para su análisis mediante el ensayo *Southern blot* igual a como se procedió en el acápite 3.2.3.1.3.

3.2.3.6 Determinación del mecanismo de inhibición de la replicación de TYLCV-[CU] en células que portan la construcción *c1antisentido*.

Para ello se obtuvieron las fracciones de ARN correspondientes a alto y bajo peso molecular a partir del ARN total de las líneas transgénicas Ant2, Ant3 y Ant4. La fracción de ARN de alto peso se sometió al análisis de ARNm específicos para *c1*, y la de bajo peso al análisis de la presencia de ARNi, complementarios a la secuencia de *c1* a través del ensayo *Northen blot* y metodologías descritas en los acápites 3.2.2.4, 3.2.2.5, 3.2.2.6.

3.2.3.7 Obtención de plantas transgénicas de tomate var. Campbell 28 que porten las construcciones génicas *c1antisentido* y *hpc1*.

3.2.3.7.1 Establecimiento de las condiciones de regeneración de hojas cotiledonales de tomate var. Campbell 28.

Para la obtención de los explantes a regenerar se desinfectaron las semillas de la variedad Campbell 28 para su posterior germinación en condiciones ascépticas. Para ello las semillas se hidrataron durante 2-3 horas y luego se incubaron en condiciones de agitación a 100 rpm durante 20 minutos sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio al 3%. Se realizaron posteriormente 4 enjuagues con agua estéril y se sembraron en medio MS contenido en magentas (número de catálogo V 1601; Duchefa, Holanda) en condiciones de 16 horas luz con una intensidad de $50.22 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ a una temperatura de 24°C . Los germinados de 9 días se utilizaron como donantes de los explantes cotiledonales. Los cotiledones, sumergidos en medio C-28L, se cortaron por ambos extremos y se colocaron sobre medio C-28 que contiene combinaciones de AIA (0.1-4 mg/L) y Z (0.1-2 mg/L), y azúcar (5-60 g/L). También se ensayaron dos tipos de agentes solidificantes, agar-agar (7 g/L) y Fitogel (2 g/L). La incubación se efectuó con el envés del cotiledon hacia arriba en condiciones de 16 horas de iluminación con una intensidad de $50.22 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y una temperatura de 24°C . Para la evaluación de cada combinación hormonal se emplearon 35 explantes.

3.2.3.7.2 Transformación de hojas cotiledonales de tomate var. Campbell 28.

La transformación de hojas cotiledonales de tomate se efectuó según el protocolo descrito por Sheila McCormick, 1986 (McCormick y col., 1986) con varias modificaciones optimizadas en este trabajo. Los cotiledones de germinados de 9 días de incubación se cortaron por ambos extremos y se sembraron con el envés hacia arriba en placas Petri que contenían medio C-28 sin hormonas, a razón de 60 explantes por placa. La cepa LBA 4404 de *Agrobacterium tumefaciens* se creció durante 48 horas en medio YEB en presencia de rifampicina 50 mg/L, estreptomina 100 mg/L y espectinomicina 100 mg/L o kanamicina 30 mg/L, en dependencia del vector binario utilizado. Una vez crecida la bacteria se tomó 1 mL

del cultivo y se adicionó en 4 mL de YEB sin antibióticos. Después se puso a crecer durante 6 horas hasta que la densidad óptica alcanzó una absorbancia de 0.6-0.8 unidades, medida a una longitud de onda de 620 nm. Un mL de este cultivo se centrifugó a 2000g durante 10 minutos y el sedimento obtenido se resuspendió en 20 mL de medio C-28L que contenía 400 μ L de solución de acetosiringona. Inmediatamente después, 10 μ L de la bacteria se inocularon sobre cada explante. La incubación (cocultivación) con la bacteria se realizó durante 72 horas en la oscuridad, a una temperatura de 22^oC.

3.2.3.7.2.1 Ajuste de la concentración óptima de *Agrobacterium* y el tiempo de cocultivación para la transformación de los cotiledones. Ensayo de un pretratamiento y dos temperaturas en la cocultivación.

En el ajuste de la concentración óptima de *Agrobacterium* se siguió el protocolo de transformación descrito en el acápite 3.2.3.7.2. Se utilizó como vector la cepa LBA4404 de *Agrobacterium*, portadora de la construcción pCambia2301. Esta construcción permite evidenciar la transformación a través de la actividad del gen reportero *uidA* aplicando el ensayo GUS-histoquímico (Jefferson y col., 1987). Las diferentes concentraciones de la bacteria se obtuvieron en medio que contenía sales, vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962) y acetosiringona. Al tercer día de la cocultivación se detectó la actividad del gen *uidA* mediante la realización del ensayo GUS-histoquímico.

El pretratamiento de los explantes se realizó mediante la incubación en medio de regeneración C-28 durante 1 ó 2 días antes de la infección con *A. tumefaciens*.

3.2.3.7.2.2 Determinación del antibiótico apropiado para la eliminación de *A. tumefaciens* después de la cocultivación con los explantes cotiledonales.

Se evaluó la influencia de la carbenicilina y el clafórán sobre la eficiencia de regeneración a partir de las hojas cotiledonales. Para ello los explantes cotiledonales de germinados de 9 días fueron puestos a regenerar en medio C-28 enriquecido con 500 mg/L de carbenicilina o 500 mg/L de clafórán, en las condiciones descritas anteriormente. La evaluación de la eficiencia de regeneración se realizó a los 35 días de iniciada la incubación. Se analizó el número promedio de brotes ciegos (sin ápice) por explante, el número promedio de brotes normales por explante regenerado y la eficiencia de regeneración (número de brotes normales por explantes totales). Además se contabilizó el porcentaje de explantes que regeneró brotes normales.

3.2.3.7.3 Obtención de plantas transgénicas de tomate.

Para la obtención de plantas transgénicas de tomate se siguió la metodología descrita en la sección 3.2.3.7.2. Los cotiledones una vez que se incubaron 72 horas se pasaron para medio C-28 contenido en pomos de cristal, y en el cual estaban presentes además la kanamicina (100 mg/L) o glufosinato de amonio (6 mg/L), y la carbenicillina (500 mg/L). En lo adelante la regeneración ocurrió en condiciones de 16 horas luz con una intensidad de $50.22 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ a una temperatura de 24°C . Una vez que los brotes se definieron a plantas de 2-3 cm de altura se escindieron y se cultivaron en medio C-28R que contenía kanamicina 25 mg/L o glufosinato de amonio (6 mg/L), y carbenicillina 250 mg/L. Después de alcanzar una altura de 15 cm las plantas se adaptaron a condiciones controladas de casa de cultivo, y en los 15 días siguientes a condiciones de parcela experimental a cielo abierto. En estas condiciones naturales y en concomitancia con plantas no transgénicas enfermas con TYLCV-[CU], en presencia del vector natural se seleccionaron aquellas que no mostraron síntomas de la enfermedad del encrespamiento y amarillamiento de la hoja en el período necesario para su fructificación (tres meses). Posteriormente, se recogieron las semillas, y de esta manera se logró obtener la progenie de cinco clones por cada construcción.

Todos los experimentos que se desarrollaron con plantas transgénicas de tomate en condiciones de invernadero y parcela experimental fueron autorizados por el Centro Nacional de Seguridad Biológica mediante el otorgamiento de tres licencias:

- 1- 56/04 Evaluación de resistencia de las plantas transgénicas a la infección por *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) en condiciones de invernaderos.
- 2- 57/04 Evaluación de resistencia de las plantas transgénicas a la infección por TYLCV en condiciones de parcela experimental.
- 3- 58/04 Obtención de semillas de las plantas transgénicas en condiciones de parcela experimental.

3.2.3.7.4 Selección de las líneas transgénicas de tomate para la realización de la inoculación viral.

Para seleccionar las líneas transgénicas de tomate, las semillas R1 ó R2 de cada clon se germinaron en medio MS. Los germinados crecidos se indujeron a enraizar en medio MS que contenía kanamicina 25 mg/L. Sólo las plantas que desarrollaron un buen sistema radicular se seleccionaron para los experimentos de inoculación viral.

3.2.4 Análisis de la inhibición de la multiplicación de TYLCV-[Cu] en plantas transgénicas de tomate variedad Campbell 28.

Para el análisis de la multiplicación de TYLCV-[Cu] en los clones transgénicos la progenie de éstos se cultivó hasta tener 6-7 hojas y se inoculó en condiciones controladas con 50 moscas por planta. Las plantas crecieron durante 30 días manteniendo una creciente

población de la mosca, que no disminuyó en el transcurso de toda la experimentación. La evaluación del curso de la infección se realizó a los 15 y 30 días mediante un ensayo ELISA, dirigido a la detección de la proteína de la cápside viral. Además, a partir de los valores de absorbancia se determinó el porcentaje de plantas infectadas.

3.2.4.1 Inoculación viral mediada por la mosca blanca.

En condiciones de casa de cultivo se multiplicó una colonia de moscas blancas alimentada sobre plantas infectadas con el dímero de TYLCV-[CU] mediante la agroinoculación. Esta colonia se creció en varias generaciones en presencia de las plantas enfermas. Antes de inocular las plantas transgénicas de tomate con esta colonia de moscas se demostró que las plantas sanas de tomate Campbell 28 se enferman con una frecuencia del 100% del total de plantas expuestas a la mosca. La inoculación de TYLCV-[CU] en las plantas de tomate transgénicas se realizó en presencia de esta colonia de moscas blancas.

3.2.4.2 Análisis de la presencia viral en plantas inoculadas con TYLCV-[CU] mediante un ensayo ELISA.

Se realizó un ensayo ELISA indirecto con tres anticuerpos para la detección de TYLCV según el procedimiento recomendado por el proveedor del estuche de reactivos (Neojen, Inglaterra). Las plantas se consideraron infectadas cuando los valores de absorbancia, determinados a 405 nm resultaron al menos el doble de los valores obtenidos para las plantas no inoculadas.

3.2.5 Demostración de la resistencia frente a TYLCV-[CU] de los clones transgénicos de tomate.

Para ello se inocularon plantas que contenían de 2 a 4 hojas y la cantidad de moscas para la inoculación alcanzó los 300 individuos por planta. Las plantas se evaluaron mediante el ensayo ELISA a los 15 y 30 días, y mediante el ensayo *dot blot* al cabo de los 60 días.

3.2.5.1 Análisis de la presencia del genoma viral en plantas inoculadas, mediante la hibridación tipo *dot-blot*.

La cantidad del genoma de TYLCV-[CU] en las plantas infectadas se cuantificó por *dot blot*. Para ello se aisló el ADN de la planta según el método descrito por Rom y col. (Rom y col., 1993). Dos discos de las hojas más jóvenes se trituraron con una punta de cristal en 30 μ L de NaOH 0.4 N. La mezcla se centrifugó a 3000g durante 2 min. Del sobrenadante del extracto de ADN se tomaron 3 μ L y se aplicaron sobre una membrana Hybond N+ con ayuda de un dispositivo comercial (Hibrid-Dot manifold, Gibco, EE.UU). Cuando la membrana se secó, las muestras de ADN se fijaron a la membrana como se describe en las secciones 3.2.1.5 y 3.2.2.6. La sonda empleada para la hibridación consistió en una secuencia de 500 nucleótidos del genoma de TYLCV-[CU] que incluyó la región intergénica y

la 5' del gen *c1*. Se realizó una curva patrón con extractos de ADN a partir de plantas no inoculadas que contenían 10 ng, 1 ng, 100 pg y 10 pg del genoma de TYLCV-[CU] clonado en pZero.

3.2.6 Demostración de la resistencia contra TYLCV-[CU] del clon transgénico 126 en comparación con variedades tolerantes y resistentes obtenidas por mejoramiento tradicional.

Para este experimento se utilizó la colonia de mosca blanca empleada anteriormente. La cantidad de moscas por planta osciló entre 100 y 300 individuos y las plantas empleadas tenían de 2 a 4 hojas en el momento inicial de la inoculación. La evaluación se efectuó a los 15 días del comienzo de la inoculación. Se analizó la carga viral mediante el ensayo ELISA y se cuantificó la cantidad de genoma viral presente en cada planta mediante el ensayo *dot blot*. Para la hibridación se empleó como sonda la secuencia de la región intergénica de TYLCV-[CU].

3.2.7 Análisis del rendimiento productivo en parcela experimental del clon 126 inoculado con TYLCV-[CU].

Para determinar el rendimiento productivo del clon 126 en condiciones de inoculación con TYLCV-[CU] se germinaron plantas del clon 126, Campbell 28 no transgénico y Vyta (variedad tolerante a TYLCV) en una bandeja de poliespuma con substrato orgánico. Las plantas germinadas se inocularon con TYLCV-[CU] en condiciones de casa de cultivo, en presencia de la misma colonia de moscas empleada con anterioridad. Las plantas se inocularon cuando tenían 2 hojas verdaderas durante 30 días con una densidad de 100 moscas por planta. Al cabo de este tiempo las plantas se transfirieron a la parcela experimental del CIGB. Para la evaluación del rendimiento de las tres variantes de tomate los frutos se cosecharon al alcanzar la madurez (color del fruto naranja-rojo). Se evaluó el diámetro y peso de cada fruto, la cantidad promedio de frutos por planta y la cantidad total de frutos por variante.

3.3 Biometría.

Para la comparación de medias muestrales en los diferentes experimentos de regeneración y evaluación del rendimiento de las plantas de tomate se utilizó el programa estadístico "Statgraphics plus" versión 5.1.

En los análisis de la segregación del carácter de resistencia a kanamicina en las plantas transgénicas de tomate que portan las construcciones de *c1*antisentido y *hpc1* se aplicó la prueba de χ^2 (Sigarroa, 1985). Para ello se plantearon las siguientes hipótesis:

Prueba 1.

H_0 : La muestra de plantas analizadas presenta una proporción 3:1 de plantas enraizadas en Km: plantas no enraizadas en Km;

H_1 : La proporción plantas enraizadas en Km: plantas no enraizadas es diferente a 3:1.

Prueba 2.

El nivel de significación seleccionado para estas pruebas fue de 0.05.

En el análisis de la actividad biológica de los clones transgénicos de tomate contra TYLCV-[CU] la distribución de las plantas en presencia de mosca blanca se realizó acorde a un Diseño Completamente Aleatorizado.

En el experimento de evaluación del rendimiento del clon 126 en comparación con Campbell 28 no transgénico y la variedad Vyta la distribución de las plantas en la parcela experimental se realizó acorde a un Diseño de Bloques Al Azar.

4 RESULTADOS

Para la obtención de plantas de tomate de la variedad Campbell 28 resistentes a la enfermedad del amarillamiento y encrespamiento de la hoja el trabajo se estructuró en tres etapas. En la primera etapa se diseñaron dos construcciones genéticas para estimular el silenciamiento génico post-transcripcional del gen *c1* de TYLCV-[CU], y se comprobó la funcionalidad *a priori* de una de las dos en un sistema celular de tabaco como modelo. En la segunda, se realizó la obtención de las plantas de tomate transgénicas portadoras de estas construcciones y su caracterización molecular. Por último la tercera etapa abarcó el análisis del comportamiento de las plantas de tomate transgénicas inoculadas con TYLCV-[CU].

4.1 Desarrollo de construcciones para el silenciamiento génico post-transcripcional del gen *c1* de TYLCV-[CU]. Demostración de la funcionalidad de la construcción que contiene *c1*antisentido en células de tabaco de la línea NT1.

Para el silenciamiento génico post-transcripcional del gen *c1* de TYLCV-[CU] se diseñaron dos construcciones. La primera contenía la secuencia de *c1* en antisentido (construcción *c1*antisentido) para inducir la formación del ARN de doble cadena una vez que ocurre la síntesis de los transcritos a partir de TYLCV-[CU]. La segunda origina un ARN con una estructura de horquilla a partir de dos secuencias invertidas repetidas de *c1* ligadas por un intrón (construcción *hpc1*). A diferencia de la primera, esta segunda construcción debe inducir la formación de doble cadena de ARN independientemente de la presencia de TYLCV-[CU].

El silenciamiento del gen *c1* se analizó en células de tabaco de la línea NT1 portadoras de la construcción que contiene el gen *c1*antisentido.

4.1.1 Demostración de la capacidad de replicación de TYLCV-[Cu] en células de tabaco de la línea NT1. Obtención de un dímero de TYLCV.

Con el objetivo de establecer un modelo para la demostración de la inhibición de la replicación de TYLCV-[CU] mediante el silenciamiento del gen *c1* se evaluó primeramente la capacidad de las células NT1 (Figura 3A) de replicar este virus. Para ello las células (Figura 3) se transfectaron con el plasmidio pZTYL (Figura 6).

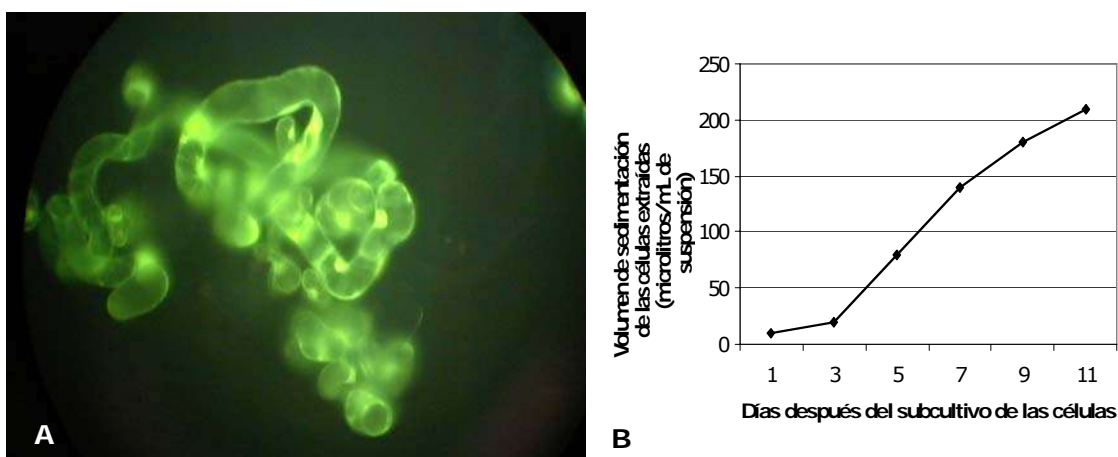


Figura 3. Morfología y curva de crecimiento de las células en suspensión de la línea de tabaco NT1. **A:** Preparación de células NT1 en acetato de fluoresceína (aumento de 200X, microscopio Olympus, Japón); **B:** Curva de crecimiento de las células NT1 en medio de suspensión.

Como resultado de la transfección se aprecia la aparición de una señal de hibridación al cuarto día de incubación de las células, con tamaño de 1.6 kb, correspondiente a la talla del genoma de cadena sencilla de TYLCV-[CU] (Figura 4A, carril 3). Esta señal se acentúa para el quinto y sexto días de incubación de las células bombardeadas (Figura 4A, carriles 4 y 5).

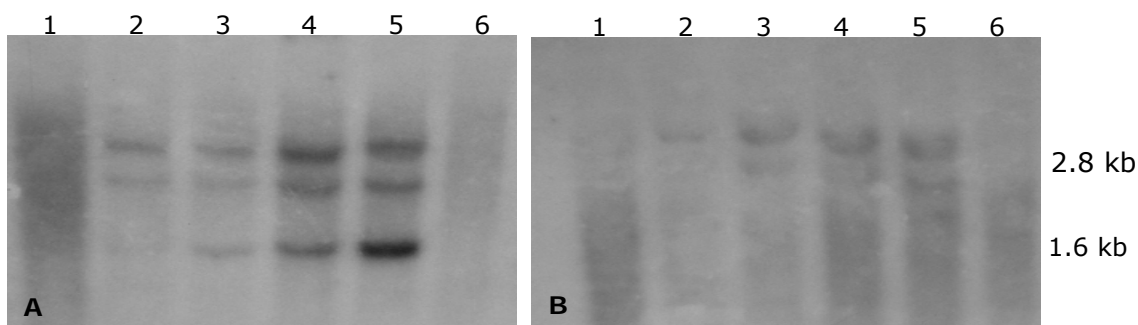


Figura 4. Autorradiografía del ensayo tipo *Southern blot* para la detección de la replicación de TYLCV-[CU] en células de tabaco NT1. Se empleó como sonda el genoma de TYLCV-[CU]. **A:** muestras de ADN total de células NT1 inoculadas con TYLCV-[CU], colectadas a los 2, 3, 4, 5 y 6 días de incubación (carriles 1, 2, 3, 4, 5). Carril 6: células no inoculadas. **B:** las mismas muestras de ADN que en **A** pero tratadas con la nucleasa *Mung Bean*.

Para confirmar que la señal que aparece a partir del cuarto día con talla de 1.6 kb corresponde al ADN viral de simple cadena otras muestras se trataron previo a la hibridación con la nucleasa *Mung Bean*. La actividad de esta nucleasa es específica de cadena sencilla, por lo que debe ocurrir una degradación del genoma simple cadena. La autorradiografía de las muestras tratadas con la nucleasa refleja la desaparición de la señal correspondiente a 1.6 kb (Figura 4B), lo cual confirma la replicación de TYLCV-[CU] y su acumulación a partir del cuarto día de incubación.

Para reafirmar que el ADN viral es de nueva síntesis y no un remanente del plasmidio utilizado, también se realizó una digestión con la endonucleasa *MboI* a las muestras de ADN

obtenidas de las células bombardeadas. Esta enzima permite distinguir el ADN sintetizado en procariontes del sintetizado en eucariontes debido a las diferencias entre los patrones de metilación de ambos tipos celulares. El ADN usado como inóculo en las células NT1 se obtuvo a partir de la cepa de *Echerichia coli* XL-1 Blue, que realiza la metilación Dam. Por tanto, el ADN se encuentra metilado en la secuencia GATC y es resistente al corte con esta enzima. Por otra parte, el ADN sintetizado en las células eucariontes es sensible a *Mbo*I porque esta secuencia no constituye un blanco de la metilación en estas células.

Como resultado se observó un patrón similar al obtenido al tratar el ADN total de una planta infectada con TYLCV-[CU] (Figura 5). Además, las bandas (mayores) resultantes coincidieron con las tallas obtenidas del análisis *in silico* de la digestión con la enzima sobre la secuencia del TYLCV-[CU]. Para asegurar que la enzima no corta el ADN inoculado, se realizó el mismo tratamiento al plasmidio que contiene TYLCV-[CU] (pZTYL) utilizado para inocular las células. Ninguna señal de corte se obtuvo en este caso (Figura 5, carril 6). Estos resultados demuestran que el ADN detectado en las células no proviene del inóculo y por tanto, es producto de la replicación del virus en las células.

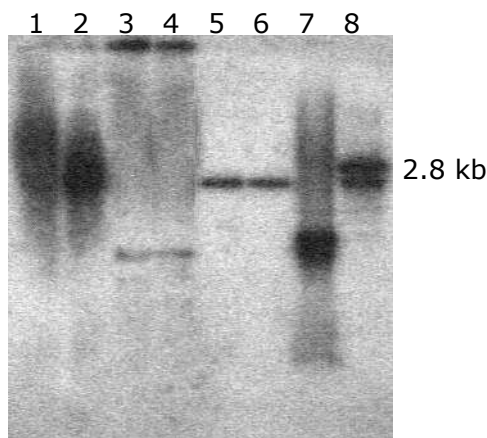


Figura 5. Autorradiografía del ensayo *Southern blot* para la detección de la replicación de TYLCV-[CU] en células de tabaco de la línea NT1. 1-4: ADN de células NT1 inoculadas con pZTYL; 1-2: ADN total de células NT1 inoculadas; 3-4: ADN total de células NT1 inoculadas, cortado con *Mbo*I; 5: ADN de pZTYL cortado con *Sac*I; 6: ADN de pZTYL cortado con *Sac*I y *Mbo*I; 7: ADN de planta enferma con TYLCV-[CU] cortado con *Mbo*I; 8: ADN de planta enferma con TYLCV-[CU] cortado con *Mung Bean*. Como sonda se utilizó el genoma de TYLCV-[CU].

4.1.1.1 Obtención de un dímero de TYLCV-[CU].

Un dímero de TYLCV-[CU] (dos copias de TYLCV-[CU] dispuestas en tandem en la misma construcción) puede asegurar el proceso de infección por este virus. Esto se explica porque el virus monomérico (disponible en la construcción pZTYL), una vez escindido, debe religarse antes de comenzar la replicación (Figura 6), mientras que el dímero mantiene una copia intacta del genoma viral capaz de replicarse. Por otro lado, desde el punto de vista práctico, el uso de un dímero como inóculo se puede diferenciar con facilidad de la doble cadena viral producto de la nueva síntesis en las células por la diferencia de tallas entre ambos, prescindiéndose así de experimentos adicionales. Teniendo en cuenta estas ventajas, para los experimentos posteriores de inoculación por bombardeo sobre las células NT1 y con el objetivo de obtener un inóculo de TYLCV-[CU] capaz de inducir su replicación

en las plantas de tomate mediante la agroinoculación, se desarrolló un dímero y se introdujo en el plasmidio pZP200 (Figura 6).

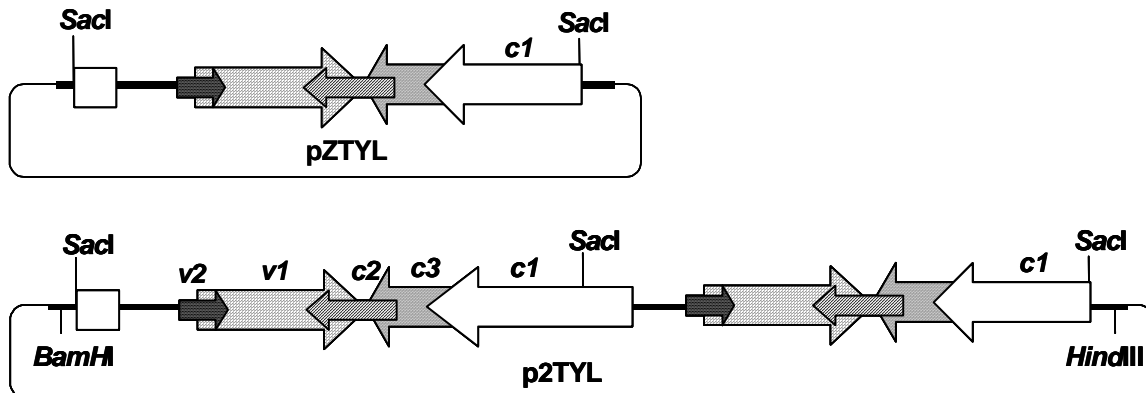


Figura 6. Representación esquemática de las construcciones pZTYL (6.2 kb) (contiene una copia de TYLCV-[CU]) y p2TYL (14.14 kb) (contiene dos copias de TYLCV-[CU]). El plasmidio p2TYL se construyó a partir de pZ2TYL (ver acápite 3.2.3.2); las copias del genoma de TYLCV-[CU] presentan igual ordenamiento de los genes que lo componen. Cada marco abierto de lectura (MAL) está representado con una flecha diferente. *v1* y *v2* representan los genes de la proteína de la cápside y de movimiento respectivamente; *c1*, *c2* y *c3* representan los genes de las proteínas replicasa, activador transcripcional y potenciador de la replicación respectivamente.

4.1.1.2 Demostración de la replicación de TYLCV-[CU] a partir de la construcción p2TYL (dímero de TYLCV-[CU]).

Para demostrar la replicación *in vivo* de TYLCV-[CU] a partir de la construcción p2TYL se realizó una agroinoculación de plantas de tomate variedad Campbell 28 con este plasmidio (Figura 7).

A los 25 días post-inoculación todas las plantas presentaban enrollamiento y amarillamiento de las hojas, síntomas característicos que provoca la infección por TYLCV (Figura 7B). Como control negativo se utilizaron plantas de tabaco que no son hospedantes de TYLCV, inoculadas bajo las mismas condiciones que las plantas de tomate. Ninguna de las plantas

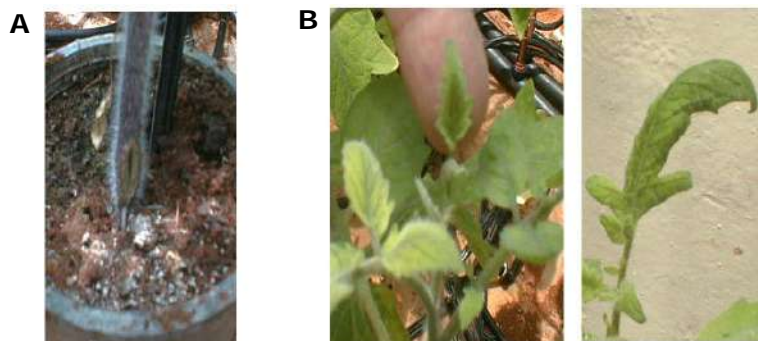


Figura 7. Fotografías que muestran el proceso de agroinoculación y síntomas asociados a la infección en plantas de tomate. **A:** Herida realizada en la parte inferior del tallo para la inoculación con *Agrobacterium*. **B:** Plantas de tomate agroinoculadas mostrando síntomas característicos de la infección por TYLCV.

de tabaco mostró síntomas de la enfermedad. Mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (del inglés "polymerase chain reaction", PCR) a partir del ADN total de estas plantas, utilizando oligonucleótidos degenerados para la detección de begomovirus (Rojas y col., 1993), se obtuvo en el caso de las plantas de tomate la banda de 1.4 Kb esperada, en contraste con los resultados observados a partir de las plantas de tabaco, donde no apareció

ninguna banda correspondiente a esta talla. Sin embargo, para verificar que la amplificación no fue a partir del p2TYL presente en *Agrobacterium tumefaciens* remanente en las plantas, se realizó un ensayo *Southern blot* con el ADN extraído de las plantas, utilizando como sonda el gen de la proteína de la cápside de TYLCV-[CU] (Figura 8).

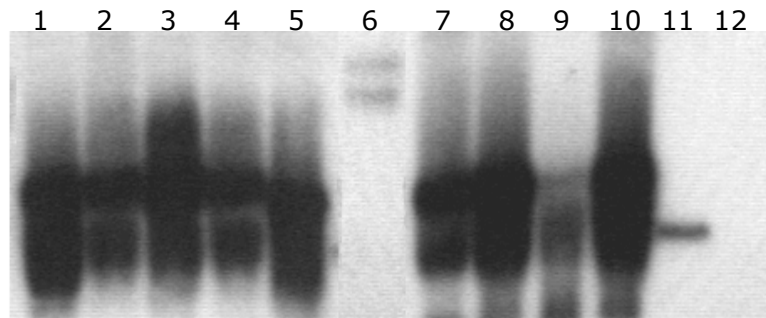


Figura 8. Autorradiografía del ensayo tipo *Southern blot* realizado a las plantas de tomate agroinoculadas. 1-5 y 7-10: plantas de tomate agroinoculadas; 6: p2TYL; 11: planta de tomate infectada con TYLCV-[CU] por mediación de la mosca blanca (*Bemisia tabaci*); 12: planta de tomate sana.

En los carriles pertenecientes a las plantas de tomate infectadas con el dímero de TYLCV se detectaron señales a una talla entre 2.8 kb y 1.6 kb aproximadamente, correspondientes con las conformaciones de dos cadenas y cadena sencilla viral, respectivamente (carriles 1-5 y 7-10, Figura 8). La señal correspondiente a la construcción p2TYL (carril 6, Figura 8) resultó diferente en la talla a la obtenida de las plantas agroinoculadas, como se esperaba. El mismo experimento realizado con las plantas de tabaco no mostró ninguna señal, corroborando los resultados obtenidos mediante la PCR. Con estos resultados se demostró la capacidad infectiva de la construcción p2TYL que contiene el dímero de TYLCV-[CU].

4.1.2 Desarrollo de construcción *c1*antisentido (pPZP*c1*antisentido).

Para el desarrollo de la construcción *c1*antisentido, el gen *c1* de TYLCV-[Cu] se obtuvo mediante PCR a partir de p2TYL. Los oligonucleótidos se diseñaron adicionando sitios de restricción convenientes en los extremos de la secuencia amplificada. El producto de la amplificación se ligó en el plasmidio pBPΩ8 (Coego y col., 1996). La construcción resultante (pBP*c1*antisentido) incluyó el segmento que contiene el promotor 35s, la secuencia de *c1* en antisentido y el terminador tNOS. Este segmento se ligó posteriormente al vector binario pPZP200 (Figura 9).

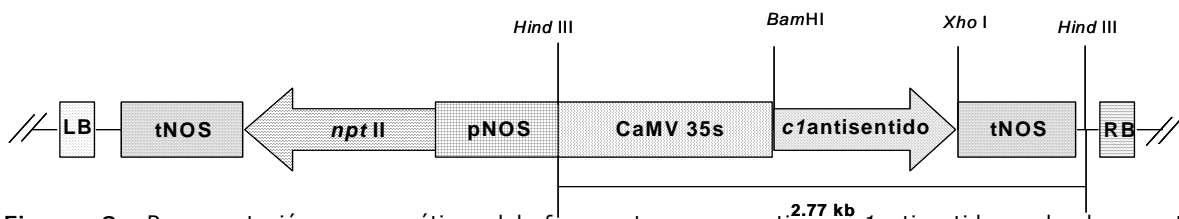


Figura 9. Representación esquemática del fragmento que contiene *c1*antisentido de la construcción pPZP*c1*antisentido. La secuencia *c1*antisentido está ligada al promotor 35s del *Cauliflower mosaic virus* (CaMV 35s) y al terminador de la nopalina sintetasa de *Agrobacterium* (tNOS). El resto del fragmento pertenece al plasmidio binario pPZP200. LB: borde izquierdo del ADN de transferencia (ADN-T); tNOS: terminador de la nopalina sintetasa; *nptII*: gen de la neomicina fosfotransferasa; RB: borde derecho del ADN-T.

4.1.3 Desarrollo de la construcción *hpc1* (pZP*c1*antisentidoI-2*c1*).

Para el desarrollo de la construcción *hpc1* se obtuvo la secuencia *c1* por PCR a partir de p2TYL. El fragmento obtenido se ligó en el vector pBP*c1*antisentido y se obtuvo pBP*c1*antisentido-*c1*. Después, el fragmento del intrón de la catalasa de frijol se ligó en el sitio de restricción *Cla*I de pBP*c1*antisentido-*c1* que se encuentra en la posición 348 del gen *c1*. De esta manera se obtuvo el plasmidio pBP*c1*antisentido-intron-*c1* que contiene 727 pares de nucleótidos hacia el extremo 3' de *c1*, en ambas direcciones. El fragmento enmarcado en los sitios de restricción *Hind*III se ligó en el plasmidio binario pZP200. De esta manera se obtuvo el pZP*c1*antisentidoI2*c1* (Figura 10).

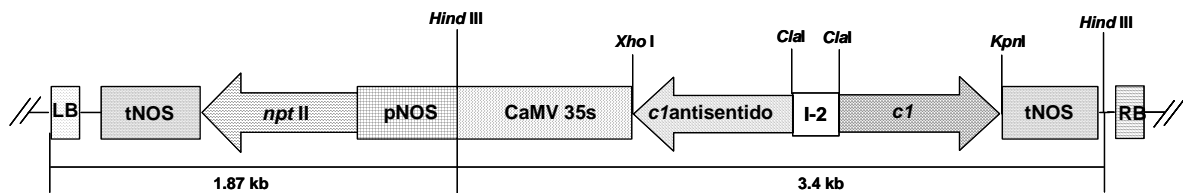


Figura 10. Representación esquemática del fragmento que origina la horquilla de ARN a partir de las secuencias invertidas repetidas de *c1* ligadas por un intrón (*c1*antisentido-I2-*c1*). Este fragmento está ligado al promotor de *Cauliflower mosaic virus* 35s y al terminador de la nopalina sintetasas (TNOS). El resto del vector pertenece al plasmidio binario pZP200. LB: borde izquierdo del ADN-T; *nptII*: gen de la neomicina fosfotransferasa; pNOS: promotor de la nopalina sintetasas; RB: borde derecho del ADN-T.

4.1.4 Obtención de líneas celulares de NT1 transgénicas que porten la construcción *c1*antisentido.

Una vez que se evidenció la capacidad de TYLCV-[CU] de replicarse en las células NT1 se procedió a la obtención de líneas celulares transgénicas que portasen la construcción *c1*antisentido.

Las células transformadas por bombardeo con la construcción *c1*antisentido se mantuvieron en medio de selección hasta su inoculación en medio líquido para el desarrollo de la suspensión celular. Al cabo de este tiempo se comprobó la incorporación del transgén en el genoma de las mismas a través de la PCR (resultado no documentado).

4.1.5 Inhibición de la replicación de TYLCV-[CU] en las células NT1 transgénicas.

Después de obtener suspensiones de cada línea celular transgénica, éstas se bombardearon con el vector p2TYL siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para la inoculación viral utilizando la pistola de genes. Como resultado las células NT1 que portan *c1*antisentido mostraron disminución de la acumulación de ADN viral (carriles 5-7, línea Ant 3 y 8-10, línea Ant 4; Figura 11) con respecto a las células no transgénicas (carriles 14 y 15, Figura 11), lo cual indica la inhibición de la replicación viral como consecuencia del transgén incorporado.

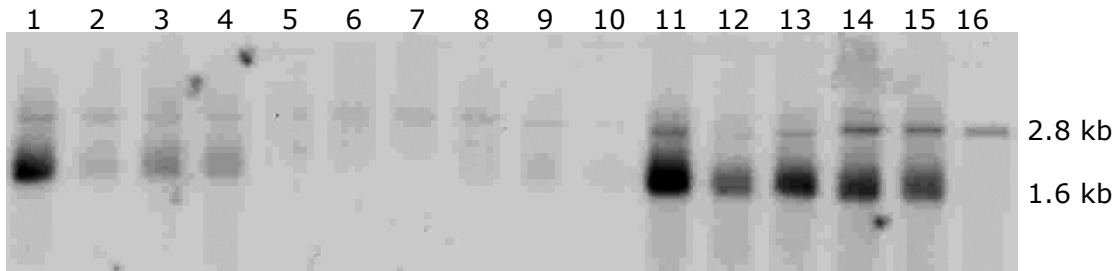


Figura 11. Autorradiografía del ensayo tipo *Southern blot* realizado a las líneas transgénicas NT1 inoculadas con pZTYL (se utilizó como sonda la secuencia de TYLCV-[CU]). Carriles 1-4: línea Ant2; 5-7: línea Ant3; 8-10: línea Ant4; 11-13: línea Ant5; 14 y 15: células no transgénicas; 16: pZTYL digerido con *SacI*.

4.1.5.1 Demostración del mecanismo de inhibición de la replicación de TYLCV-[CU] en las líneas de NT1 transgénicas.

Para demostrar que la inhibición de la replicación de TYLCV-[CU] en las células transgénicas de NT1 ocurrió por mediación del silenciamiento génico post-transcripcional del gen *c1*, procedimos a la detección de los ARNi correspondientes a la secuencia del gen *c1*. Como resultado del análisis de los ARN de alto peso no se detectaron los ARNm específicos para el gen *c1* en las líneas analizadas (Figura 12 A). Por otra parte el análisis de ARN de bajo peso

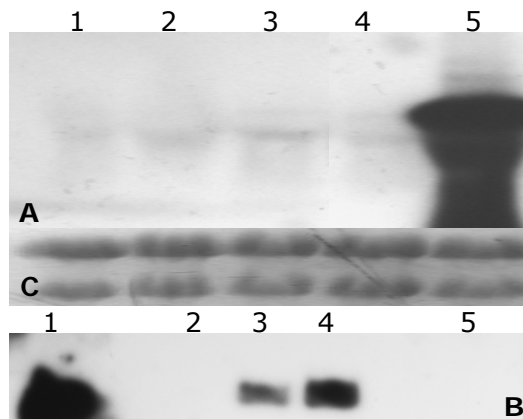


Figura 12. Autorradiografía del ensayo tipo *Northern blot* aplicado a las líneas transgénicas NT1 no inoculadas con TYLCV-[CU]. **A:** detección de los ARNm específicos de *c1* en las líneas transgénicas de NT1 que portan la construcción *c1*antisentido; 1: células no transgénicas; 2: línea Ant 2; 3: línea Ant 3; 4: línea Ant 4; 5: planta de tomate inoculada con TYLCV-[CU]. **B:** detección de los ARNi complementarios a *c1* en las líneas transgénicas NT1 que portan la construcción *c1*; 1: 50 ng de un oligonucleótido de 26 bases derivado de la secuencia de *c1*; 2: línea Ant 2; 3: línea Ant 3; 4: línea Ant 4; 5: células no transgénicas. Para ambas hibridaciones se utilizó como sonda el gen *c1*. **C:** ARNs totales aplicados en cada carril para la detección de ARNm.

demostró que en las líneas Ant 3 y Ant 4 ocurrió la formación de ARNi complementarios a la secuencia de *c1* (Figura 12 B). Este resultado demuestra la ocurrencia de la degradación de ARNm específico de *c1* en estas dos líneas por el mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional.

Podemos concluir que la construcción *c1*antisentido puede provocar el silenciamiento del gen *c1* por el mecanismo del silenciamiento génico post-transcripcional el cual, además, condujo a la inhibición de la replicación de TYLCV-[CU] en dos líneas portadoras del diseño antiviral.

4.2 Obtención de plantas de tomate transgénicas de la variedad Campbell 28 que porten las construcciones *c1antisentido* y *hpc1*. Caracterización biológica y molecular de estas plantas.

Considerando la efectividad de la construcción *c1antisentido* en la inhibición de TYLCV-[CU], demostrada anteriormente en células de tabaco, se desarrollaron plantas de tomate que portaran las construcciones *c1antisentido* y *hpc1* y se realizó su caracterización biológica. Para ello fue necesario establecer las condiciones de regeneración y transformación de la variedad Campbell 28.

4.2.1 Establecimiento de las condiciones de regeneración de la variedad de tomate Campbell 28.

Para el establecimiento de las condiciones de regeneración de tomate se escogió como explante la hoja cotiledonal cortada en los extremos. Como primera acción se evaluó la eficiencia de regeneración en diferentes concentraciones de las hormonas zeatina (Z) y ácido-indolacético (AIA) sobre medio MS (Murashige y Skoog, 1962), solidificado con Agar-Agar. Como se observa en la Tabla 1 la frecuencia mayor de explantes que regeneraron

Tabla 1. Relación de la eficiencia de regeneración y la combinación hormonal en medio con agar-agar. Número promedio de brotes a partir de cotiledones en medio de regeneración. El número de brotes por explante se muestra con el error estándar. Para cada combinación hormonal se sembraron 35 explantes.

(Z + AIA) mg/L	Número promedio de brotes/explante regenerado	Frecuencia de explantes regenerados (%)	Número promedio de brotes/explantes totales (eficiencia de regeneración)
0.5 + 0.2	1.76 ± 0.2	83.3	1.46 ± 0.19
0.5 + 0.5	2.13 ± 0.27	85.7	1.82 ± 0.27
0.5 + 1.0	2.15 ± 0.31	63.3	1.36 ± 0.43
0.5 + 2.0	1.00 ± 0.22	23.3	0.23 ± 0.13
0.5 + 4.0	0	0	0
1.0 + 0.2	2.12 ± 0.26	71.4	1.51 ± 0.12
1.0 + 0.5	1.07 ± 0.21	40.0	0.42 ± 0.13
1.0 + 1.0	1.18 ± 0.26	36.6	0.43 ± 0.15
1.0 + 2.0	1.75 ± 0.34	13.3	0.23 ± 0.14
1.0 + 4.0	2.50 ± 0.62	10.0	0.25 ± 0.25
2.0 + 0.2	1.50 ± 0.33	17.1	0.25 ± 0.14
2.0 + 0.5	1.50 ± 0.32	22.8	0.34 ± 0.18
2.0 + 1.0	0	0	0
2.0 + 2.0	1.00 ± 0.14	8.5	0.08 ± 0.08
2.0 + 4.0	0	0	0

brotes se obtuvo en las combinaciones 0.5 mg/L de zeatina con 0.2 - 0.5 mg/L de AIA. Para estas combinaciones el número de brotes por explante regenerado fue más alto que en el resto de las combinaciones. Como consecuencia la eficiencia de regeneración alcanzó el valor más alto (1.46 y 1.82 brotes/explante) en las combinaciones 0.5 mg/L de Z y 0.2-0.5 mg/L de AIA, y 1.51 brotes/explante en 1 mg/L de Z y 0.2 mg/L de AIA. Sin embargo, el tiempo transcurrido desde la siembra de los cotiledones hasta la aparición de los brotes fue más de 60 días.

En cambio, la regeneración en medio solidificado con Fitogel ocurrió en menor tiempo (20-25 días) en comparación a como ocurrió sobre Agar-Agar, lo que demostró la influencia del agente solidificante del medio sobre la morfogénesis. En medio solidificado con Fitogel la eficiencia de regeneración resultó ser mayor (2.75 brotes/explante) en la combinación de 0.5 mg/L de zeatina y 0.1 mg/L de AIA (Tabla 2). Esta combinación hormonal, en presencia de Fitogel como agente solidificante se utilizó para los posteriores experimentos.

Tabla 2. Relación de la eficiencia de regeneración y la combinación hormonal en medio de regeneración utilizando como soporte sólido Fitogel. El número de brotes por explante se muestra con el error estándar. Para cada combinación hormonal se sembraron 35 explantes.

Combinación hormonal (Zeatina + AIA) mg/L	Número promedio de brotes/explante regenerado	Frecuencia de explantes regenerados (%)	Número de brotes totales/explantes totales (eficiencia de regeneración)
0.1 + 0.1	2.00 ± 0.30	50.0	0.50 ± 0.38
0.1 + 0.2	2.16 ± 0.45	40.0	0.86 ± 0.30
0.1 + 0.5	1.20 ± 0.21	33.3	0.40 ± 0.14
0.2 + 0.1	2.00 ± 0.52	45.7	0.94 ± 0.18
0.2 + 0.2	1.85 ± 0.19	66.6	1.23 ± 0.28
0.2 + 0.5	1.72 ± 0.27	51.4	0.88 ± 0.17
0.5 + 0.1	2.75 ± 0.52	57.1	1.57 ± 0.39
0.5 + 0.2	2.12 ± 0.42	53.3	1.13 ± 0.36
0.5 + 0.5	1.75 ± 0.87	26.6	0.46 ± 0.16
1.0 + 0.1	1.47 ± 0.71	31.4	0.45 ± 0.25
1.0 + 0.2	1.35 ± 0.20	37.1	0.48 ± 0.33
1.0 + 0.5	1.23 ± 0.19	28.5	0.37 ± 0.32
1.0 + 1.0	1.00	6.6	0.06 ± 0.09
2.0 + 0.1	1.00	2.8	0.03 ± 0.07
2.0 + 0.2	1.00	6.6	0.06 ± 0.09
2.0 + 0.5	0	0	0
2.0 + 1.0	0	0	0
2.0 + 2.0	0	0	0

El siguiente paso para la optimización del medio de regeneración fue el ajuste de la concentración de la sacarosa como fuente de carbono. Para ello se cultivaron los explantes en presencia de sacarosa en diferentes concentraciones. Se demostró que la concentración óptima de sacarosa en las condiciones establecidas de regeneración es 20 g/L, en la cual coincidieron la mayor eficiencia de regeneración (1.75 brotes por explante), un mínimo desarrollo de callos y la mayor frecuencia de explantes que regeneraron (95%) (Tabla 3).

Tabla 3. Relación de la eficiencia de regeneración y la concentración de sacarosa en el medio de cultivo. Frecuencia de regeneración de brotes a partir de cotiledones en medio que contiene Zeatina 0.5 mg/L, AIA 0.1 mg/L, Fitogel 2 g/L y diferentes concentraciones de sacarosa. El número de brotes por explante se muestra con el error estándar. Para cada concentración de sacarosa se utilizó un tamaño de muestra de 35 explantes.

Concentración de sacarosa (g/L)	Número promedio de brotes/explante regenerado	Frecuencia de explantes regenerados (%)	Número promedio de brotes totales/explantes totales (eficiencia de regeneración)	Grado de formación de callos
60	0	0	0	+++
50	1.00 ± 0.21	6.6	0.06 ± 0.04	+++
40	1.50 ± 0.40	16	0.24 ± 0.11	++
30	1.50 ± 0.12	64	0.96 ± 0.14	++
20	1.84 ± 0.21	95	1.75 ± 0.17	+
10	1.42 ± 0.38	23.3	0.33 ± 0.22	+
5	1.00 ± 0.16	3.3	0.03 ± 0.03	+

+ significa escasa formación de callos; +++ significa abundante formación de callos.

4.2.2 Optimización de un protocolo de transformación para la variedad de tomate Campbell 28 mediante el uso del vector *Agrobacterium tumefaciens*.

Para desarrollar un protocolo de transformación genética de tomate se ajustó la concentración de *Agrobacterium* óptima para la cocultivación con los explantes, el tiempo de la cocultivación y la temperatura a la cual se realiza. Además, se analizó la influencia sobre la regeneración del antibiótico usado para la eliminación de *Agrobacterium* después del proceso de cocultivación.

4.2.2.1 Ajuste de la concentración óptima de *A. tumefaciens* y el tiempo de cocultivación para la transformación de los cotiledones.

La detección de la actividad reportera a través del ensayo GUS-histoquímico permitió en lo adelante la evaluación de diferentes condiciones de cocultivación de la bacteria con los explantes. (Figura 13). Estas condiciones incluyen la concentración de *Agrobacterium*

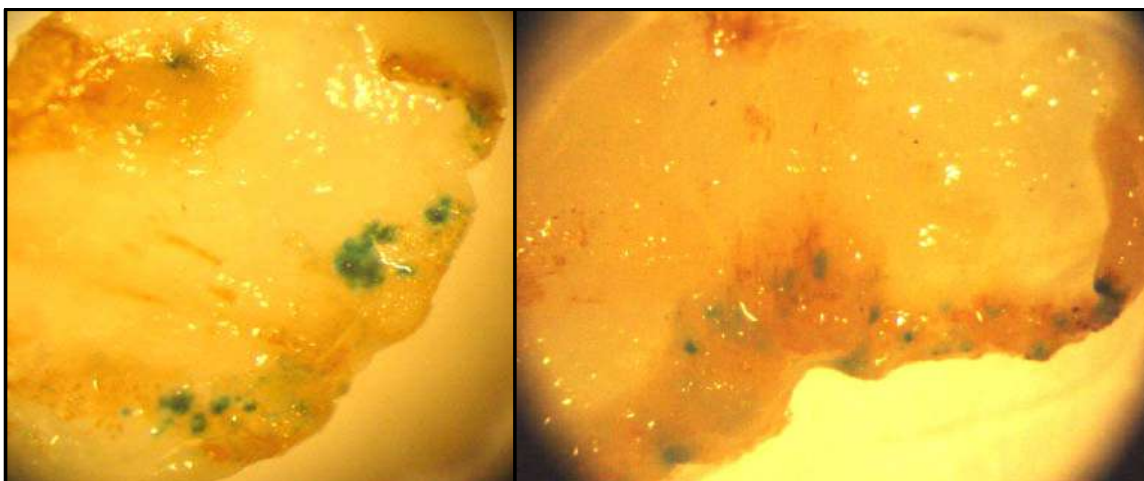


Figura 13. Fotografías de cotiledones que muestran la actividad de la β -glucuronidasa en color azul mediante el ensayo GUS-histoquímico. Los cotiledones se cocultivaron con *Agrobacterium* a una concentración correspondiente a 0.1 unidades de absorbancia medida a 620 nm.

tumefaciens y el tiempo de cocultivación. A la misma vez se analizó la influencia de un pretratamiento en la frecuencia de explantes transformados, y se ensayó la cocultivación a dos temperaturas.

Como resultado se evidenció que en el rango de concentraciones de 0.024-0.1 unidades de absorbancia el porcentaje de explantes con actividad GUS fue el más alto (>90%) que en el resto de las concentraciones de *Agrobacterium* ensayadas (Figura 14). Además, es notoria la disminución de la cantidad de explantes que mostró actividad reportera a medida que aumentó la concentración de la bacteria en la cocultivación.

En lo adelante para las transformaciones de los cotiledones la concentración de *A. tumefaciens* que se aplicó correspondió a 0.1 unidades de absorbancia.

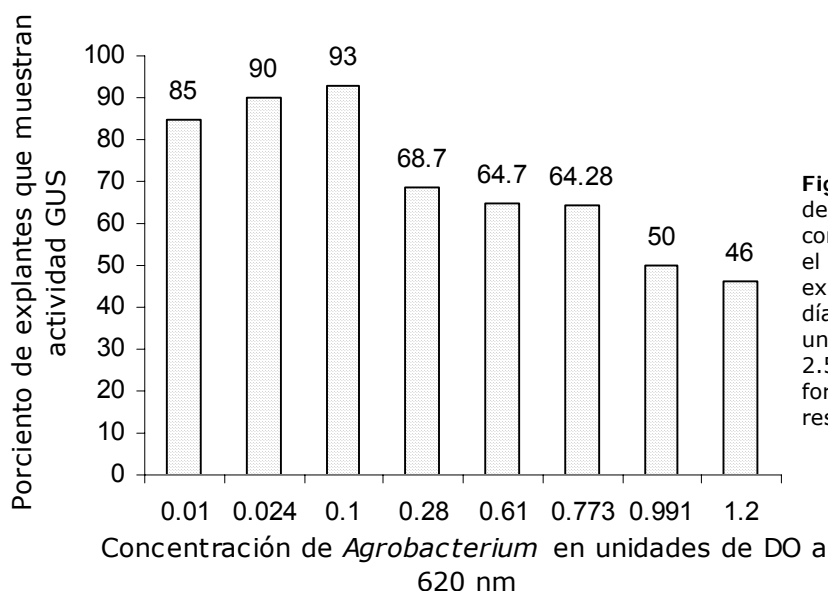


Figura 14. Representación gráfica de la relación entre la concentración de *Agrobacterium* y el porcentaje de explantes que expresan actividad GUS al cuarto día de cocultivo. 0.1 y 0.024 unidades de D.O. corresponden a 2.5×10^{11} y 5.25×10^8 unidades formadoras de colonias, respectivamente.

También, se analizó la frecuencia de explantes que mostraron actividad GUS efectuando previamente un pretratamiento sobre ellos (en este análisis se incluyeron también las hojas verdaderas de plantas propagadas *in vitro*). De esta manera, las hojas mostraron ser peores transformantes que los cotiledones, como se puede apreciar por la frecuencia de explantes que muestran actividad del gen reportero (60-90% vs 0-50%). Además, el pretratamiento no resultó potenciador de la transformación.

En condiciones sin pretratamiento la actividad de la β -glucuronidasa apareció al tercer día de la cocultivación, sin embargo, un mayor porcentaje (90%) de explantes muestra señales de transformación al cuarto día de la cocultivación (Tabla 4, A). Cuando se aplicó el

Tabla 4. Frecuencia de explantes con actividad reportera después de la cocultivación con *Agrobacterium* en condiciones sin pretratamiento y con pretratamiento (en explantes de hojas cotiledonales y verdaderas). **A:** en condiciones sin pretratamiento; **B:** en condiciones con pretratamiento.

A: Cantidad de explantes con actividad reportera / total de explantes infectados		Sin pretratamiento				
		Tiempo de cocultivación (días)				
Tipo de explante	Concentración de <i>Agrobacterium</i> , unidades de D.O.	2	3	4	5	6
cotiledones	0.1	0	6/10	9/10	8/10	10/10
hojas	0.1	0	0	5/10	3/10	3/10

B: Cantidad de explantes con actividad reportera / total de explantes infectados		Con pretratamiento				
		(Zeatina + AIA durante 2 días)				
		Tiempo de cocultivación (días)				
Tipo de explante	Concentración de <i>Agrobacterium</i> , unidades de D.O.	2	3	4	5	6
cotiledones	0.1	0	1/10	6/10	5/10	4/10
hojas	0.1	0	0	1/10	3/10	1/10

pretratamiento la frecuencia de explantes transformados disminuyó hasta un 60% al cuarto día de cocultivación (Tabla 4, B).

Al aplicar el pretratamiento a diferentes tiempos se evaluó también la eficiencia de transformación resultante en medio de selección con kanamicina (100 mg/L). Se observó la disminución del recobrado de brotes capaces de enraizar en kanamicina (50 mg/L) (de 9.3 a 3.6) después del pretratamiento, aunque aumentó dos veces la cantidad de brotes obtenidos en medio selectivo (de 21.7 a 53.3, Tabla 5).

Tabla 5. Efecto del pretratamiento sobre el recobrado de plantas transgénicas en medio de selección.

Tiempo de pretratamiento	Brotos resistentes a kanamicina	Brotos enraizados en kanamicina	# de plantas que muestran actividad reportera
0 día	21.7 ± 3.5	9.3 ± 1.1	3.5
1 día	51 ± 7.3	3.6 ± 1.1	0
2 días	53.3 ± 10.9	4 ± 0.6	0

4.2.2.1.1 Selección de una temperatura para la cocultivación con *Agrobacterium tumefaciens*.

En los ensayos anteriores la temperatura para la cocultivación de los explantes con *A. tumefaciens* se fijó a 25 °C (temperatura promedio en el ambiente del laboratorio). A esta temperatura el porcentaje de explantes que mostró actividad del gen reportero es 93%. Sin embargo, en experimentos para obtener plantas transgénicas, la eficiencia de regeneración en los explantes infectados disminuyó a 0 con relación a los explantes sin infectar con la bacteria. Por este hecho se realizó una comparación de la influencia de la cocultivación a 25 y 20 °C sobre la regeneración de los explantes. Como resultado se evidenció que los explantes después de someterse a la cocultivación a 25 °C presentaban un color oscuro en la zona de morfogénesis (Figura15, B), y no fue posible obtener brotes transgénicos. La cocultivación a 20°C no produjo oscurecimiento en los explantes cortados (Figura15 A), y se

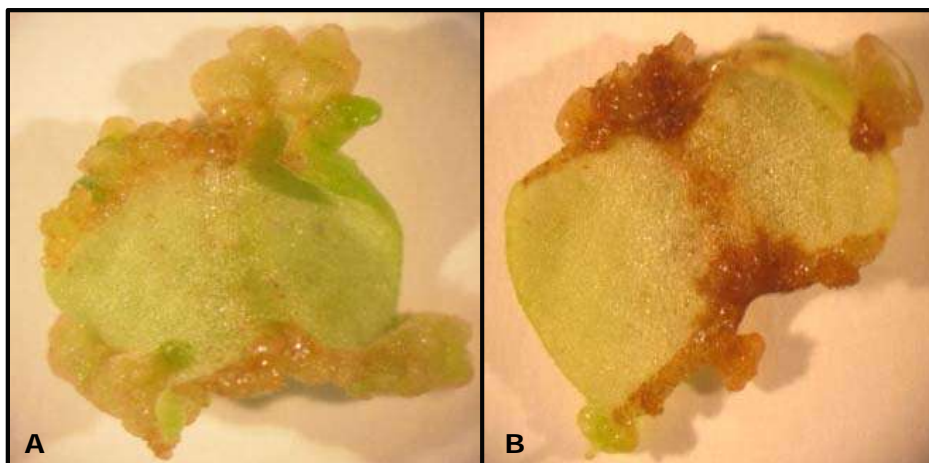


Figura15. Fotografías que muestran el efecto de la temperatura de cocultivación en la oxidación de los explantes. **A:** Cotiledon cocultivado con *Agrobacterium* a 20°C y puesto a regenerar a 23°C. **B:** Cotiledon cocultivado con *A. tumefaciens* a 25°C y puestos a regenerar a 23°C.

logró un mayor grado de morfogénesis obteniéndose como promedio un brote por cada dos o tres explantes. En lo adelante las infecciones con *Agrobacterium* se realizaron a esta temperatura.

4.2.2.2 Determinación del antibiótico a utilizar para la eliminación de *A. tumefaciens* durante la selección de las células transformadas del cotiledón.

Una vez que los explantes se transformaron es necesaria la eliminación de *Agrobacterium* para favorecer el proceso de morfogénesis. Para ello se han descrito diferentes antibióticos, por lo que el siguiente objetivo consistió en la determinación del grado de afectación de la regeneración de la variedad Campbell 28 en presencia de éstos, y seleccionar el más conveniente. Se realizó un ensayo de regeneración en las condiciones optimizadas anteriormente, en presencia de los antibióticos claforan (500 mg/L) y carbenicillina (500 mg/L). Se evaluó en estas condiciones la eficiencia de regeneración y el porcentaje de explantes que regeneraron. Como resultado, se evidenció una disminución de tres veces en la eficiencia de regeneración en medio con claforan, mientras que en el medio que contenía carbenicillina la regeneración no resultó diferente al control sin antibióticos. Igualmente, el porcentaje de cotiledones que regeneró fue tres veces inferior en presencia de claforan en comparación con la variante de carbenicillina (Figura 16, A y B). Teniendo en cuenta estos

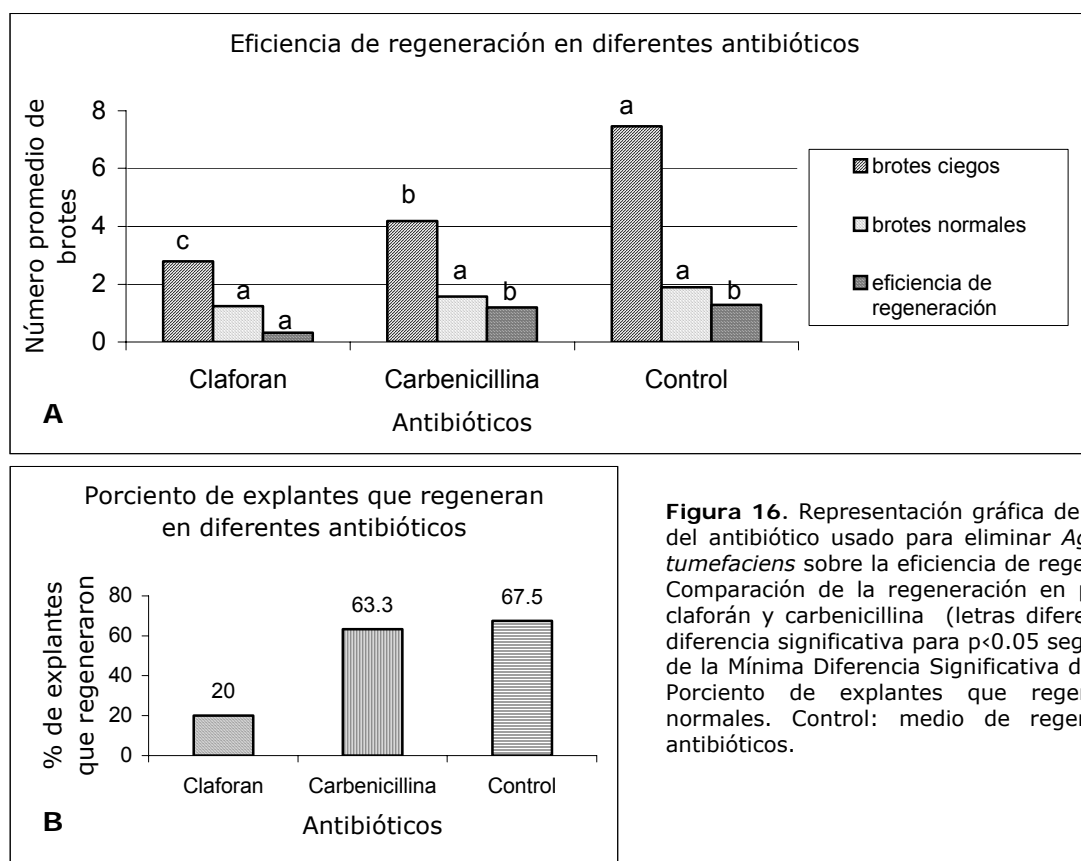


Figura 16. Representación gráfica de la influencia del antibiótico usado para eliminar *Agrobacterium tumefaciens* sobre la eficiencia de regeneración. **A:** Comparación de la regeneración en presencia de claforan y carbenicillina (letras diferentes indican diferencia significativa para $p < 0.05$ según la Prueba de la Mínima Diferencia Significativa de Fisher). **B:** Porcentaje de explantes que regeneró brotes normales. Control: medio de regeneración sin antibióticos.

resultados en los siguientes experimentos de transformación se empleó la carbenicilina para eliminar *A. tumefaciens*.

4.2.3 Obtención de plantas transgénicas de la variedad Campbell 28 que contienen las construcciones *c1antisentido* y *hpc1* mediante el uso de la kanamicina como agente de selección. Análisis de la eficiencia de transformación de la variedad Campbell 28.

En las condiciones optimizadas para la transgénesis de tomate variedad Campbell 28 se desarrollaron plantas transformadas con las construcciones *c1antisentido* y *hpc1* (Tabla 6).

Tabla 6. Representación de los clones transgénicos de tomate seleccionados en condiciones de parcela experimental CIGB. Confirmación de la naturaleza transgénica de los clones de tomate seleccionados para la inoculación de TYLCV. Aproximación preliminar al número de copias del transgén. R: generación.

Clon #	Diseño antiviral	Progenie #, R	Cantidad de germinados enraizados en kanamicina	Cantidad de germinados no enraizados en kanamicina	Proporción obtenida entre germinados enraizados y no enraizados	Aproximación al número de copias del transgen (estadístico χ^2 ; p=0.05)
1.1	<i>c1antisentido</i>	R2	20	9	2.2 : 1	
4.2	<i>c1antisentido</i>	R2	42	15	2.8 : 1	
12	<i>c1antisentido</i>	R1	77	6	12.8 : 1	
15	<i>c1antisentido</i>	R1	81	10	8.1 : 1	
40	<i>c1antisentido</i>	R1	57	11	5.2 : 1	
91.4	<i>hpc1</i>	R2	74	10	7.4 : 1	
99.2	<i>hpc1</i>	R2	64	4	16 : 1	
100	<i>hpc1</i>	R2	46	5	9.2 : 1	
109	<i>hpc1</i>	R1	85	11	7.7 : 1	
126	<i>hpc1</i>	R1	78	27	2.9 : 1	=1

Para los clones 12, 15, 40, 109 y 126 se obtuvo la primera generación (R1), mientras que para 1.1, 4.2, 91.4, 99.2 y 100 se logró obtener hasta la segunda generación (R2). Se realizó el enraizamiento de los germinados pertenecientes a R1 y R2 de los clones correspondientes en medio con 25 mg/L de kanamicina para la confirmación del estado transgénico, y se estableció la proporción entre resistentes y no resistentes. Esta proporción se tuvo en consideración para una aproximación al número de copias del transgén presente en el genoma de los clones mediante la aplicación del estadístico χ^2 (Tabla 6). Esta aproximación reflejó que en el caso del clon 126 se podría afirmar la existencia de una única copia del transgén.

También se determinó la eficiencia de transformación a partir de los datos aportados por 8 experimentos (Tabla 7). Resultó como promedio una eficiencia de transformación de 2.68% por experimento, si se tiene en cuenta el total de brotes obtenidos por cada experimento. Si se consideran solamente los brotes normales, la eficiencia de transformación es 14.37%. Se obtuvo además, que el 85.5 % de los explantes infectados con *A. tumefaciens* mostró actividad transgénica mediante la formación de callos en medio selectivo.

Tabla 7. Caracterización de la eficiencia de transformación de la variedad Campbell 28 en presencia de kanamicina, aplicando condiciones optimizadas previamente.

Experimento #	Cantidad de explantes infectados	Cantidad de explantes con callos	Cantidad de brotes anormales	Cantidad de brotes normales	Cantidad de brotes enraizados
1	225	155	31	3	-
2	168	132	29	3	3
3	282	280	67	27	3
4	399	379	89	8	4
5	246	152	46	17	1
6	257	213	74	17	1
7	280	257	131	27	3
8	233	219	90	26	4
Promedio	261.25	223.37	69.63	16	2.3
Eficiencia-Frecuencia (%)	-	85.50	-	18.68	2.68
					14.37

4.2.4 Caracterización biológica y molecular de las plantas transgénicas de tomate resistentes a kanamicina que portan las construcciones *c1antisentido* y *hpc1*.

Una vez que se evidenciaron los clones asintomáticos en condiciones naturales (Tabla 6) se colectaron las semillas a partir de éstos y se seleccionaron solamente los germinados resistentes a kanamicina para los ensayos biológicos y la caracterización molecular.

El análisis de la susceptibilidad a TYLCV de las plantas inoculadas con mosca blanca se realizó a través de un ensayo ELISA comercial para la cuantificación de la carga viral y un ensayo tipo *dot blot* para la confirmación de la replicación del genoma de TYLCV-[CU]. Para la evaluación de los clones transgénicos se utilizaron como controles plantas de variedades tolerantes y resistentes.

La caracterización molecular se realizó a los clones transgénicos a través de los ensayos tipo *Southern* y *Northen blot*. El *Southern blot* se empleó para la determinación del número de copias del transgén en el genoma de las plantas; y el *Northen* para la determinación del mecanismo de resistencia de las plantas promisorias.

4.2.4.1 Análisis de la inhibición de la multiplicación de TYLCV-[Cu] en plantas transgénicas de tomate variedad Campbell 28.

Se realizaron tres experimentos de inoculación de TYLCV-[CU] en la primera etapa. En el primero se expusieron a la mosca los clones que portan la construcción *c1antisentido*, en el segundo los clones que portan *hpc1* y en el tercero los de ambas construcciones. Los dos primeros experimentos se evaluaron a los 15 días del inicio de la inoculación mientras que el tercero a los 30 días.

En el caso de los clones *c1antisentido* todas las plantas mostraron altos valores de absorbancia como resultado del ensayo ELISA, significativamente diferentes con respecto al control no infectado. Aunque entre ellos también hubo clones de menor grado de infección,

como por ejemplo el 1.1 y el 4.2 (Figura 17 A). El porcentaje de plantas infectadas fue alto y prácticamente fue mayor al 80% en todos los casos, alcanzando el máximo en las plantas no transgénicas (Figura 17 C).

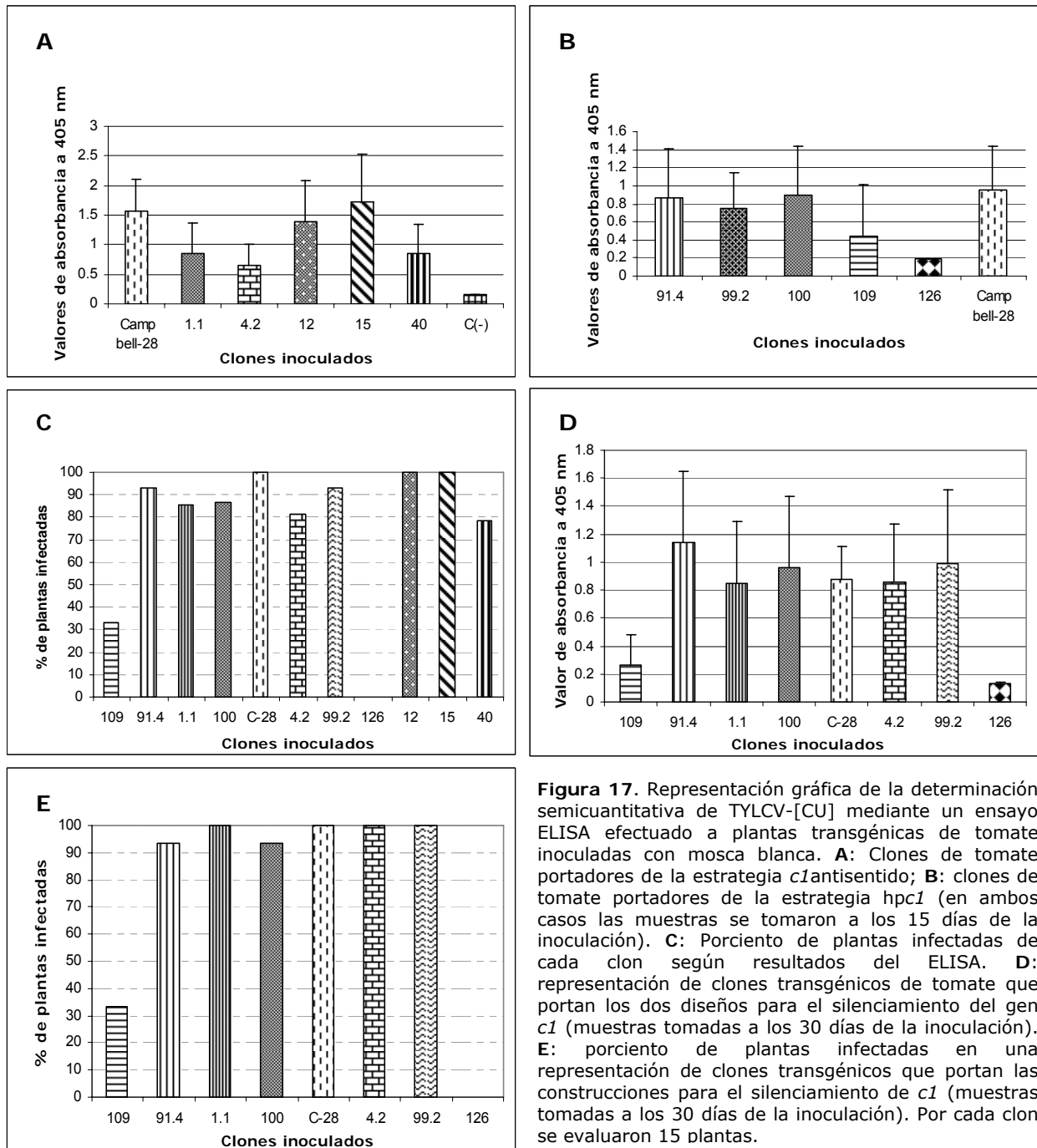


Figura 17. Representación gráfica de la determinación semicuantitativa de TYLCV-[CU] mediante un ensayo ELISA efectuado a plantas transgénicas de tomate inoculadas con mosca blanca. **A:** Clones de tomate portadores de la estrategia *c1*antisense; **B:** clones de tomate portadores de la estrategia *hpc1* (en ambos casos las muestras se tomaron a los 15 días de la inoculación). **C:** Porcentaje de plantas infectadas de cada clon según resultados del ELISA. **D:** representación de clones transgénicos de tomate que portan los dos diseños para el silenciamiento del gen *c1* (muestras tomadas a los 30 días de la inoculación). **E:** porcentaje de plantas infectadas en una representación de clones transgénicos que portan las construcciones para el silenciamiento de *c1* (muestras tomadas a los 30 días de la inoculación). Por cada clon se evaluaron 15 plantas.

Por otro lado, los clones 109 y 126 (portadores de *hpc1*) mostraron un valor de absorbancia significativamente menor que el resto de los transgénicos (Figura 17, B y D), destacándose el 126 con un valor similar al control no inoculado. Igualmente el porcentaje de plantas sin

infectar es menor para el clon 109 alcanzando un 60%, mientras que en el 126 todas las plantas permanecieron sin infección (Figura 17 C).

En la evaluación realizada para el tercer experimento, a los 30 días de la inoculación, todos los clones mostraron iguales niveles de absorbancia que el control no transgénico inoculado (Figura 17 D) excepto el 109 y 126. Estos dos clones se destacaron por un nivel significativamente inferior de absorbancia con relación al resto de los clones analizados. Particularmente el 126 no mostró acumulación de TYLCV.

4.2.4.2 Demostración de la resistencia frente a TYLCV-[CU] de los clones transgénicos de tomate.

Teniendo en cuenta los resultados de los experimentos anteriores se procedió al análisis de la resistencia de los clones transgénicos en condiciones de extrema infección. A diferencia del experimento de inoculación anterior en este caso las plantas eran más jóvenes y la cantidad de moscas por plantas fue considerablemente mayor (alrededor de 300 individuos por planta).

Después de 15 días todos los clones mostraron altos niveles de infección, excepto el 126 que permaneció al mismo nivel del control no inoculado (Figura 18 A). El clon 109 se comportó diferente significativamente del control no transgénico aunque alcanzó una absorbancia de 1.2 (Figura 18 A). El porcentaje de plantas infectadas alcanzó el máximo para la mayoría de los clones con excepción del 109 y 126 con valores de 50% y 0% respectivamente (Figura 18 B).

A los 30 días de la inoculación las plantas mostraron síntomas de senescencia debido a la acción del patógeno viral y también por la actividad de la creciente población de mosca blanca. Por ello el muestreo se realizó solamente a los clones 109 y 126. En este caso los valores de absorbancia alcanzaron la mitad de los valores obtenidos a los 15 días de inoculación en el caso del control no transgénico. Para el clon 109 se observó también una reducción de la absorbancia hasta 0.5, mientras que el 126 mantuvo su similitud a las plantas no inoculadas (Figura 18 C).

En otro sentido, el porcentaje de plantas infectadas aumentó en el clon 109 hasta 67% al mismo tiempo que ninguna de las plantas pertenecientes al clon 126 mostró valores de infección (Figura 18 D).

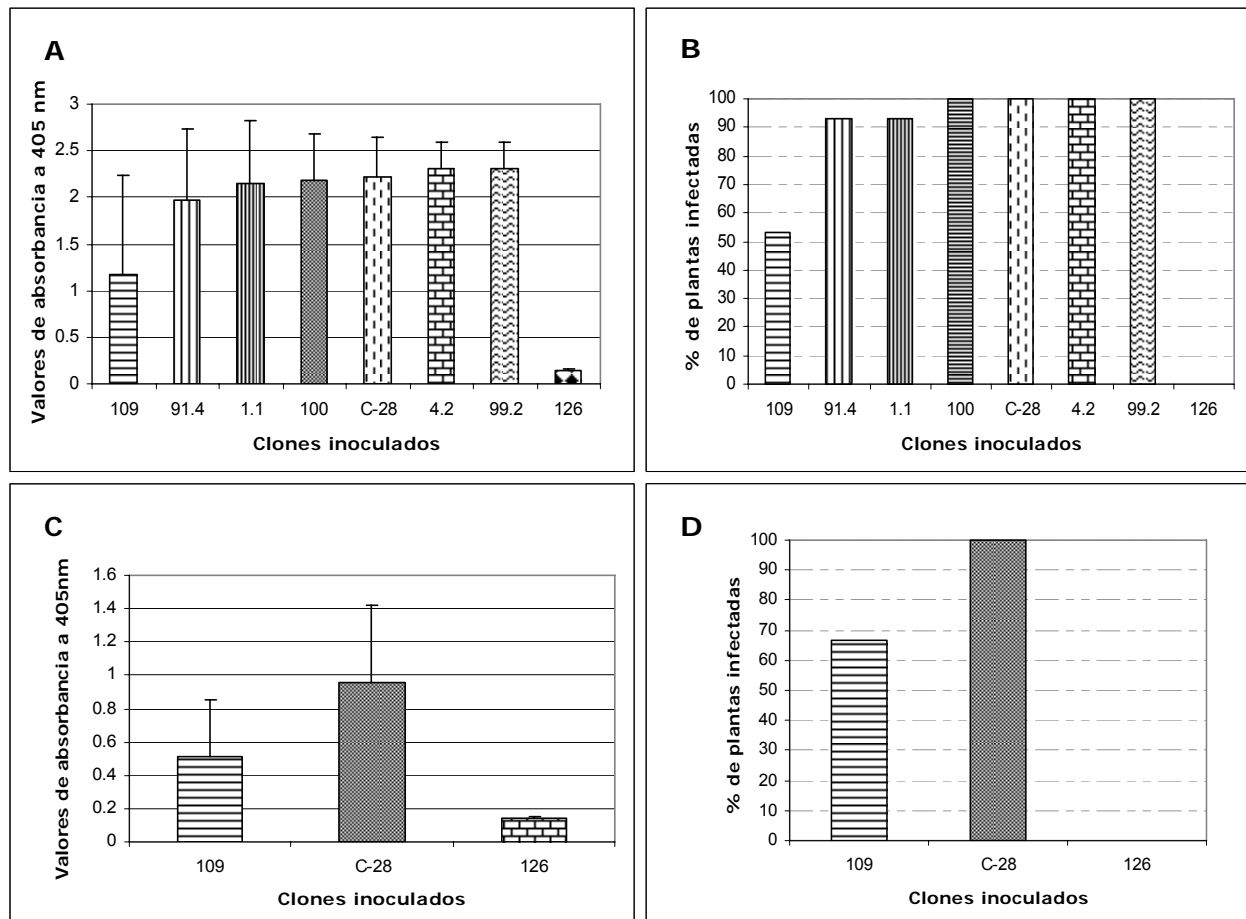


Figura 18. Representación gráfica de la determinación semicuantitativa de TYLCV-[CU] en plantas transgénicas de tomate mediante ELISA en condiciones extremas de inoculación: las plantas inoculadas portaron 2-4 hojas verdaderas; se inocularon con 300 moscas por planta. Muestras tomadas a los 15 días de la inoculación- **A**: semicuantificación de TYLCV-[CU] en clones transgénicos de tomate; **B**: porcentaje de plantas infectadas con TYLCV-[CU]. Muestras tomadas a los 30 días de la inoculación- **C**: semicuantificación de TYLCV-[CU] en los clones 109 y 126; **D**: porcentaje de plantas infectadas con TYLCV-[CU] de los clones 109 y 126. Por cada clon se evaluaron 15 plantas.

Teniendo en cuenta que las plantas del clon 126 no mostraron síntomas ni tampoco cantidades de TYLCV detectables por el ensayo ELISA se determinó la acumulación del genoma viral en estas plantas. Para ello se realizó un ensayo *dot blot* sobre los ADN totales obtenidos de cada planta inoculada. Este análisis demostró que ninguna de las plantas del clon 126 acumuló réplicas detectables del genoma viral (Figura 19). En el mismo ensayo, en las muestras derivadas del clon 109 se detectaron cantidades de ADN de TYLCV-[CU] en el rango de 0 a 10 ng (Figura 19), mientras que el control no transgénico acumuló de 1 a 10 ng del genoma viral.

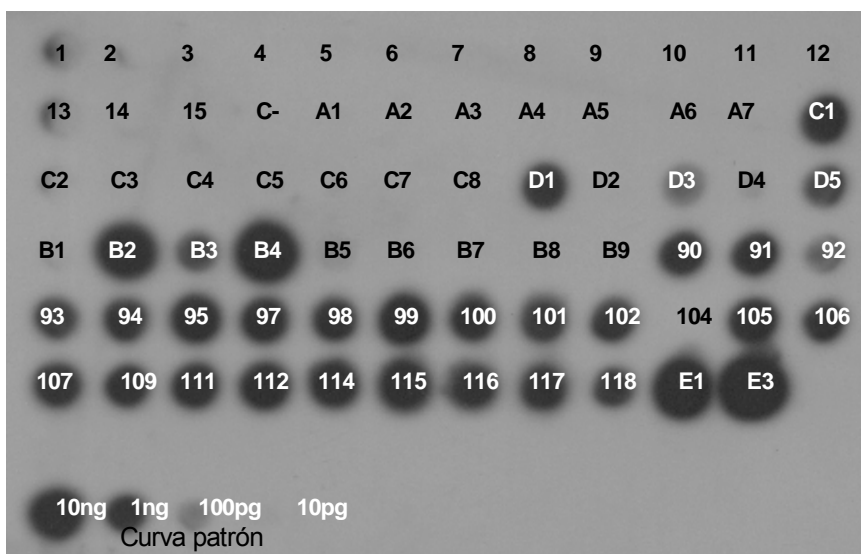


Figura 19. Autorradiografía de la detección y cuantificación de la presencia del genoma de TYLCV-[CU] en las plantas de los clones transgénicos 126 y 109 mediante el ensayo *dot blot*. Se hibridó el ADN total de cada planta con una sonda que contiene la región intergénica de TYLCV-[CU]. Muestras tomadas a los 30 días de infestación. 1-15: clon 126; A1-A7: clon 126; C1-C8: clon 126; D1-D5: clon 109; B1-B9: clon 109 (A1-B9; E1, E3: se cultivaron en condiciones de parcela experimental a cielo abierto); 90-118: clon 109; E1, E3: plantas de Campbell 28 no transgénicas. En la membrana se aplicó cantidades conocidas del genoma de TYLCV-[CU] para conformar una curva de calibración. C-: planta no transgénica sin inocular.

4.2.4.3 Demostración de la resistencia contra TYLCV-[CU] del clon transgénico 126 en comparación con variedades tolerantes y resistentes obtenidas por mejoramiento tradicional.

Con el objetivo de caracterizar la actividad antiviral del clon 126 con relación a variedades descritas como tolerantes y resistentes se realizó una inoculación con TYLCV-[CU] a las variedades MP1, Vyta e híbrido HA3108 en conjunto con el clon 126. El ensayo ELISA (Figura 20 A) efectuado a los 15 días reflejó una acumulación viral promedio significativamente menor que la plantas de Campbell 28 susceptibles a TYLCV-[CU] en condiciones extremas, aunque el nivel alcanzado como promedio duplicó el valor de las plantas sin inocular. También, la cantidad de plantas infectadas sobrepasó el 60 % (Figura 20 B).

El comportamiento del clon 126 confirmó su inmunidad frente a TYLCV-[CU] tanto por los valores del ensayo ELISA, iguales al de las plantas no inoculadas, como por la carencia de la señal en el análisis por hibridación *dot blot*. En el caso de las variedades tolerantes, todas mostraron en la autorradiografía cantidades de genoma viral en el rango de 100 pg-10 ng (Figura 21).

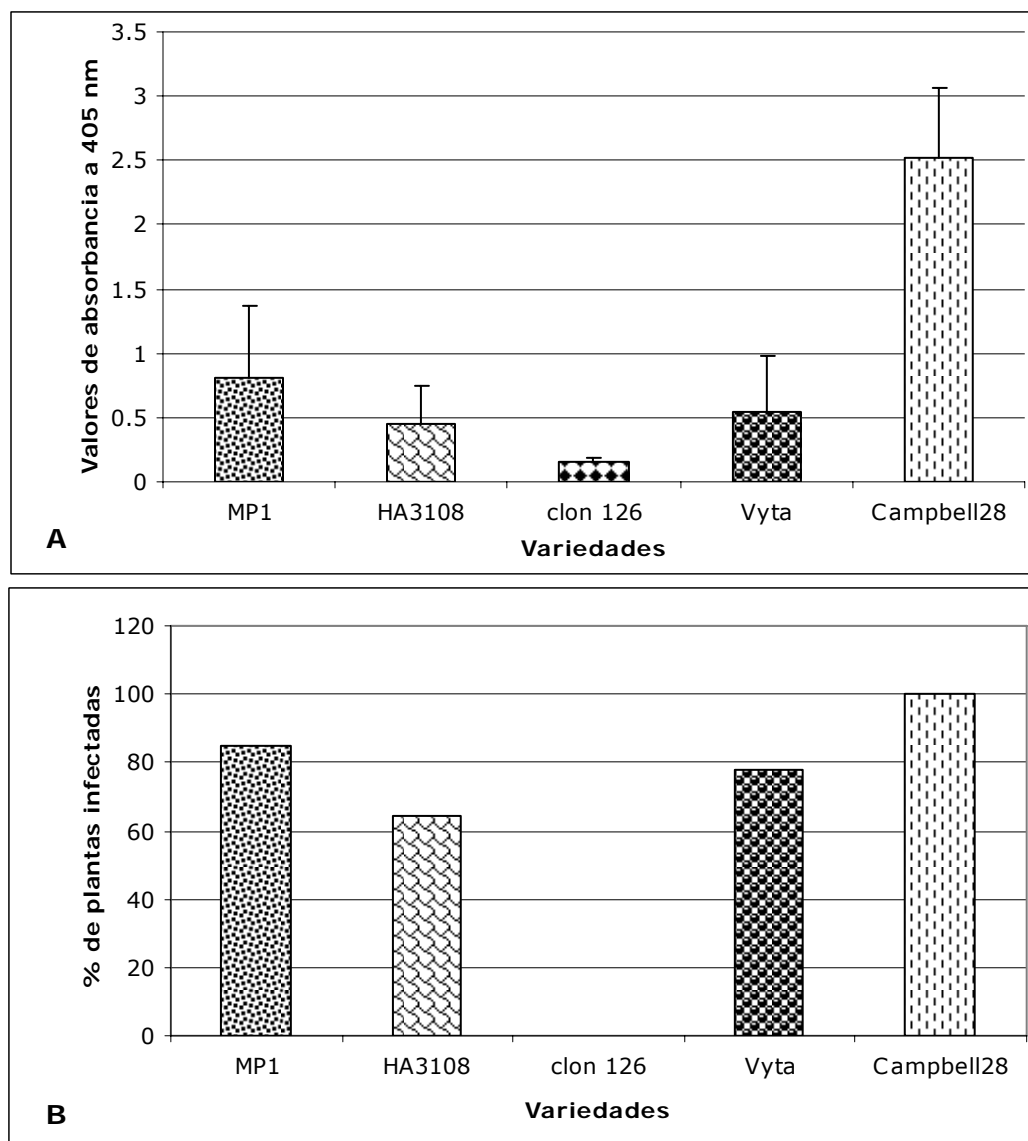


Figura 20. Representación gráfica de la semicuantificación de TYLCV-[CU] en variedades de tomate inoculadas con mosca blanca en comparación con el clon transgénico 126. Muestreo a los 15 días de la inoculación. **A:** Semicuantificación de TYLCV-[CU] en variedades tolerantes y resistentes inoculadas con TYLCV-[CU]; **B:** porcentaje de plantas enfermas de las variedades tolerantes y el clon transgénico 126. Para cada variedad se evaluaron 15 plantas.

4.2.4.4 Análisis de la integración de las construcciones *c1antisentido* y *hpc1* en el genoma de las plantas transgénicas de tomate.

Como parte de la caracterización de los clones transgénicos se analizó la integración en ellos de las construcciones *c1antisentido* y *hpc1* mediante el ensayo *Southern blot*. La hibridación se realizó sobre los ADN genómicos de cada clon, cortados previamente con la enzima *HindIII*; como sonda se utilizaron los genes *nptII* y *c1*.

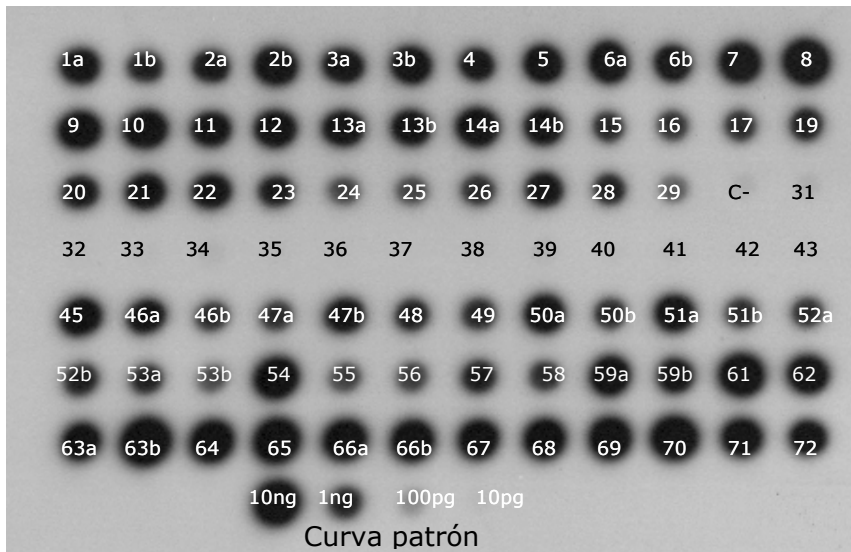


Figura 21. Autorradiografía del ensayo *dot blot* de las muestras de ADN obtenidas de las plantas de tomate inoculadas con TYLCV-[CU]. Muestras tomadas a los 15 días del inicio de la inoculación. 1-14: plantas de la variedad MP1; 15-29: plantas de HA3108; 31-43: plantas del clon 126; 45-58: plantas de Vyta; 59-72: plantas de Campbell 28. Curva patrón: diferentes cantidades correspondientes al genoma viral. Sonda utilizada -región intergénica de TYLCV-[CU]. C-: planta de tomate no inoculada.

El análisis de las autorradiografías obtenidas en la hibridación con el gen *nptII* refleja que el clon 126 contiene una sola copia del casete génico que contiene *nptII* y que aparece a la altura correspondiente a la talla de 3 kb. También el clon 100 muestra un patrón de integración sencillo con una señal a una altura mayor que 10 kb, mientras que el resto de los clones reflejan un patrón de inserción más complejo (Figura 22 A). Por ejemplo, para el clon 109 se identificaron con mayor acentuación tres señales correspondientes a los tamaños 2.5, 4 y 10 kb. Las otras cuatro señales pueden ser producto de una digestión parcial del ADN genómico por ser de menor intensidad. En el caso de los demás clones se observan dos copias para el 91.4 a la altura de 4 y 10 kb; para el 99.2 están acentuadas 2 señales a la altura de 3.5 y 10 kb correspondientes a dos copias del gen *nptII*. El clon 1.1 se identifica con dos copias a la altura de 3.5 y 10 kb mientras que para el clon 4.2 se observa una banda reforzada a la altura de 10 kb.

La hibridación sobre la misma membrana utilizando como sonda el gen *c1* mostró un patrón diferente. El patrón observado confirmó que todos los clones excepto el 100 contienen integrado en el genoma el gen *c1* (Figura 22 B) por la señal correspondiente al casete portador de *c1* a la altura esperada (3.4 kb y 2.7kb). Diferente se muestra el ADN del clon 4.2 que refleja una señal a la altura de 1.6 kb. Resalta, a partir del patrón de bandas correspondiente a los ADNs de los clones 126, 100, 99.2 109, 91.4, 4.2 y 1.1 que la digestión realizada con la enzima *HindIII* resultó ser parcial, aunque este hecho no imposibilitó la determinación del número de copias para los clones 126, 100 y 99.2.

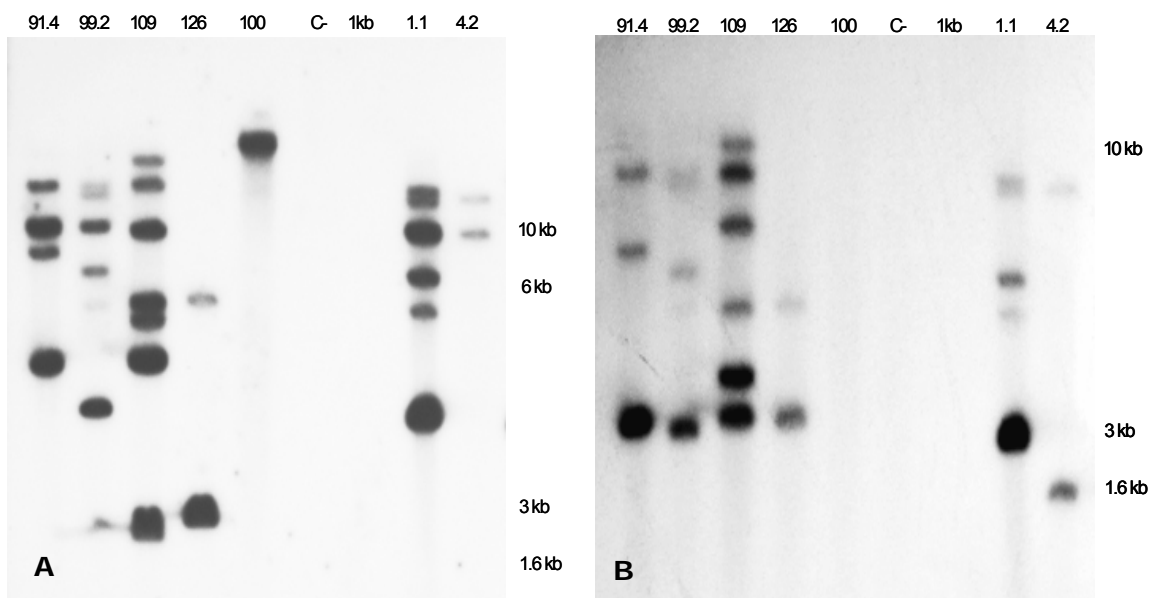


Figura 22. Autorradiografías del ensayo *Southern blot* para el análisis del patrón de integración de los transgénos en los clones de tomate. Los ADN totales se digirieron con *HindIII*, y se transfirieron a la membrana de nylon Hybond N+ (Amersham Corp., Inglaterra) después de la corrida electroforética en un gel de agarosa al 0.8 %. **A:** hibridación utilizando como sonda el gen *nptII*; **B:** hibridación utilizando como sonda el gen *c1*. C-: planta no transgénica. 1 kb: marcador de peso molecular 1 kb Ladder, Gibco BRL, EEUU.

4.2.4.5 Demostración del mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional en las plantas resistentes a TYLCV-[CU].

Con el objetivo de confirmar el mecanismo mediante el cual los clones 109 y 126 muestran resistencia, y particularmente la inmunidad del 126, se realizó el análisis de ARN de plantas sanas correspondientes a estos clones mediante el ensayo *Northern blot*. Para ello el ARN total se fraccionó en ARN de alto peso y bajo peso molecular (ver acápite 3.2.2.4-3.2.2.6). La fracción de ARN de bajo peso se separó electroforéticamente en condiciones desnaturalizantes. De ahí se transfirió a una membrana y se hibridó con el gen *c1*. Con esta técnica se confirmó la presencia de ARNi en los clones 109 y 126 (Figura 23, A y B) antes y después de la inoculación de TYLCV-[CU]. En el resto de los clones no se detectó ARNi complementario a *c1*. Al mismo tiempo se evidenció que el clon 126 produjo mayor cantidad de ARNi complementario a *c1* que el clon 109 antes y después de la inoculación (Figura 23, A y B).

Con estos resultados se confirma que la resistencia de los clones 109 y 126 se indujo por el mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional del gen *c1*.

4.2.5 Análisis del rendimiento productivo en parcela experimental del clon 126 inoculado con TYLCV-[CU].

Una vez comprobada la capacidad del clon 126 de mantenerse inmune a la inoculación de TYLCV-[CU] nos propusimos determinar si realmente esta ventaja con relación al Campbell-

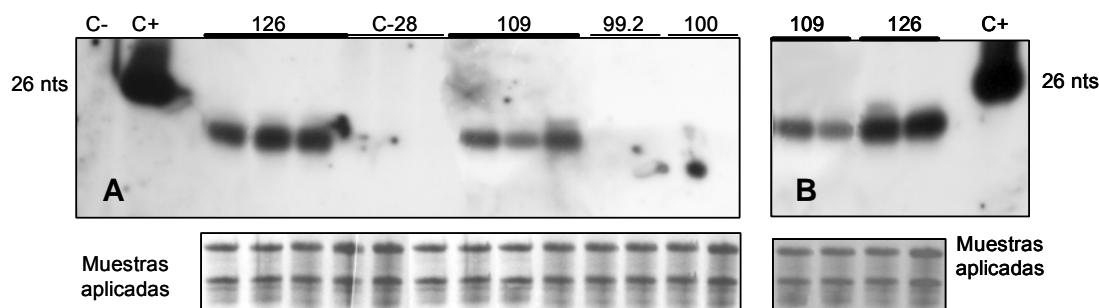


Figura 23. Autorradiografías del ensayo *Northern blot* para la detección de RNAi en plantas transgénicas de tomate. **A:** detección de ARNi en clones de tomate transgénicos inoculados con TYLCV-[CU]; **B:** detección de ARNi en los clones 126 y 109 sin inocular. Se utilizó como sonda la secuencia del gen *c1*. C+: oligonucleótido de 26 nts específico de *c1*. C-: planta de Campbell 28 no inoculada.

28 no transformado se reflejaría en el rendimiento productivo. Las plantas previamente inoculadas con TYLCV-[CU] en condiciones de casas de cultivo se transfirieron a la parcela

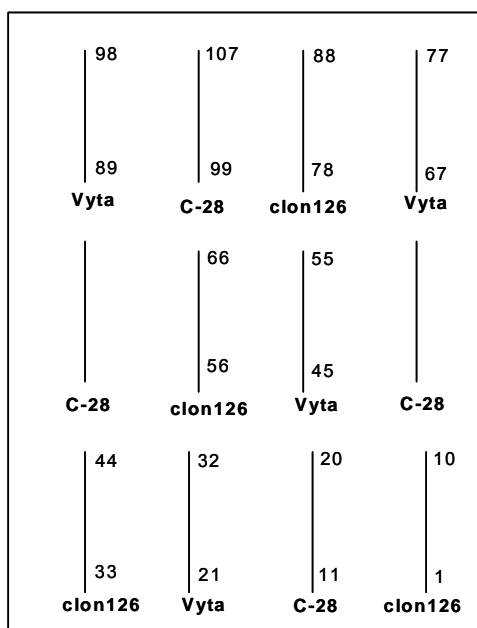


Figura 24 Diseño de Bloques al Azar para el análisis del rendimiento productivo en parcela experimental del clon 126, en condiciones de inoculación con TYLCV-[CU].

experimental del CIGB en un diseño de Bloques al Azar (Figura 24).

Se realizó un análisis de la infección en las plantas inoculadas con TYLCV-[CU] mediante un ensayo ELISA a los 30 días de cultivo en la parcela experimental.

Los resultados de ensayo ELISA realizado a 5 plantas de cada variante confirmaron la inmunidad en el clon transgénico en comparación con el control susceptible y la variedad tolerante. Las plantas del clon 126 como promedio alcanzaron un valor de absorbancia de 0.176 ± 0.009 , similar a las plantas no inoculadas. Mientras las plantas de Vyta y Campbell 28 alcanzaron una absorbancia de 0.330 ± 0.03 y 1.09 ± 0.65 como promedio respectivamente.

En plena producción de tomates (tres meses después de iniciado el experimento) se realizó un ensayo *dot-blot* para determinar la presencia del genoma de TYLCV-[CU] en las plantas inoculadas. El análisis de la autorradiografía confirmó que las plantas pertenecientes al clon 126 no contenían genoma viral detectable por esta técnica (Figura25). Mientras, las plantas de Vyta y Campbell 28 no

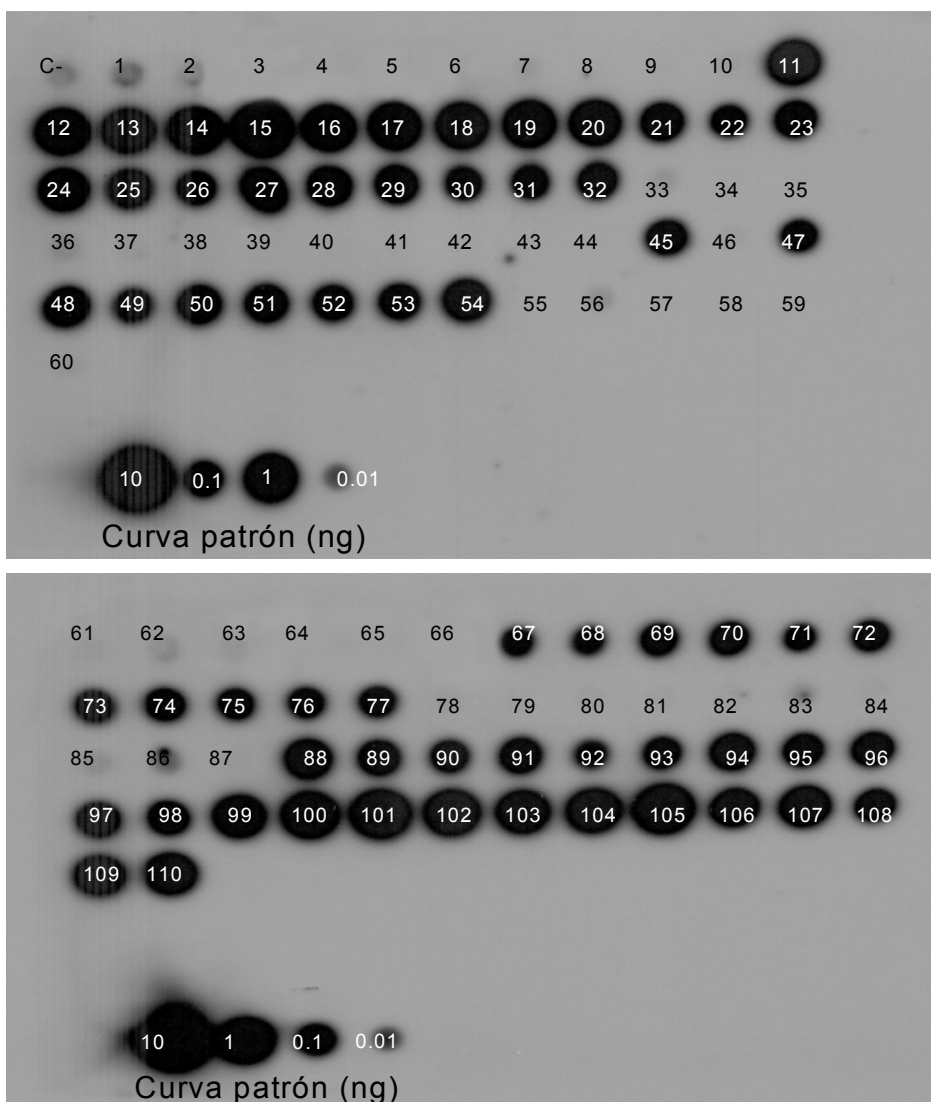


Figura25. Autorradiografías del ensayo *dot-blot* para la determinación de la presencia del genoma viral en las plantas del clon transgénico 126, Vyta y Campbell 28 en experimento para la determinación del rendimiento productivo. C-: planta no inoculada; 1-10, 33-44, 56-66 y 78-87 pertenecen al clon transgénico 126; 21-32, 45-55, 67-77 y 88-98 pertenecen a la variedad Vyta; 11-20 y 99-110 pertenecen a la variedad Campbell 28 no transgénica. Sonda utilizada -región intergénica de TYLCV-[CU]

transgénico mostraron niveles de acumulación del genoma viral desde 100 pg hasta 10 ng (Figura25).

Resultó que el diámetro promedio de cada fruto no fue diferente significativamente entre las variantes analizadas mientras que el peso promedio de los frutos del clon 126 resultó significativamente mayor (76.83 g del clon 126 vs 64.91 g (Campbell 28) y 64.13 g (Vyta)). Por otro lado, la cantidad de frutos promedio por planta se comportó significativamente superior en el clon 126 (47) con respecto al resto de las variantes (8.41 en el caso de Campbell 28 no transgénico y 30.87 en el caso de Vyta), así como la cantidad de frutos totales (2068 para el clon 126 vs 345 y 1513 para Campbell 28 y Vyta respectivamente) (Figura 26). Los datos muestran que el clon 126 resultó superior de forma significativa que el Campbell 28 no transgénico en todos los parámetros evaluados del rendimiento productivo

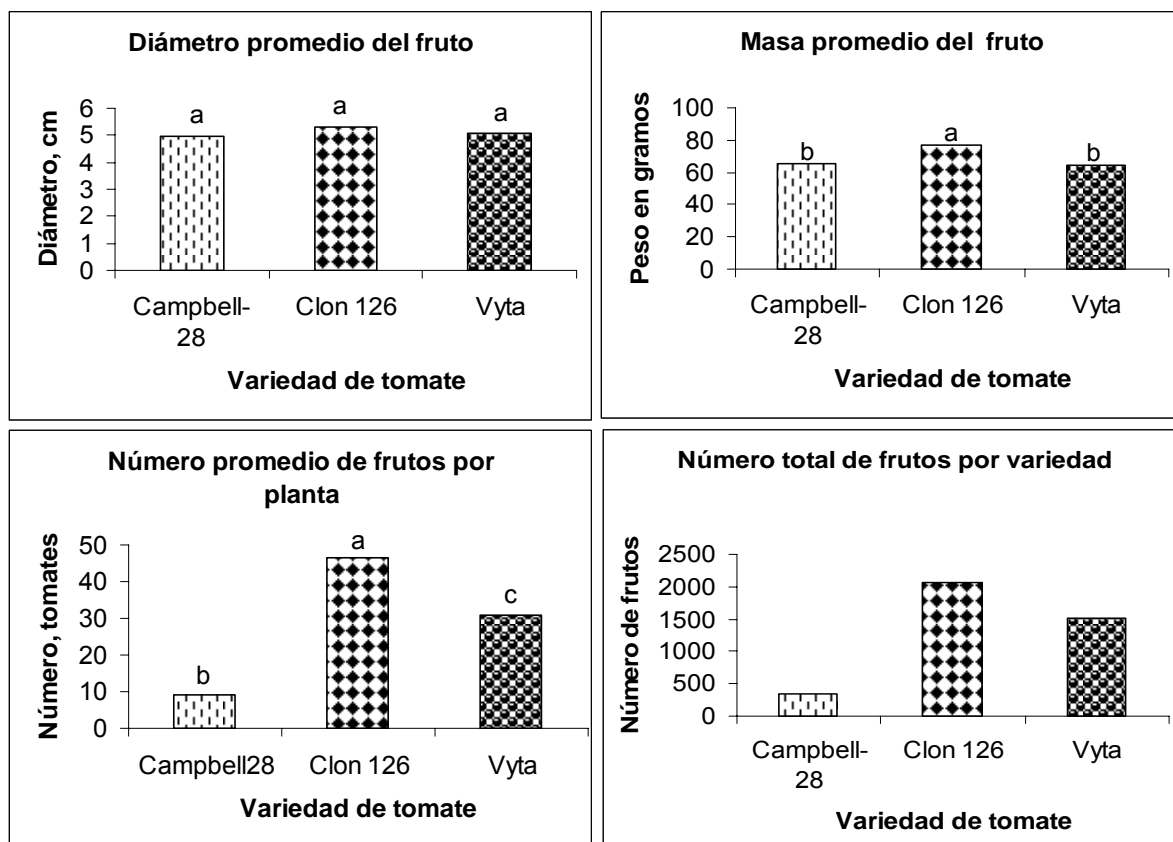


Figura 26. Representación gráfica de los parámetros que reflejan el rendimiento productivo del clon transgénico 126 en comparación con la variedad Campbell 28 no transgénica y Vyta. Las plantas se inoculaban en condiciones de invernadero durante 30 días y cultivadas en una parcela experimental a cielo abierto. Los gráficos muestran el diámetro y peso promedio de un tomate; cantidad promedio de tomates por planta y cosecha total de tomates. Letras diferentes significan diferencia significativa para $p < 0.05$, según la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan). Para el clon 126 el tamaño de muestra fue $n=44$; para Vyta $n=44$; para Campbell 28 $n=41$.

Se realizó además, un análisis del comportamiento del rendimiento en toda la cosecha tomatera hasta la conclusión del experimento. Este análisis mostró un comportamiento superior del clon transgénico 126 en comparación con el Campbell 28 en relación al total de frutos colectados cada vez a lo largo de todo el período de cosecha, coincidiendo el pico de producción (Figura 27).

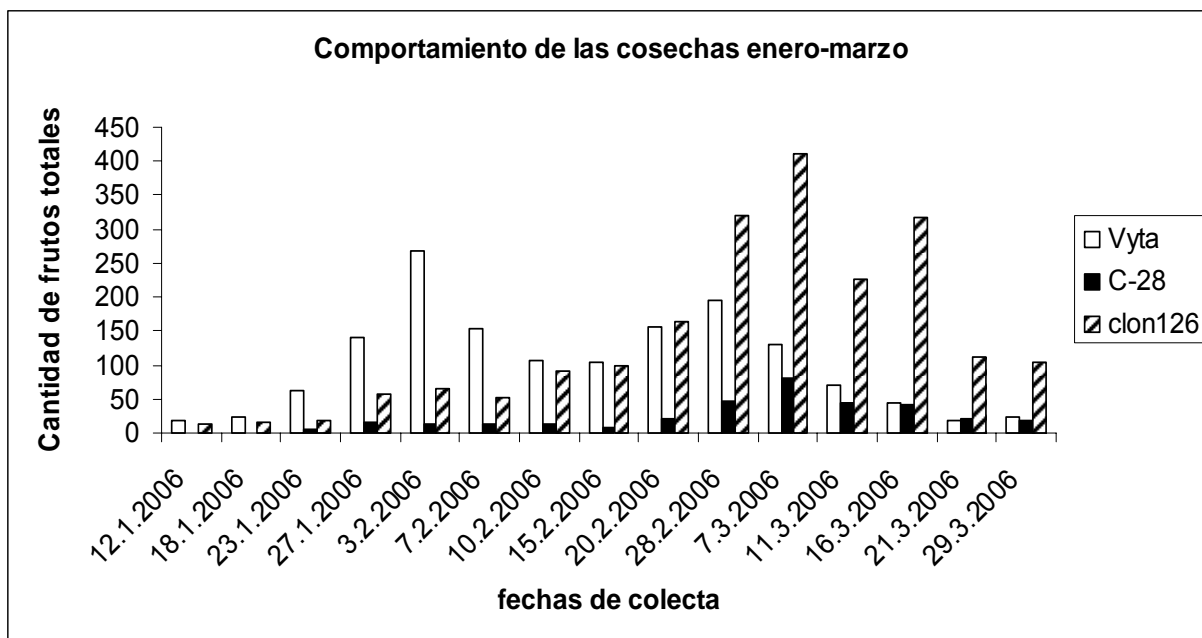


Figura 27. Representación gráfica del comportamiento de la producción de tomates a partir del clon transgénico 126, la variedad Campbell 28 (C-28) no transgénica y la variedad Vyta en el período de enero-marzo 2006. El experimento se desarrolló en condiciones de parcela experimental del CIGB con plantas inoculadas con TYLCV-[CU] en la etapa de desarrollo de dos hojas (bajo). El cultivo y desarrollo de las plantas se realizó bajo infestación natural permanente con mosca blanca. En cada día señalado se recolectaron los frutos maduros del total de plantas correspondientes a cada variante.

4.2.6 Obtención de plantas transgénicas de la variedad Campbell 28 que contienen la construcción *hpc1*-Basta mediante el uso del glufosinato de amonio como agente de selección. Análisis de la eficiencia de transformación de la variedad Campbell 28 en condiciones de selección con glufosinato de amonio.

Para este fin se desarrolló la construcción pCAMBIA3300*c1*antisentidoI-2*c1* (*hpc1*-Basta) (ver en Materiales y Metodologías el acápite 3.2.3.3). En las condiciones optimizadas para la transgénesis de tomate variedad Campbell 28 se desarrollaron plantas transformadas con la construcción *hpc1*-Basta mediante la regeneración en medio que contenía glufosinato de amonio como agente de selección. La eficiencia de transformación en estas condiciones resultó dos veces superior en comparación con la eficiencia de transformación obtenida en medio con kanamicina como agente de selección, 33.24% vs 14.37% respectivamente (Tabla 8 y Tabla 7).

Tabla 8: Caracterización de la eficiencia de transformación de la variedad Campbell 28 en presencia de glufosinato de amonio, aplicando condiciones optimizadas previamente.

Experimento #	Cantidad de explantes infectados	Cantidad de explantes con callos	Cantidad de brotes normales	Cantidad de brotes enraizados
1	1728	1728	237	58
2	1360	1360	151	71
Promedio	1544	1544	194	64.5
Frecuencia, %	-	100	-	33.24

4.2.7 Caracterización biológica y molecular de las plantas transgénicas de tomate resistentes a glufosinato de amonio que portan la construcción *hpc1-Basta*.

Las plantas seleccionadas en glufosinato de amonio se cultivaron en condiciones de infestación con mosca blanca en la parcela experimental del CIGB. En estas condiciones se identificó un clon que no mostró síntomas de la infección por TYLCV en el transcurso de 4 meses de crecimiento.

Una vez que se creció en condiciones naturales este clon se colectaron las semillas R1 a partir de él para el ensayo biológico y la caracterización molecular.

La evaluación de su susceptibilidad a TYLCV en plantas R1 inoculadas con mosca blanca se realizó a través de un *dot blot* para la detección del genoma de TYLCV-[CU].

La caracterización molecular se realizó a varias líneas transgénicas R1 a través de los ensayos tipo *Southern* y *Northern blot*. El *Southern blot* se empleó para la determinación del estado transgénico así como el número de copias del transgén en el genoma de las plantas; y el *Northern blot* para la determinación del mecanismo de resistencia de las plantas asintomáticas.

4.2.7.1 Análisis de la multiplicación de TYLCV-[Cu] en plantas transgénicas de tomate resistentes a glufosinato de amonio.

Las semillas R1 se sembraron en condiciones de invernadero y las plantas germinadas con 2-4 hojas se inocularon con TYLCV en condiciones controladas de infestación con mosca blanca, a razón de 50-80 individuos por planta. De un total de 58 plantas 15 replicaron el genoma viral, mientras que 36 permanecieron hasta el día 30, a partir del comienzo de la inoculación, libres de síntomas y del genoma de TYLCV (Figura 28). Las siete plantas de Campbell 28 no transgénicas, inoculadas en calidad de controles, también mostraron presencia del genoma de TYLCV en el rango de 10-1 ng (Figura 28).

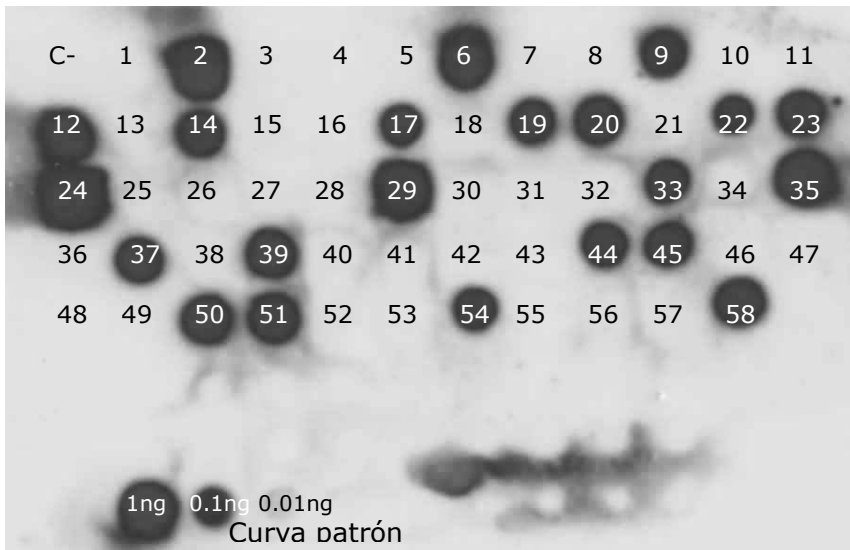


Figura 28: Autorradiografía del ensayo *dot-blot* para la determinación de la presencia del genoma de TYLCV en las plantas del clon transgénico B-1 resistente a glufosinato de amonio. C-: planta no transgénica no inoculada. 1-58: plantas inoculadas con TYLCV. 20, 35, 39, 44, 45, 50 y 58: plantas no transgénicas inoculadas con TYLCV. En calidad de sonda se utilizó la región intergénica de TYLCV.

4.2.7.2 Análisis de la integración de la construcción *hpc1*-Basta en el genoma de las plantas transgénicas de tomate.

Como parte de la caracterización del clon transgénico con resistencia a glufosinato de amonio se realizó un ensayo *Southern blot* para el cual el ADN genómico se cortó con la endonucleasa *HindIII*, y se hibridó con la secuencia del gen *bar* en calidad de sonda radioactiva. El análisis de la autorradiografía muestra que el clon transgénico porta dos copias del transgén (Figura 29).

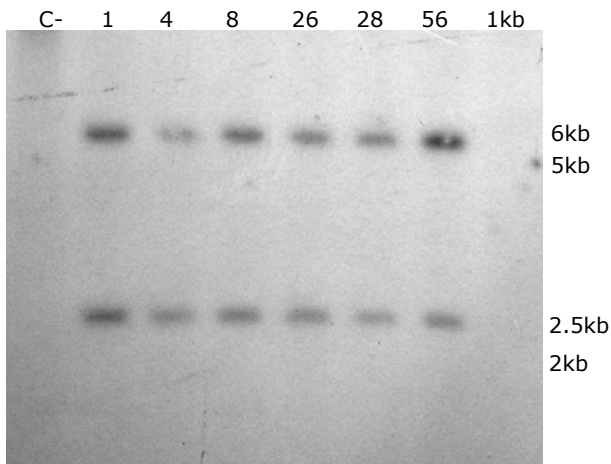


Figura 29: Autorradiografía del ensayo *Southern blot* para el análisis del patrón de integración del transgén en el clon B-1 de tomate. El ADN total se digirió con la endonucleasa *HindIII*, y se transfirió a la membrana de nylon Hybond N+ (Amersham Corp., Inglaterra) después de la corrida electroforética en un gel de agarosa al 0.8 %. C-: planta de tomate no transgénica. 1-56: líneas R1 del clon B-1 inmunes a TYLCV y resistentes a glufosinato de amonio. 1 kb: marcador de peso molecular 1 kb Ladder, Gibco BRL, EEUU.

4.2.7.3 Demostración del mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional en las plantas resistentes a TYLCV-[CU] portadoras del gen *bar*.

Por otra parte, se analizó si el clon portador de *hpc1*-Basta producía ARNi específico del gen *c1* como indicador del proceso de silenciamiento génico post-transcripcional. Como resultado se evidenció la producción de ARNi específico del gen *c1* en las líneas analizadas

del clon resistente a glufosinato de amonio (Figura 30). Como testigo en este ensayo se utilizó la fracción de ARN de bajo peso del clon 126 resistente a kanamicina. De esta manera se demostró que el mecanismo mediante el cual se logra la inmunidad contra TYLCV en ambos casos es el mismo (Figura 30).

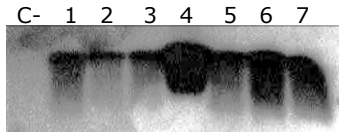


Figura 30: Autorradiografía del ensayo *Northern blot* para la detección de ARNi en plantas transgénicas de tomate inoculadas con TYLCV-[CU]. C-: Fracción de ARN de pequeño peso de planta de tomate Campbell 28 no transgénica no inoculada con TYLCV-[CU]; 1-3: ARNi de plantas del clon 126 inoculadas con TYLCV-[CU]; 5-7: ARNi de plantas del clon B1 inoculadas con TYLCV-[CU]; 4: oligonucleótido de 27 bases específico de la región 5' del gen *c1*. Se utilizó en calidad de sonda un fragmento de 1.1 kb derivado de la secuencia del gen *c1*.

5 DISCUSIÓN

La enfermedad del encrespamiento y el amarillamiento de la hoja es la afectación de mayor impacto económico que sufre el tomate en las áreas subtropicales y tropicales a nivel mundial (Polston y Anderson, 1997). Esta enfermedad es provocada por uno de los begomovirus distribuidos más ampliamente: *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). Su incidencia en Cuba se constató a partir del año 1989 cuando empezaron a ocurrir cuantiosas pérdidas en el cultivo en todo el territorio nacional (Martínez y col., 1996; Ramos y col., 1996). Para el control del complejo mosca blanca-TYLCV la utilización de variedades resistentes se considera la estrategia más eficaz y económicamente practicable para el control de esta enfermedad (Friedmann y col., 1998; Lapidot y Friedmann, 2002). Los programas de desarrollo de variedades resistentes a TYLCV han permitido reconocer la existencia de genes capaces de disminuir o inhibir los síntomas producidos por este patógeno en especies silvestres de tomate. Sin embargo, la transferencia de estos genes hacia variedades cultivables va aparejada de un cambio en las propiedades agronómicas de los cultivares receptores, lo que hace trabajoso y demorado el proceso para la recuperación del estándar comercial (Vidavsky y col., 1998; Vidavsky y Czosnek, 1998). Por otra parte, las variedades resistentes disponibles en el mercado, a pesar de que no muestran síntomas de la enfermedad en condiciones de infección por TYLCV, constituyen una fuente de inóculo por su capacidad para multiplicarlo. En adición, las plantas resistentes mantienen un estado fisiológico óptimo para incrementar la población de la mosca trasmisora. Como alternativa a estos inconvenientes, se aplican las herramientas que brinda la ingeniería genética, específicamente el mecanismo de resistencia derivada del patógeno (RDP, del inglés *pathogen derived resistance*) (Sanford y Johnston, 1985). Sobre la base de este mecanismo se destaca por su efectividad para combatir TYLCV la estrategia dirigida a la inhibición de la actividad de la proteína asociada a la replicación (Rep) (Brunetti y col., 1997; Chatterji y col., 2001; Noris y col., 1996; Yang y col., 2004). Para ello la secuencia génica correspondiente ha sido objeto de mutaciones afectando sus actividades biológicas. Sin embargo, la inhibición total de la expresión del gen *c1* que codifica para la Rep se enmarca dentro de RDP como la vía más promisoría para alcanzar la inmunidad en las plantas frente a la infección por TYLCV. Encaminado hacia ese fin, el presente trabajo consistió en la aplicación por primera vez de un diseño del ARN en horquilla (del inglés *hairpin RNA*) para provocar silenciamiento génico post-transcripcional (del inglés *post-transcriptional gene silencing* o PTGS) del gen *c1*, con el propósito de inhibir la multiplicación de TYLCV en plantas de tomate. Para ello se obtuvieron plantas transgénicas de tomate de la variedad Campbell 28, de gran susceptibilidad a este virus, que portan el diseño para inducir PTGS

del gen *c1* y se demostró la inmunidad alcanzada por estas plantas en condiciones de inoculación con TYLCV. De esta manera se validó por primera vez la efectividad del PTGS contra un virus con genoma de ADN.

5.1 El silenciamiento génico post-transcripcional del gen *c1* inhibe la replicación de TYLCV-[CU] *in vitro*.

El primer objetivo de este trabajo consistió en la demostración de la capacidad del silenciamiento génico post-transcripcional dirigido contra el gen *c1* para inhibir la replicación de TYLCV en un sistema demostrativo y barato. El gen *c1* codifica para la proteína asociada a la replicación (Rep) y se considera indispensable para la replicación de TYLCV (Moriones y Navas-Castillo, 2000). La Rep se traduce a partir del primer transcrito viral que se produce una vez que el virus está dentro de la célula (Chatterji y col., 2001). Si inhibiésemos eficientemente la generación de los transcritos virales que contienen la secuencia del gen *c1*, podríamos conseguir la disminución de la multiplicación de TYLCV en la célula inoculada.

5.1.1 La línea celular de tabaco NT1 constituye un sistema apropiado para la replicación de TYLCV-[CU].

Para la conformación de un modelo que permita analizar la repercusión del silenciamiento del gen *c1* sobre la replicación de TYLCV se eligió la línea celular de tabaco NT1, que cumple con los requisitos de: posibilidad de mantenimiento con insumos de bajo costo, pocas exigencias para su manipulación y una tasa de multiplicación celular alta (Paszty y Lurquin, 1987) (Figura 3). La capacidad de multiplicación de esta línea celular facilita su transformación genética por la vía directa e indirecta (Fuentes y col., 2004; Sanford y col., 1993). La correlación entre una alta frecuencia de transformación genética con el estado de mitosis o la dediferenciación de las células a transformar está bien documentada (Lai y Chen, 2002; Peña y col., 2004; Villemont y col., 1997). A través de la aplicación de la citometría de flujo se evidenció que durante la transformación con *Agrobacterium tumefaciens* en *Petunia hybrida*, y también en el caso de los cítricos, la mayor expresión y frecuencia de integración de un transgén ocurre cuando las células se encuentran en la fase S del ciclo celular. Por lo tanto, las células NT1 podrían constituir un blanco fácil para la transfección de TYLCV.

El primer paso de la replicación de un geminivirus constituye la conversión del genoma de cadena sencilla a un producto intermedio de dos cadenas (Kammann y col., 1991; Saunders y col., 1992). Este paso debe realizarse enteramente con enzimas de la célula hospedante. La segunda etapa, la iniciación de la fase de círculo rodante requiere de la acción común entre la Rep viral y los factores celulares, que conlleva a la producción de nuevas ADNdc (ADN de dos cadenas) y posteriormente a ADNsc (ADN de cadena sencilla) virales (Stanley,

1995). Por lo general, los organismos multicelulares contienen la mayoría de sus células en estado diferenciado, donde los factores que intervienen en la replicación del ADN están ausentes o inactivos funcionalmente. Por ello, durante la infección por geminivirus es probable que ocurra la inducción de la replicación del ADN del hospedante (Gutierrez, 2000a; Hanley-Bowdoin y col., 2000). Esta idea se confirmó por la acumulación del antígeno de proliferación nuclear (PCNA, del inglés *proliferating cell nuclear antigen*) en células diferenciadas de las plantas infectadas con TGMV (Nagar y col., 1995) y en plantas transgénicas que expresan la Rep de TGMV (Kong y col., 2000). Además, para algunos geminivirus se correlacionó la abundancia de intermediarios de ADNdc con la fase S del núcleo en células cultivadas (Accotto y col., 1993). Ello sugirió la existencia de mecanismos o vías para el paso de la célula inoculada en estado diferenciado y "reposo replicativo" a una fase de división celular activa, necesaria para complementar las deficiencias del virus (Grafy y col., 1996; Xie y col., 1996). Se confirmó que la activación de la mitosis y la entrada de la célula a la fase S del ciclo celular se debe a la liberación de los factores de transcripción E2F a través de la hiperfosforilación y por consiguiente la inactivación de la proteína similar a retinoblastoma (RBR, del inglés *Retinoblastoma related protein*) que los reprime (de Jager y col., 2005). Precisamente se ha demostrado que dos proteínas geminivirales, la Rep y RepA, también inactivan la RBR celular con lo cual promueven la replicación del ADN celular necesaria para la multiplicación del genoma viral (Gutierrez, 2000a). Aunque para la línea celular de tabaco NT1 no se ha demostrado su capacidad como hospedante de TYLCV es probable que posea ya todos los elementos necesarios para la replicación de este geminivirus, dado por su estado perenne de división celular. Por esta cualidad podríamos suponer, además, que estas células son capaces de multiplicar otros geminivirus si la categoría de hospedante sólo dependiera de la interacción específica de la Rep y RBR. Sobre esta base, la línea celular NT1 resultó atractiva para establecer un modelo de replicación de TYLCV. Por consiguiente, después de 48 horas de incubación las células NT1 transfectadas realmente replicaron TYLCV; a medida que se prolongó la incubación de las células bombardeadas las señales correspondientes al ADNdc y ADNsc se intensificaron (Figura 4), lo cual refleja la ocurrencia de la replicación de TYLCV. Para confirmar que se estaban sintetizando ADNdc y ADNsc virales a partir del vector transfectado los ADN obtenidos de las células incubadas por seis días se trataron con *MboI* y *Mung Bean*. El tratamiento con *MboI* demostró que el ADNdc no estaba metilado, a diferencia del inoculado que provenía de una cepa de *Echerichia coli* *dam*⁺ (Figura 4). Por lo tanto, estas moléculas son producto de la síntesis del genoma viral en las células NT1. Por su parte, el tratamiento con *Mung Bean* reflejó la aparición de ADNsc en las células transfectadas.

Otros autores demostraron la factibilidad de utilizar protoplastos de células en suspensión como sistema alternativo al hospedante para la multiplicación de varios geminivirus (Chatterji y col., 2001; Vanitharani y col., 2003), y demostraron la capacidad de las células de soportar la replicación. Las células empleadas se caracterizaron por su capacidad para la multiplicación permanente, lo que seguramente propició la replicación geminiviral.

Podemos aseverar que las células de la línea NT1 de tabaco contienen los elementos necesarios para la replicación de TYLCV y, por lo tanto, son apropiadas para conformar un sistema *in vitro* para el análisis de la multiplicación de TYLCV.

5.1.2 Las líneas transgénicas de NT1 que portan la construcción *c1* antisentido generan ARNi específicos del gen *c1*.

El diseño génico para provocar silenciamiento del gen *c1* se enfocó en la promoción de moléculas de ARN de dos cadenas (ARNdc), las cuales deben inducir silenciamiento génico post-transcripcional del gen diana. La construcción génica se realizó con la secuencia del gen *c1* en antisentido bajo la regulación del promotor 35s de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) y el terminador de la nopalina sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens* (Figura 9). Esta construcción está diseñada para producir moléculas de ARN complementarios a los transcritos del gen *c1* derivados del genoma TYLCV. Los transcritos complementarios (los generados a partir del transgén y los virales) pueden formar moléculas de ARN bicatenarias y éstas a su vez constituyen el sustrato para una ARNasa tipo III (Dicer) (específica de ARNdc) que lo degrada en pequeñas moléculas de ARN de 21 a 25 pb (ARNi) (Aravin y Tuschl, 2005).

La producción de ARNi es una consecuencia y a la misma vez puede ser el mecanismo efector del silenciamiento génico post-transcripcional. Diferentes estudios han demostrado que el silenciamiento génico post-transcripcional puede iniciarse a partir de ARNs de cadena sencilla o aberrantes que se convierten en ARNdc por la acción de la ARN polimerasa celular dependiente de ARN (de las siglas en inglés RDR) (Ahlquist, 2002; Dalmay, 2000). En el presente trabajo la formación de ARNi complementarios al transcrito derivado del gen *c1* en dos de las líneas celulares analizadas (Figura 12 B) pudo inducirse por la abundancia de ARNm específicos al gen *c1*. Esta abundancia de transcritos puede ser el resultado de la alta actividad del promotor 35s, que a la misma vez puede conllevar a la formación de ARNm que carecen de la estructura cap en el extremo 5' o de la cola de adenosinas en el extremo 3', lo cual activa la síntesis de ARN bicatenario (Baulcombe, 2004). También la gran cantidad de ARNm específico del gen *c1* puede ser promovida por la integración de múltiples copias del transgén, lo cual ocurre con alta frecuencia cuando se emplea el sistema de biolística para la transformación genética (Emani y col., 2002; Voinnet y col., 1998). El

exceso de transcritos puede provocar además, la formación de estructuras secundarias entre los ARNm (Vanitharani y col., 2005). Aunque no se realizó ningún análisis del número de copias integradas del transgén en las líneas productoras de ARNi se supone la integración múltiple del gen *c1* antisentido también como base de la formación de abundantes moléculas de ARNm.

La ausencia de ARNm correspondiente a la construcción *c1* antisentido en las líneas que produjeron ARNi, probablemente es consecuencia de la degradación total de los transcritos en el proceso de PTGS. Por otro lado, en el caso de la línea 2 (Figura 12, A y B) que no produjo ARNi, al igual que otras analizadas (no se muestran en la Figura 10), la ausencia de ARNm derivado del transgén puede ser el resultado de cambios epigenéticos que conllevan al llamado silenciamiento transcripcional (Cheung y Lau, 2005). La integración del transgén dentro o cerca de la región transcripcionalmente inactiva puede inducir al estado de represión del transgén. Este estado de la cromatina da origen a la heterocromatina, y se transmite a la descendencia (Cheung y Lau, 2005; Dillon, 2004). La probabilidad de la integración de un transgén en la heterocromatina es alta por la gran proporción que ocupa dentro de la cromatina con relación a la eucromatina, transcripcionalmente activa. En la base de la inactividad de la heterocromatina están los cambios epigenéticos, entre los que se encuentran la acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación de los residuos de lisina y serina localizados en el N-terminal de las histonas y que regulan el anclaje de complejos represores (Cheung y Lau, 2005). Estos cambios determinan si un gen es activo o inactivo. En particular, la naturaleza combinatoria de estas modificaciones, o el llamado "código" de las histonas influye en el modo de regulación de los transgenes (Jenuwein y Allis, 2001). En general se considera que un cambio en el balance entre la acetilación y la metilación de las histonas y la metilación del ADN puede determinar la represión génica en la heterocromatina (Kwaks y Otte, 2006).

Para los transgenes también se ha descrito el silenciamiento mediado por la metilación en su secuencia (Bocharadt y col., 1992; Emani y col., 2002; Iyer y col., 2000; Matzke y Matzke, 1995; Palmgren y col., 1993). Por lo general este mecanismo está asociado a la inactivación de las secuencias promotoras (Park y col., 1996). El efecto que causa la metilación en la región codificante sobre la transcripción es menos evidente, aunque en algunos casos parece estar involucrado en la inducción de PTGS a través de la formación de transcritos aberrantes (Jones y col., 1999; Stam y col., 1997).

A diferencia de otros trabajos realizados con el propósito de demostrar la capacidad de diferentes diseños génicos de inhibir la replicación de un geminivirus fuera de su hospedante, el modelo desarrollado en este trabajo se constituyó sobre la base de líneas

celulares transgénicas que expresan constitutivamente el transgén antiviral. Las estrategias aplicadas por otros autores, se realizaron sobre protoplastos de la línea celular de tabaco BY-2 y hojas de *Nicotiana benthamiana* a través del análisis de la actividad transitoria del transgén, co-transformado con los componentes virales (Chatterji y col., 2001; Vanitharani y col., 2003). De esta manera no es posible la evaluación de la estabilidad del mecanismo de PTGS inducido contra el gen *c1* en las siguientes generaciones de células. En el presente trabajo se partió de varias líneas de células transgénicas portadoras del gen *c1* en antisentido, las cuales se analizaron después de ser multiplicadas por varias generaciones. Estas líneas mostraron mediante el ensayo tipo *Northern blot* la producción de ARNi complementario al gen *c1* sin haberlas retado con TYLCV (Figura 12).

5.1.3 Las líneas NT1 transgénicas que producen ARNi complementario al gen *c1* inhiben la replicación de TYLCV.

Una vez establecida la replicación de TYLCV en la línea celular NT1 se procedió al análisis de su inhibición por la construcción *c1*antisentido. Para ello, las células que portan la construcción *c1*antisentido se bombardearon con un dímero de TYLCV (Figura 3), previamente demostrada su actividad replicativa (Figura 7, Figura 8). Después de seis días de incubación los ADN totales se extrajeron de las células transfectadas, y con el objetivo de detectar el ADN viral de nueva síntesis se hibridaron con la secuencia del genoma de TYLCV mediante la técnica de *Southern blot*.

Se retaron un total de 15 líneas celulares transformadas con la construcción que contiene *c1*antisentido. Dos de estas líneas mostraron su capacidad para la inhibición de la replicación de TYLCV, las líneas Ant3 y Ant4 (Figura 11). Este resultado se evidencia por la ausencia de las señales correspondientes al ADN_{dc} y ADN_{sc} virales en comparación con las líneas no transgénicas. Además, coincide que las líneas Ant3 y Ant4 son las únicas que producen ARNi complementarios a *c1*. Por consiguiente, la inhibición de la replicación de TYLCV en estas dos líneas refleja la capacidad del mecanismo de PTGS dirigido contra la proteína asociada a la replicación para disminuir la multiplicación de TYLCV.

Con anterioridad se describió la inducción de PTGS, dirigido contra el transcrito de la Rep de ACMV, con el objetivo de inhibir la replicación de *African cassava mosaic virus* (ACMV) en un sistema "no hospedante" (Vanitharani y col., 2003). Para ello, los autores introdujeron moléculas de ARNi específicas de la secuencia génica de la Rep (*ac1*) en protoplastos de la línea de tabaco BY-2 en presencia de ACMV. Como resultado, se disminuyó la tasa de multiplicación de ACMV en un 60%, co-transfectado en la misma mezcla de los ARNi (Vanitharani y col., 2003). Aunque este sistema tuvo como mérito la demostración rápida del efecto y la capacidad de los ARNi específicos de *ac1* para inhibir la replicación viral (en

36-48 horas) los autores lograron sólo una inhibición parcial de la acumulación de ACMV con relación a las muestras transfectadas solamente con el virus. Además, resultó evidente del análisis de la replicación de ACMV la existencia de la Rep en las muestras, aunque los autores no lograron detectar los ARNms correspondientes según el resultado del ensayo tipo *Northern blot*.

La ventaja del sistema probado en el presente trabajo para el análisis de la replicación de TYLCV consiste en la formación *a priori* de las moléculas de ARNi complementarias a la secuencia del gen *c1* como consecuencia de la expresión constitutiva del transgén. Por ello, la probabilidad de producción de la Rep, una vez que el virus esté dentro de la célula es mínimo, lo cual se explica por la degradación inmediata del transcrito viral. De esta manera, este análisis nos aproxima a lo que sucedería en las plantas de tomate que portasen este diseño antiviral.

Desde los inicios de su aplicación, la tecnología del ARN antisentido o ARN de cadena negativa mostró su eficacia para la inhibición de la expresión génica en células de plantas (Ecker y Davis, 1986). En la actualidad, es posible lograr mediante esta técnica el apagamiento completo o parcial de un gen y correlacionar ese efecto con el nivel de expresión del transcrito antisentido o del transcrito de la cadena diana positiva. Sin embargo, la cantidad de moléculas de ARNm derivadas del transgén durante el proceso de transformación no es predecible por ahora, como tampoco es controlable la cantidad de moléculas diana que inicialmente estarán presentes en el sistema. Por tanto, el silenciamiento de un gen específico con el empleo de esta tecnología requiere de la obtención de diferentes líneas transgénicas independientes. Ello aumentaría la probabilidad de encontrar aquel que contenga un nivel de expresión del ARN antisentido que conlleve a la formación de las moléculas de ARNi capaces de inducir PTGS, como se constató en el sistema celular evaluado en este trabajo. Con el objetivo de garantizar la producción de ARNi específicos del gen *c1* previo a la introducción de TYLCV e inducir PTGS independientemente del nivel de transcripción del transgén se propuso la obtención de un diseño génico que produciría dos cadenas de ARNm unidas por puentes de hidrógeno (un tallo de ARN u horquilla, del inglés *hairpin RNA*) (Figura 10) (Smith y col., 2000), que fue uno de los que se empleó en la transgénesis de tomate posteriormente.

5.2 El silenciamiento génico post-transcripcional de *c1* protege las plantas transgénicas de tomate variedad Campbell 28 de la infección por TYLCV.

Para evaluar la utilidad del mecanismo de silenciamiento post-transcripcional dirigido contra *c1* en plantas de tomate infectadas con TYLCV se obtuvieron plantas transgénicas, que producen ARN antisentido complementario al transcrito de *c1*, y otras que producen

horquillas de ARN a partir de la secuencia ARN de *c1* en sentido y antisentido. Para ello se utilizó una metodología optimizada sobre la base del reconocimiento de los factores que determinan la eficiencia de transformación de la variedad de tomate Campbell 28.

5.2.1 La variedad de tomate Campbell 28 muestra una eficiencia de transformación baja, dependiente de la eficiencia de regeneración del tejido cotiledonal.

Hoy día lograr plantas transgénicas de tomate a partir de variedades con bajo potencial regenerativo está lejos de constituir una tarea rutinaria. La aplicación de la transgénesis en tomate mediante el uso del vector natural *Agrobacterium tumefaciens* puede presentar una baja eficiencia en aquellas variedades con baja capacidad de regeneración. En el pasado toda la atención se dirigió hacia las variedades que muestran un alto rendimiento regenerativo en el cultivo *in vitro* de tejidos, para las cuales se alcanzó una eficiente recuperación de transformantes. En la actualidad, los esfuerzos se dirigen a desarrollar una metodología común para todas las variedades, caracterizada por una alta eficiencia de transformación (Cortina y Culiáñez-Maciá, 2003; Park y col., 2003). Sin embargo, no se dispone de datos sobre el comportamiento de variedades con bajo potencial regenerativo o recalcitrantes.

Se plantea que la respuesta regenerativa del genotipo a las condiciones de cultivo determina la frecuencia de aparición de plantas transgénicas (Davis y col., 1991a; McCormick y col., 1986), mientras que la capacidad de proliferación celular en los explantes a transformar puede determinar la eficiencia de transformación (Lai y Chen, 2002; Sangwan y col., 1992; Villemont y col., 1997). Otros factores también pueden influir sobre la transformación por *Agrobacterium tumefaciens* en el caso de tomate. Por ejemplo, la aplicación de "células nodrizas" o el compuesto fenólico conocido por el nombre de acetosiringona (3,5-dimethoxy-4-hidroxy-acetofenon) al medio de cultivo o pre-cultivo induce la virulencia de la bacteria (Cortina y Culiáñez-Maciá, 2003; Hamza y Chupeau, 1993; McCormick y col., 1986); el tipo de cepa de *A. tumefaciens* portador de un plasmidio Ti característico determina la especificidad por la especie de planta (van Roekel y col., 1993); la concentración adecuada de *A. tumefaciens* y la aplicación de altas dosis de tiamina puede garantizar la sobrevivencia de la células transformadas (Cortina y Culiáñez-Maciá, 2003; McCormick y col., 1986); y el precultivo previo a la transformación puede inducir el estado proliferativo de las células a transformar (Hamza y Chupeau, 1993).

Está bien documentado que una capacidad de regeneración alta propicia una recuperación eficiente de transformantes (Barg y col., 1997; Fillatti y col., 1987a; Ling y col., 1998). Lo cual significa un aumento en la cantidad de plantas transformadas con relación al número

de brotes-escapes en condiciones de selección, lo cual caracteriza la eficiencia de transformación. Sin embargo, algunos de los genotipos económicamente importantes muestran una baja eficiencia de regeneración que dificulta su mejoramiento por la vía de la ingeniería genética. En esta situación se encuentra la variedad de tomate Campbell 28, la cual mostró un potencial morfogénético alto y una pobre conversión a plantas normales que, como consecuencia, se reduce a una baja eficiencia de regeneración (Tabla 1, Tabla 2, Tabla 3). La formación de brotes en medio con las hormonas zeatina y ácido indolacético (AIA) a partir de cotiledones de Campbell 28 alcanzó la cantidad de 2.13 brotes por explante regenerado en medio que contenía como agente solidificante agar-agar (Tabla 1). Este proceso confirmó la susceptibilidad de los explantes cotiledonales a la acción de la zeatina y el AIA descrita anteriormente por otros autores para la regeneración de tomate (Frankerberger y col., 1981; Kartha y col., 1976; Locky, 1983). Se demostró que a medida que aumenta la concentración de AIA respecto a la de zeatina disminuyen tanto el porcentaje de explantes que regeneraron como la eficiencia de regeneración. Por otra parte, la mayor eficiencia de regeneración se obtuvo en el medio con la combinación 0.5 mg/L de zeatina y 0.5 mg/L de AIA. Con esta combinación también resultó el mayor porcentaje de explantes que regeneraron. Estas concentraciones hormonales coinciden con las reportadas con el uso de cotiledones por Hamza y Chupeau en la variedad UC82B (Hamza y Chupeau, 1993). Sin embargo, la cantidad máxima de brotes obtenidos para Campbell 28 es muy inferior que para UC82B; éstas son de 2.13 y 13 brotes, respectivamente, lo cual confirma que la regeneración es genotipo dependiente.

Si se compararan los resultados para la combinación de zeatina 0.5 mg/L y AIA 0.5 mg/L obtenidos sobre agar-agar (Tabla 1) con los del medio solidificado con Fitogel (Tabla 2) se observa que hay un descenso evidente para la frecuencia de explantes que regeneraron y en la eficiencia de regeneración. No obstante, al disminuir la concentración de AIA con respecto a la de zeatina hasta 0.1 mg/L ocurre un incremento de estos evaluadores. Precisamente es la combinación de zeatina 0.5 mg/L y AIA 0.1 mg/L en medio solidificado con Fitogel la que se seleccionó para el resto de los experimentos de este proyecto. Es en este medio donde se obtuvo el mayor número de brotes por explante regenerado, ocurrió una pronunciada morfogénesis (abundante formación de callos, hojas individuales y brotes), y los brotes emergieron principalmente de la zona de corte en el cotiledón donde ocurre primeramente una callogénesis. Este proceso no sucedió de igual manera sobre agar-agar, donde el explante mostraba escasa morfogénesis. Por otro lado, el tiempo de formación de brotes en Fitogel es de 25 días mientras que en agar-agar demoran como mínimo 50 días. El hecho que la cantidad de explantes que regeneraron no alcanzó el porcentaje de la

combinación más productiva en agar-agar puede ser consecuencia del efecto de la interacción de las hormonas y el agente gelificante. Se ha demostrado que algunos agentes gelificantes afectan la diferenciación y el crecimiento de los tejidos cultivados *in vitro* de manera diferente (Kazuo y col., 1995). Varios autores describieron que la diferenciación y el crecimiento de los tejidos son más lentos en agar-agar que en agarosa o Gel-Rite (Kohlenbach y Wernicke, 1977; Wernicke y Kohlenbach, 1976), lo cual se confirmó en el presente trabajo para el Fitogel.

El potencial morfogénético de esta variedad se evidenció más cuando la regeneración se realizó en concentraciones ascendentes de sacarosa. Resultó acentuado el aumento del porcentaje de explantes que regeneró en 20 g/L de sacarosa con respecto al resto de las concentraciones (Tabla 3). Además, a medida que aumentaba la concentración de sacarosa, aumentaba la masa de callos en el tejido cortado y disminuía la brotación hasta cero. Este efecto de la sacarosa podría deberse a su propiedad dual como fuente de carbono y agente osmótico (Chen y Dribnenki, 2004; Mukherjee y col., 1991).

A pesar de la baja capacidad de formación de brotes normales, se demostró una respuesta rápida del tejido cotiledonal de Campbell 28 a los estímulos externos durante el cultivo *in vitro*. En el caso de esta variedad, el proceso de morfogénesis ocurre precedido por una abundante formación de callos después de los primeros cinco días de iniciado el cultivo. Por consiguiente, la inclusión de zeatina y AIA en el medio de regeneración promovió una división celular activa y posterior diferenciación, lo cual fue descrito también para algunas variedades prolíficas de tomate (Frary y Earle, 1996; Hamza y Chupeau, 1993; McCormick y col., 1986; McCormick, 1991; Yoder, 1990). Como resultado de la co-cultivación de los cotiledones con *Agrobacterium tumefaciens*, portador del gen reportero *uidA*, se obtuvo una frecuencia alta de aparición de señales azules a partir de la actividad de la β -glucuronidasa (gen reportero utilizado en los experimentos de transgénesis) (Figura 13), demostrando una frecuencia alta de transformación celular. Este resultado confirmó el estado de competencia en el extremo cotiledonal, cortado a partir de explantes con nueve días de desarrollo para la transformación con *Agrobacterium tumefaciens*.

Anteriormente se demostró para otras especies de plantas que la fase S del ciclo celular constituye una condición del huésped indispensable para la transferencia o integración exitosa del ADN foráneo al genoma nuclear. Ese hecho se demostró por la vía del análisis de citometría de flujo al contenido nuclear de células expuestas a *Agrobacterium tumefaciens* (Arias y col., 2006; Peña y col., 2004; Sangwan y col., 1992; Villemont y col., 1997). En este caso, como en otros relacionados, las células competentes para la transformación (células en estado de división) y regeneración (células en estado de división y

diferenciación) se encuentran en el mismo tejido calloso y pueden no ser las mismas. Por ello, para aumentar la probabilidad de transformar una célula con ambas competencias la transformación debe favorecer cuantas más células contenga el extremo cortado. Este efecto podría lograrse mediante el aumento de la concentración de células de *Agrobacterium tumefaciens*. También, una concentración óptima de células de *Agrobacterium* durante la co-cultivación podría determinar una alta sobrevivencia de las células vegetales transformadas después de la infección por la bacteria, favoreciendo un porcentaje alto de explantes transformados, como se demostró en este trabajo. Así, se encontró que la concentración de *A. tumefaciens* que compromete una frecuencia alta de transformantes oscila desde 5.25×10^8 y 2.5×10^{11} unidades formadoras de colonias por mL (Figura 14). Este rango de concentraciones permite alcanzar un 90% de explantes que muestran actividad reportera o que producen callos en medio de selección (Figura 14, Tabla 7). Otros autores aplican una alta concentración de tiamina en el medio de cultivo para contrarrestar el efecto nocivo de *Agrobacterium tumefaciens* sobre las células del tejido vegetal, y de esa manera detienen la necrosis provocada por la colonización bacteriana a una alta concentración (Cortina y Culiáñez-Maciá, 2003).

Otro factor que puede incrementar la frecuencia de transformación en los explantes co-cultivados con *Agrobacterium tumefaciens* es la utilización de las "células nodrizas" de tabaco o petunia (Hamza y Chupeau, 1993; Horsch y col., 1985; van Roekel y col., 1993). El efecto de estas células es mediado, probablemente, por la secreción de moléculas señales como la acetosiringona que inducen la virulencia de *Agrobacterium*. Aunque está descrita también, la producción por éstas de factores condicionantes que estimulan la división de algunos tipos de células que se encuentran en baja densidad (Bellincampi y Morpurgo, 1989; Horsch y Jones, 1980; Matsubayashi y col., 1997) facilitando por consiguiente, la inserción del ADN de transferencia en el genoma de la célula. No obstante, el uso de las células nodrizas puede comprometer la eficiencia de regeneración (Hamza y Chupeau, 1993) y por ende la recuperación de plantas transgénicas (Cortina y Culiáñez-Maciá, 2003). Teniendo en cuenta la capacidad proliferativa en los extremos cortados del cotiledón de Campbell 28, la estimulación de la virulencia de *A. tumefaciens* mediante la aplicación de la acetosiringona podría ser más conveniente para potenciar la eficiencia de transformación. Esta práctica demostró ser notable por su efecto potenciador si tenemos en cuenta que cuando no se aplica este compuesto no es posible detectar eventos de transformación en esta variedad (dato no mostrado). De igual manera se describió por otros investigadores un incremento de dos veces la eficiencia de transformación cuando se adicionó acetosiringona a

200 μM , en comparación con la aplicación de las células nodrizas (Culianez-Macia y Hepburn, 1988).

Como se comentó, en el caso de la variedad Campbell 28, la capacidad de proliferación celular en el extremo cortado del cotiledón es alta, sin embargo, la conversión a plantas a través de los procesos de organogénesis o embriogénesis no resultó productiva. La estimulación de los cotiledones de Campbell 28 con hormonas aplicadas en el medio de cultivo conllevó a la promoción de malformaciones en los brotes que reflejaron carencia de ápice meristemático (brotes "ciegos"), hojas individuales y brotes hiperhidratados, lo cual disminuyó la eficiencia de regeneración a una o dos plantas normales por explante regenerado (Tabla 1, Tabla 2, Tabla 3). Este fenómeno puede ser provocado precisamente por la abundante proliferación celular o la formación de callos, procesos que están correlacionados con la progresiva metilación de genes importantes involucrados en la totipotencia de la célula. Como resultado, ocurre una progresiva disminución de la capacidad de diferenciación de funciones y un desarrollo aberrante de los brotes (Lambe y col., 1997), procesos que determinan la eficiencia de regeneración en condiciones específicas de cultivo. Este hecho sugiere que las mejores condiciones para la transgénesis no tienen que ser precisamente las idóneas para la regeneración. Las plantas transgénicas se obtienen de aquellas células que son competentes tanto para la transformación como para la regeneración, y el grado de coincidencia de estas dos condiciones en una célula determinan la eficiencia del proceso de transformación (Potrykus, 1991). Considerando la capacidad proliferativa de las células en el extremo cortado del cotiledón se realizó la inducción de la regeneración previa a la infestación con *A. tumefaciens*. De esta manera, se podría esperar un aumento de la eficiencia de transformación si aumentamos la cantidad de células en estado de división (este tipo de pretratamiento ha sido aplicado mediante el uso de células nodrizas a variedades con alto y moderado potencial regenerativo (Frary y Earle, 1996; Hamza y Chupeau, 1993; Koornneef y col., 1987)). Aunque como dato preliminar se obtuvo que después del pretratamiento disminuyó el número de los cotiledones que mostraron actividad reportera en comparación con los no pretratados (Tabla 4, A y B) se realizó una evaluación de la eficiencia de transformación sometiendo los explantes a un pretratamiento. El resultado obtenido no mostró un incremento de la eficiencia de transformación. Contrario a lo esperado, ocurrió un descenso en la recuperación de transformantes de dos veces en comparación con la muestra sin pretratar, aunque la cantidad de brotes resistentes a kanamicina aumentó dos veces en ambas variantes del pretratamiento (Tabla 6). El efecto del pretratamiento se reflejó en la disminución de seis veces la eficiencia de transformación en comparación con la variante sin pretratamiento

(Tabla 6). Este resultado puede ser explicado por la secreción del compuesto denominado suberina (Davis y col., 1991b). La suberina se secreta de los tejidos heridos y conlleva a un sellado de la abertura provocada por el corte, afectando la competencia temporal del tejido expuesto a la bacteria. Al mismo tiempo, el incremento de la cantidad de brotes resistentes a kanamicina podría ser el resultado de falsos positivos o escapes, o el efecto del mosaicismo, ambos provocados por la carencia de selección en el inicio del proceso de morfogénesis.

Una vez que las condiciones óptimas de infección con *Agrobacterium tumefaciens* fueron optimizadas para Campbell 28, se estableció el antibiótico adecuado para la eliminación de la bacteria. Este tipo de agente puede influir sobre la recuperación de las plantas transgénicas, en el proceso de regeneración posterior a la infección, de manera determinante. Se analizó la actividad del claforán y la carbenicillina sobre la regeneración de cotiledones. Ambos antibióticos pertenecen al grupo de los *b*-lactámicos y portan una toxicidad mínima para la mayoría de los tejidos vegetales (Mathias y Boyd, 1986), por lo que han sido ampliamente aceptados para eliminar *A. tumefaciens* en las transformaciones. Sin embargo, los segmentos cotiledonales de Campbell 28 sembrados en medio de regeneración que contenía claforán mostraron el porcentaje más bajo de explantes que regeneraron en comparación con el medio que contenía carbenicillina o el control sin antibióticos. Aunque la cantidad de brotes normales generados de los explantes cotiledonales en medio con claforán es similar a las demás variantes, la eficiencia de regeneración resultó significativamente menor (Figura 16). En el caso de la carbenicillina no se evidenció diferencias significativas con relación a la eficiencia de regeneración y la cantidad de brotes por explante regenerado sobre el medio control sin antibióticos (Figura 16). Aunque la cantidad de brotes anormales en el medio con carbenicillina se redujo considerablemente no aumentó la eficiencia de regeneración sobre este medio.

Existen datos diversos y contradictorios acerca del efecto estimulador o inhibidor de los dos antibióticos, los cuales dependen de la especie y el proceso morfogenético bajo estudio (Lin y col., 1995; Nauerby y col., 1997; Teixeira da Silva y Fukai, 2001; Yu y col., 2001). Para ambos antibióticos se ha descrito un efecto parecido al de los reguladores del crecimiento en el cultivo de tejidos, por lo que podrían afectar la embriogénesis somática y la organogénesis en algunas especies de plantas (Lin y col., 1995; Nauerby y col., 1997). Particularmente para el claforán, se describió una actividad inhibidora sobre la formación de callos durante la regeneración de papaya y tomate (Ieam Khang y Chatchawankanphanich, 2005; Yu y col., 2001), que en cierta medida ha sido confirmado en este trabajo. Por otra parte la carbenicillina fue más efectiva que el claforán para la eliminación de la bacteria,

puesto que después de dos meses ocurrió un nuevo crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens* en los explantes cultivados en medio con claforán. Posiblemente, este crecimiento se deba a la inactivación del claforán bajo el régimen de luz diario. Como resultado, la carbenicilina se seleccionó para eliminar *A. tumefaciens* en los experimentos de transformación de Campbell 28.

Como resultado del proceso de transgénesis en el presente trabajo la eficiencia de transformación para la variedad Campbell 28 alcanzó el 14.37%, si tenemos en cuenta solamente el enraizamiento en medio de selección de los brotes normales (Tabla 7). La eficiencia de transformación obtenida está comprendida en el rango descrito para tomate, que oscila desde 6 hasta 37% (Park y col., 2003). Resulta evidente la imposibilidad de lograr una mayor eficiencia en el recobrado de transformantes a partir de esta variedad si partimos de la baja eficiencia de regeneración mostrada en las condiciones de cultivo analizadas (Tabla 1, Tabla 2, Tabla 3). No obstante, la eficiencia de transformación expresada en el número de explantes que formaron callos o que mostraron actividad del gen reportero en medio de selección fue alta, y en algunos experimentos, resultó ser máxima (Tabla 4, Tabla 7). Este hecho posibilitó la obtención de brotes transformados a pesar de la baja eficiencia de regeneración. A partir de este resultado se deriva que, aunque la eficiencia de regeneración sea baja es posible obtener plantas transgénicas si se logra una eficiencia alta en la infección-cocultivación con *Agrobacterium tumefaciens*. Este último proceso podría determinar la eficiencia en la recuperación de plantas transformadas.

Por otra parte, la cantidad de plantas resistentes a kanamicina que expresaron la actividad de un segundo gen ligado al marcador de selección (en este caso es el gen *uidA* contenido en el vector binario pCambia2301) fue sólo del 30% (Tabla 5). El otro 70% parece tener inactivado o carece de ese gen. Este fenómeno de inactivación de la actividad de uno de los dos genes ligados en el mismo ADN de transferencia se encontró en tomate por primera vez en 1987 (Chyi y Phillips, 1987), y pudiera estar asociado al silenciamiento transcripcional descrito anteriormente (ver 5.1.2), o a otros procesos que pueden conllevar a la inestabilidad genómica, como el movimiento de los transposones y la recombinación homóloga. Ambos procesos pueden ser inducidos por estrés abiótico, particularmente el cultivo *in vitro* de tejidos (Filkowski y col., 2004; Leroy y Leon, 2000).

5.2.2 Las plantas transgénicas de tomate var. Campbell 28 que producen una horquilla de ARN, a partir de la secuencia sentido y antisentido del gen *c1*, inhiben la replicación de TYLCV-[CU].

La obtención de plantas transgénicas de tomate portadoras de genes derivados de TYLCV podría constituir una vía efectiva para controlar la enfermedad del encrespamiento y

amarillamiento del tomate, y una alternativa a los programas de mejoramiento convencional. Desde el primer reporte del uso de un gen derivado de TYLCV, el de la proteína de la cápside, para prevenir la infección por este virus (Kunik y col., 1994), la proteína asociada a la replicación ha sido el blanco principal de las estrategias aplicadas con este fin. La mayoría de estas estrategias involucran las secuencias de la proteína asociada a la replicación (Rep) de forma tal que la producen de manera disfuncional. Brunetti y col. (Brunetti y col., 1997) reportaron por primera vez la obtención de plantas transgénicas de tomate resistentes a *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) a través de la expresión del gen truncado de la Rep. Estas plantas sin embargo, parecían no ser aptas para propósitos agrícolas debido a su fenotipo "encrespado", asociado a una alta acumulación del producto del transgén. En el 2004 Yang y col. (Yang y col., 2004) demostraron resistencia e inmunidad contra TYLCV en líneas transgénicas de tomate que portaron diseños génicos que contenían la secuencia del gen *c1* en sentido y antisentido. Estos autores expusieron que la resistencia en las líneas transgénicas pudiera ser el resultado del mecanismo de PTGS capaz de interferir con la transcripción de TYLCV.

En el presente trabajo se siguieron dos estrategias para inducir PTGS contra el gen *c1* de TYLCV en las plantas transgénicas de tomate. La primera, que conlleva a la formación de ARN antisentido del gen *c1*, se analizó en primera instancia en el modelo de la línea celular NT1 (ver acápite 5.1.1-5.1.3), y luego en plantas. La segunda, consistió en guiar la expresión de una horquilla de ARN a partir de la secuencia del gen *c1*. De las dos estrategias la que induce la formación de la horquilla de ARN conllevó al estado de inmunidad en el clon 126 frente a la inoculación con TYLCV (Figura 17). De un total de 10 clones transgénicos obtenidos con este diseño génico dos mostraron resistencia contra TYLCV y uno de ellos fue capaz de inhibir completamente la multiplicación del virus.

Después de demostrar preliminarmente que la estrategia para la formación del tallo de ARN con intrón era capaz de proveer resistencia contra TYLCV-[CU] en líneas de tomate transgénicas (de los clones 126 y 109) se propuso evaluar el alcance protectivo que se podría lograr, por ejemplo, en condiciones extremas de infestación con la mosca. Incluso, en estas condiciones tan desfavorables para las plantas todos los individuos de la progenie R1 del clon transgénico 126 nuevamente mostraron completa inmunidad frente a TYLCV-[CU], como se demostró por ELISA (Figura 18) e hibridación tipo *dot-blot* (Figura 19). Este resultado difiere del descrito por Noris y col. quienes aplicaron una estrategia diferente para provocar PTGS contra *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) sin lograr proteger las plantas inoculadas con este virus (Noris y col., 2004). Estos autores sugirieron la posibilidad de que este virus podría evadir el PTGS provocado por el transgén por mediación

de su propia proteína Trap (C2), la cual podría actuar como supresora del silenciamiento, acorde a las evidencias descritas para C2 de *Tomato leaf curl China virus* (TYLCCNV) (van Wezel y col., 2002). La estrategia para la formación de la horquilla de ARN desarrollada en el presente trabajo involucra 727 nucleótidos del extremo 3' del gen *c1*, el cual se solapa parcialmente con el extremo 5' del gen *c2* de TYLCV-[CU]. Como consecuencia, las plantas transgénicas que portaron esta construcción podrían estimular también PTGS contra los transcritos del gen *c2*.

El diseño para la formación de la horquilla de ARN fue propuesto por Smith y col. (Smith y col., 2000) como potencialmente útil para silenciar genes endógenos de la planta y también virales. Sobre la estructura de la horquilla con el intrón se refirió que podría incrementar la estabilidad y la eficiencia en la formación de la doble cadena de ARN que induce el proceso de PTGS. El procesamiento del intrón en el *spliceosome complex* alinea las dos cadenas de ARN complementarias (en sentido y antisentido) permitiendo la formación del tallo con mayor eficiencia. Los datos mostraron que este tipo de diseño provoca un silenciamiento en el 100% de las plantas transgénicas. De esta manera la planta podría resultar inmune contra el virus (Smith y col., 2000). Este tipo de estrategia que induce la formación del tallo de ARN con el intrón ya se empleó para la protección contra virus con genoma de ARN, en los casos de *Potato virus Y*, *Plum Pox virus* y *Barley yellow dwarf virus* (Pandolfini y col., 2003; Smith y col., 2000; Wang y col., 2000). Sin embargo, el uso de este tipo de diseño sólo se describió recientemente para generar plantas transgénicas resistentes a geminivirus u otros virus con genoma de ADN. Por ejemplo, se demostró la inhibición de la replicación del begomovirus *Vigna mungo yellow mosaic virus* en plantas de *Vigna mungo* con una construcción similar (Pooggin y Hohn, 2004). Para ello la construcción fue introducida en las hojas de la planta mediante el empleo de la biolística de manera que su efecto resultante se generó transitoriamente. En esa ocasión las plantas bombardeadas de *Vigna mungo* se recuperaron por completo de la infección. También, por mediación de una horquilla de ARN formada por las secuencias en sentido y antisentido del gen *ac1* se logró obtener una planta de frijol resistente a *Bean golden mosaic virus* (BGMV) de 18 transgénicas obtenidas con este diseño génico (Bonfim y col., 2007).

La detección de los ARNi complementarios al gen *c1* de TYLCV-[CU] en las plantas no inoculadas de los clones 109 y 126 confirma la efectividad del diseño génico para inducir el mecanismo de PTGS y, que la resistencia está asociada a este mecanismo (Figura 23). Se conoce que los ARNi son intermediarios de ese mecanismo natural de defensa, en el cual estos se disponen o forman parte del complejo de silenciamiento inducible por ARN (del

inglés *RNA-induced silencing complex* o RISC) y la proteína Argonauta (*Slicer*) que procesa el ARN diana (Baulcombe, 2004).

Con el objetivo de investigar la posible correlación entre el patrón de integración del transgén y los niveles de resistencia alcanzados en los diferentes eventos transgénicos se realizó la caracterización genómica de las líneas transformadas. El clon 126, que resultó tener una descendencia totalmente inmune, mostró un patrón de integración sencillo (una copia del transgén). Mientras, el clon 109 exhibió un patrón multicopia, lo cual pudiera ser correlacionado con el fenotipo resistente y susceptible en la progenie de este clon (Figura 22 A). La susceptibilidad en las plantas del clon 109 puede ser consecuencia de la inactivación del transgén, descrito para el caso de integración de múltiples copias, por la vía de la metilación (Matzke y Matzke, 1995). Controversialmente, el clon 100, que es susceptible, muestra un patrón de integración sencillo. Este hecho refleja la no correspondencia entre el patrón de integración del transgén y el nivel de resistencia alcanzado por el clon. Se debe señalar, sin embargo, que los dos clones con patrón de integración sencillo (100 y 126) que se comportaron diferente frente a TYLCV presentaron un sitio de integración del transgén diferente para ambos casos (Figura 22 A). En el caso de la línea 100, además, parece haber ocurrido la pérdida de la secuencia correspondiente al gen *c1* durante el proceso de transformación-integración (Figura 22 B).

Del análisis de los ARNi complementarios al gen *c1* en las líneas del clon 109 y 126 podríamos inferir diferencia en las cantidades de estas moléculas producidas en cada clon (Figura 23). Si consideramos que la línea 126 es inmune a TYLCV-[CU] este resultado puede sugerir la correlación entre la cantidad de ARNi y el nivel de resistencia. Esta observación contrasta con lo descrito por Ribeiro y Prins (revisado por Pooggin y Hohn (Pooggin y Hohn, 2004)). En este caso los autores obtuvieron plantas transgénicas de *Nicotiana benthamiana* que portaban dos construcciones para generar ARNi contra *Tomato chlorotic mosaic virus* pero no observaron correlación entre la demora en la aparición de los síntomas y los niveles de acumulación de ARNi.

Como resultado de este trabajo se demostró que la estrategia que promueve la formación de la horquilla de ARN para inducir PTGS contra la actividad replicasa de TYLCV-[CU] puede prevenir con efectividad la infección por este geminivirus. Por consiguiente, las plantas transgénicas de la variedad Campbell 28 que portaron esta estrategia resultaron inmunes frente a la infección con TYLCV-[CU] en condiciones extremas de infestación por mosca blanca.

5.2.3 Las líneas del tomate transgénico 126 no acumulan TYLCV-[CU], mientras que las variedades tolerantes o resistentes obtenidas por mejoramiento convencional muestran diferentes niveles de acumulación viral.

Se realizó una comparación del comportamiento del clon 126 y variedades resistentes o tolerantes obtenidas por la vía del mejoramiento convencional. Para ello, se escogieron variedades e híbrido comercial distinguidos por su capacidad de permanecer asintomáticos durante la infección con TYLCV. Las plantas fueron sometidas a extrema infección por TYLCV mediante el vector natural y se analizó la presencia de partículas virales y la multiplicación del virus. Como resultado, el clon 126 ratificó su inmunidad ante la inoculación con TYLCV-[CU] reflejando ninguna acumulación viral, mientras que las variedades comerciales, sin desarrollar síntoma alguno, mostraron valores de absorbancia que duplicaron y triplicaron los de las plantas no inoculadas (Figura 20). Aunque los valores obtenidos son significativamente inferiores a los reflejados en las plantas susceptibles Campbell 28 inoculadas, la infección se desarrolló en el 60% de las réplicas. A esto se adiciona la evidencia del *dot blot* sobre la replicación genómica de TYLCV-[CU] (Figura 21) lo que confirma lo descrito sobre la acumulación de TYLCV en plantas de estas características (Friedmann y col., 1998; Gómez y col., 2004).

La estrategia abordada en este trabajo tiene como ventaja adicional la ausencia de acumulados de TYLCV-[CU] en condiciones de extrema infestación en las plantas transgénicas del clon 126. Este hecho la convierte en una alternativa de menor riesgo, si tenemos en cuenta la posibilidad descrita anteriormente de aparición de nuevas cepas virales como resultado de la recombinación entre diferentes aislados virales en la misma planta (García-Andrés y col., 2006). De igual modo mediante el uso de plantas inmunes como el clon 126, podría disminuir la fuente de inóculo de TYLCV hacia variedades de tomate susceptibles, lo cual las sitúa en una posición ventajosa con respecto a las demás variedades tolerantes y resistentes descritas hasta el presente.

5.2.4 Las plantas de tomate transgénicas inmunes a TYLCV-[CU] produjeron significativamente mayor cantidad de tomates en comparación con las plantas susceptibles.

Se estima que la infección por TYLCV en plantas de tomate susceptibles ocasiona pérdidas que pueden alcanzar el 100% de la producción esperada (Lapidot y col., 1997). Para evitar esta catástrofe, la solución más atractiva desde el punto de vista económico, es el cultivo de variedades de plantas resistentes a este patógeno (Friedmann y col., 1998; Lapidot y col., 1997).

La caracterización agronómica y la evaluación del rendimiento productivo del clon 126 en condiciones de infestación por la mosca blanca ofrecen la posibilidad de demostrar la posibilidad de utilización de variedades inmunes para proteger la producción de tomate.

Por lo general, para la evaluación de la productividad en plantas de tomate inoculadas con TYLCV se han descrito metodologías que comprenden dos etapas. Primero, las plantas con determinado grado de desarrollo son infestadas con moscas blancas portadoras del virus. Luego, se eliminan las moscas y las plantas se transplantan a un campo a cielo abierto para su desarrollo posterior (Lapidot y col., 1997; Picó y col., 1999). Los protocolos para la inoculación viral varían, tanto en la edad de las plantas como en la cantidad del vector trasmisor. Por ejemplo, algunos autores inocularon plantas de tomate que contenían la primera hoja verdadera con 100 individuos de la mosca blanca durante 48 horas. Más adelante se trataron con Confidor, se cultivaron protegidas con mallas durante dos semanas y después se transplantaron a campo (Lapidot y col., 1997). En otro caso, la inoculación se efectuó cuando las plantas tenían de tres a cuatro hojas, y se expusieron a una población de 15-20 insectos por planta; aunque en este caso se conservaron las moscas que estaban prendidas de las plantas (Picó y col., 1999).

En el presente trabajo se siguió una estrategia que comprendía el desarrollo de plántulas hasta la fase de dos hojas, y su infestación con 100 individuos de mosca blanca por planta durante 30 días. Con este proceder se simulaban las condiciones extremas de infestación ensayadas previamente en este trabajo. En este marco evaluativo se demostró la superioridad del clon transgénico 126 en la producción de tomates. Como resultado constatamos que la infección por TYLCV afectó seriamente los rendimientos de las plantas susceptibles (Campbell 28 no transgénicas); y que las plantas transgénicas mostraron una producción siete veces mayor en comparación con las susceptibles (Figura 26). De igual modo la calidad de los frutos reflejada en su peso fue superior en el clon 126 con relación a las otras variedades.

En este experimento se evidenció además, que la variedad Vyta no mostró desarrollo de síntomas, y si niveles de acumulado viral entre 0.1 y 1 ng (Figura 25), descrito anteriormente por otros autores (Gómez y col., 2004) para esta variedad. La ausencia de acumulación de TYLCV-[CU] en el clon 126 demuestra claramente la ventaja de la estrategia de silenciamiento post-transcripcional dirigida contra el gen *c1*, que inhibió el proceso de replicación de TYLCV-[CU] en su totalidad. De esta manera se evita el papel de reservorio de virus y la generación de nuevos agentes virales por mediación de la recombinación o pseudo-recombinación con otras moléculas de origen viral.

Se puede aseverar que, mediante el silenciamiento del gen *c1*, inducido por la formación de una horquilla de ARN, las plantas transgénicas de tomate del clon 126 lograron una producción de tomates significativamente superior a la variedad susceptible en el transcurso de cuatro meses de evaluación, sin manifestar síntomas de la infección ni acumulación viral. En adición, los picos productivos del clon 126 y la variedad Campbell 28 no transgénica coincidieron en el período evaluado, lo cual refleja similitud en cuanto al comportamiento de las plantas con el mismo origen varietal (Figura 27).

5.3 El gen *bar*- una alternativa al gen *nptII* como marcador de selección en la transformación de tomate. Obtención de plantas de tomate inmunes a TYLCV que portan el gen de resistencia al herbicida Basta.

La incorporación de los genes de resistencia a antibióticos como marcadores de selección en las plantas genéticamente modificadas se practica desde los mismos inicios del desarrollo de la tecnología de la transformación genética de plantas. El desarrollo del transformante en las condiciones de selección se favorece cuando las células no transgénicas son asesinadas mediante la acción del antibiótico mientras que las células que contienen el gen de resistencia a este sobreviven, y de esta manera, son fácilmente identificables. El gen *nptII* que confiere resistencia a la kanamicina y geneticina se convirtió en el marcador más ampliamente empleado en la transgénesis de tomate, para lo cual existe una amplia representación de vectores plasmídicos de transformación comerciales que lo contienen. Esta práctica posibilitó en el presente proyecto la obtención de varios eventos transgénicos a partir de tejidos donde la proporción entre células transformadas y no transformadas favorecía las últimas.

Para el manejo de las plantas transgénicas existen regulaciones establecidas por los diferentes comitees regionales sobre bases de bioseguridad y el principio de la precaución debido al desconocimiento de los efectos de estas sobre el hombre y el medio ambiente ((Gay y Gillespie, 2005); <http://www.biosafety.be/gmcropff/EN/TP/AuthorisationsEU.html>). Particularmente, en la Unión Europea existe un gran debate sobre el riesgo en el uso de los organismos que portan genes de resistencia a antibióticos (Gay y Gillespie, 2005). Aunque se ha demostrado por varias sociedades científicas la inocuidad de estas plantas (Bennett y col., 2004; Gay, 2001) no hay una posición única para la aceptación de los productos derivados de las plantas transgénicas que portan genes de resistencia a antibióticos.

En Cuba no se han establecido todavía las normas que deben regir la utilización de los OGM que contienen como marcador de selección genes de resistencia a antibióticos. Si se ha establecido una guía para la evaluación y gestión de riesgos para las plantas que contienen genes de resistencia a herbicidas como marcador de selección en primera aplicación

(LaRosaPeraza y col., 2006). Esta situación conllevó en el presente proyecto a la consideración de la factibilidad de desarrollar plantas inmunes a TYLCV utilizando como marcador de selección el gen que confiere resistencia al glufosinato de amonio (análogo del componente activo del herbicida Basta o Finalé, Bayer corp.). Esto permitiría tener plantas resistentes al herbicida de amplio espectro Finalé además del carácter de inmunidad contra TYLCV, lo que pudiera resultar de interés para los productores de tomate.

5.3.1 Obtención de plantas de tomate transgénicas que portan la construcción hpc1-Basta mediante la selección de los transformantes en glufosinato de amonio.

Para la obtención de plantas de tomate transgénicas utilizando como marcador de selección el gen *bar* se aplicó la misma metodología de transformación de Campbell 28 optimizada en el presente trabajo. Como consecuencia de la selección de transformantes en glufosinato de amonio la eficiencia de transformación resultó dos veces superior en comparación con la selección en kanamicina (Tabla 7, Tabla 8). En este caso, la capacidad de selección del glufosinato de amonio parece afectar en menor grado los explantes cotiledonales y contribuye al recobrado de plantas transgénicas de tomate. De hecho, de los promedios de plantas enraizadas en medio que contenía glufosinato de amonio concluimos que la eficiencia de transformación alcanzó el 33.24%, teniendo en cuenta solamente la producción de brotes normales. La eficiencia lograda es dos veces superior a la obtenida en medio con kanamicina para brotes normales (33.24% vs 14.37%). Más aún, se obtuvo un brote transformado por cada 8 explantes infectados con *Agrobacterium*, lo cual es dos veces superior en comparación con la selección en kanamicina (Tabla 7, Tabla 8). Este resultado pudiera ser explicado por la contribución del glufosinato de amonio a la eficiencia de regeneración de los explantes cotiledonales. En realidad, la capacidad de diferentes sustancias con propiedades herbicidas, que promueven los procesos morfogénicos cuando son aplicados en concentraciones subletales, se describió con anterioridad para diferentes especies de plantas (Gallo-Meagher y col., 2000; Jiménez, 2005; Rakoczy-Trojanowska, 2002; Sivamani y col., 1996). Para el caso particular de la fosfotricina (análogo del glufosinato de amonio), componente activo del Basta, se le atribuyó un efecto de citoquinina- estimulador de la diferenciación de brotes y como consecuencia, de la regeneración de plantas (Hoshino y Mii, 1998; Toldi y col., 2000).

Como resultado, el aumento de la eficiencia de transformación de la variedad de tomate Campbell 28 en condiciones de selección con glufosinato de amonio puede explicarse por el aumento de la eficiencia de regeneración, lo cual confirma lo planteados en el acápite 5.2.1. Entonces se planteó la imposibilidad de aumentar la eficiencia en el recobrado de plantas

transgénicas en las condiciones de selección con kanamicina, si se mantenía la misma eficiencia de regeneración alcanzada para Campbell 28.

5.3.2 Las plantas de tomate var. Campbell 28, transformadas con *hpc1*-Basta, inhiben la replicación de TYLCV-[CU].

Después de seleccionar un clon resistente a glufosinato de amonio (clon B1), asintomático en condiciones naturales de inoculación con mosca blanca, se colectaron las semillas de los frutos de este y las plantas germinadas de ellas se inocularon con TYLCV en las mismas condiciones descritas anteriormente para las líneas R1 y R2 resistentes a kanamicina (ver capítulo Materiales y Metodologías). Como resultado, se demostró la inhibición de la replicación de TYLCV en las plantas inoculadas (Figura 28). Más de la tercera parte de las líneas evaluadas mostró ninguna presencia del genoma de TYLCV según la evidencia del ensayo *dot blot* (Figura 28), lo cual demuestra la cualidad de inmunidad de estas líneas frente a la infección por TYLCV. Podemos concluir que el clon B1, resistente a glufosinato de amonio, es inmune frente a TYLCV igual que el clon 126 resistente a kanamicina.

5.3.3 Las plantas derivadas del clon B1 poseen dos copias del transgén y producen ARNi específico del gen *c1*.

El análisis de los resultados del ensayo *Southern blot* reflejó que el clon B1 contiene dos copias del transgén (Figura 29). Este patrón de integración es diferente a lo obtenido en el clon 126 (una copia del transgén) (Figura 22), lo cual refleja dos patrones diferentes de integración con la misma capacidad de resistencia frente a TYLCV.

5.3.3.1 El mecanismo de producción de ARNi, específico del gen *c1*, en los clones B1 y 126 parece ser el mismo.

Como resultado del ensayo *Northern blot* sobre la fracción de ARN de pequeño tamaño obtenido del clon B1 se demostró que los ARNi específicos del gen *c1* producidos por este clon son del mismo tamaño en comparación con los ARNi derivados del clon 126 (Figura 30). En este resultado se refleja la similitud del mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional en ambos clones, inducido por el diseño *hpc1* para la producción de transcritos de doble cadena.

Sobre la base de las evidencias expuestas anteriormente podemos asegurar que contamos con dos clones de tomate transgénicos de la variedad Campbell 28 inmunes a TYLCV. Además, uno de estos clones es resistente a glufosinato de amonio. Esta característica adicional podría beneficiar no solo a los productores de tomate mediante la aplicación del herbicida Basta a las plantaciones de tomate transgénico, sino también, al mejorador con una herramienta de selección eficiente del carácter de inmunidad.

Desde el aspecto de bioseguridad y las regulaciones establecidas en nuestro país con relación al uso de los transgénicos el clon B1 podría considerarse un paso de avance en el proceso de introducción de una variedad de tomate inmune a TYLCV en la agricultura de nuestro país.

6 CONCLUSIONES

1. La producción de ARNi a partir de una estructura de ARN en horquilla de la secuencia de gen *c1* induce el silenciamiento génico post-transcripcional del gen *c1* e inhibe la replicación de TYLCV, provocando la inmunidad a TYLCV-[CU] en plantas transgénicas de tomate.
2. Las plantas transgénicas de tomate del clon resistente a glufosinato de amonio (B1), que producen ARNi específico del gen *c1* son inmunes a TYLCV-[CU].
3. La producción de ARNi específico del gen *c1* en los clones 126 y B1 ocurre a través de un mecanismo similar de silenciamiento génico post-transcripcional.
4. Las plantas transgénicas de tomate del clon 126 inmunes a TYLCV-[CU] mostraron una preservación de la producción de tomate en condiciones de infección con TYLCV-[CU] en parcela experimental.
5. La producción de ARNi específico de *c1*, inducida por la expresión del gen *c1* en antisentido, provoca la inhibición de la replicación de TYLCV-[CU] transfectado en células transgénicas de la línea NT1.
6. Las células de la línea NT1 de tabaco constituyen un modelo biológico adecuado para el análisis de la replicación viral de TYLCV-[CU] *in vitro*.
7. La eficiencia de regeneración obtenida para los cotiledones de la variedad de tomate Campbell 28 determinó una eficiencia de transformación de 14.37% en condiciones optimizadas de infección con *Agrobacterium tumefaciens*.
8. La eficiencia de transformación de tomate variedad Campbell 28 en condiciones de selección con glufosinato de amonio es dos veces superior en comparación con la obtenida en kanamicina, 33.24% vs 14.37%.

7 RECOMENDACIONES.

1. Evaluar la estabilidad de los clones 126 y B1 con relación a su inmunidad contra TYLCV-[CU] en sucesivas generaciones y en otras condiciones experimentales. Obtener una línea homocigótica para el evento transgénico a partir del clon 126 y a partir del clon B1.
2. Evaluar las características agronómicas de los clones 126 y B1 en condiciones de campo.
3. Evaluar los riesgos para el medio ambiente y la salud humana de la introducción en la producción de una variedad de tomate derivada del clon 126 y del clon B1.
4. Realizar los ensayos necesarios para el registro de los eventos transgénicos "B1" y "126".

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abou Jawdah Y, Soubra K, Maalouf R, y Sebaro W** (1996) Reaction of tomato genotypes to infection by Tomato yellow leaf curl geminivirus in Lebanon. *Phytopathology* **86** 71.
- Abouzid AM, Frischmuth T, y Jeske H** (1988) A putative replicative form of the AbMV (geminivirus group) in chromatin-like structure. *Mol.Gen.Genet.* **212** 252-258.
- Accotto GP, Mullineaux PM, Brown SC, y Marie D** (1993) Digitaria streak geminivirus replicative forms are abundant in S-phase nuclei of infected cells. *Virology* **195** (1): 257-259.
- Ahlquist P** (2002) RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science* **296** 1270-1273.
- Alvarez M, Rodríguez J, Plana D, y Santana N** (1999) Radiosensibilidad a rayos gamma ^{60}Co en callos de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) variedad Amalia. *Cultivos Tropicales* **20** (4): 35-39.
- Alvarez PA** (1995) Reporte de República Dominicana. CEIBA 36, 39-47
Ref Type: Generic
- An G, Watson B, y Chiang C** (1986) Transformation of tobacco, tomato, potato and *Arabidopsis thaliana* using a binary Ti vector system. *Plant Physiol* **81** 301-305.
- Anandalakshmi R, Pruss G, Ge X, Marathe R, y Mallory A** (1998) A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95** 13079-13084.
- Angell S y Baulcombe D** (1997) Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. *EMBO J* **16** 3675-3684.
- Antignus Y y et al.** (2000) Manipulation of wavelength-dependent behaviour of insects: an IPM tool to impede insects and restrict epidemics of insect-borne viruses. *Virus Res.* **70** 1-2.
- Antignus Y, Lapidot M, Hadar D, Messika Y, y Cohen S** (1998) Ultraviolet-absorbing screens serve as optical barriers to protect crops from virus and insect pests. *J.Econ.Entomol.* **91** 1401-1405.
- Antignus Y, Mor N, Joseph RB, Lapidot M, y Cohen S** (1996) Ultraviolet-absorbing plastic sheets protect crops from insect pests and from virus diseases vectored by insects. *Environ.Entomol.* **25** 919-924.
- Antignus Y, Vunsh R, Lachman O, Pearlsman M, Maslenis L, Hananya U, y Rosner A** (2004) Truncated Rep gene originated from *Tomato yellow leaf curl virus-Israel* [Mild] confers strain-specific resistance in transgenic tomato. *Ann.Appl.Biol.* **144** (1): 39-44.

Anupam V. (2003) Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. Malathi, V. G. *Ann.Appl.Biol.* 142
Ref Type: Generic

Aragao F, Ribeiro S, Barros L, Brasileiro A, Maxwell D, Rech E, y Faria J (1998) Transgenic beans (*Phaseolus vulgaris* L.) engineered to express viral antisense RNAs show delayed and attenuated symptoms to bean golden mosaic geminivirus. *Molecular Breeding* 4 491-499.

Aravin A y Tuschl T (2005) Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing. *FEBS Lett.* 579 5830-5840.

Arguello-Astorga G, Lopez-Ochoa L, Kong LJ, Orozco BM, Settlege SB, y Hanley-Bowdoin L (2004) A novel motif in geminivirus replication proteins interacts with the plant retinoblastoma-related protein. *J.Virol.* 78 (9): 4817-4826.

Arguello-Astorga GR, Guevara-Gonzalez RG, Herrera-Estrella LR, y Rivera-Bustamante RF (1994) Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: a model for replication. *Virology* 203 (1): 90-100.

Arguello-Astorga GR y Ruiz-Medrano R (2001) An iteron-related domain is associated to Motif 1 in the replication proteins of geminiviruses: identification of potential interacting amino acid-base pairs by a comparative approach. *Arch.Virol.* 146 (8): 1465-1485.

Arias R, Filichkin S, y Strauss S (2006) Divide and conquer: development and cell cycle genes in plant transformation. *Trends in Biotechnology* 24 (6): 267-273.

Arnal E, Debrot E, Cermali M, Ramos F, y Rondón A (1991) La Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*) en Venezuela. FONAIAP DIVULGA (37)
Ref Type: Magazine Article

Arsenio AF (2001) Control of the complex Bemisia Tabaci/ Tomato Yellow-Leaf Curl Virus on Protected Tomato Crops in Algarve. EPPO Workshop on Tomato Yellow Leaf Curl Begomovirus (TYLCV).
Ref Type: Report

Astier S, Albouy J, Maury Y, y Lecoq H (2001) In: Principes de Virologie Végétale. 444INRA, Paris.
Ref Type: Serial (Book,Monograph)

Aufzats W, Mette MF, van der W, Matzke AJ, y Matzke M (2002) RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99 16499-16506.

Azzam O, Frazer J, de la RD, Beaver JS, Ahlquist P, y Maxwell DP (1994) Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. *Virology* 204 (1): 289-296.

Barg R, Pilowsky M, Shabtai S, Carmi M, Szechtman AD, Dedicova B, y Salts Y (1997) The TYLCV- tolerant tomato line MP-1 is characterized by superior transformation competence. *Journal of Experimental Botany* 48 (316): 1919-1923.

- Baulcombe D** (2004) RNA silencing in plants. *Nature* **431** 356-363.
- Baulcombe D** (1999a) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr.Opin.Plant Biol.* **2** 109-113.
- Baulcombe D** (1999b) Viruses and gene silencing in plants. *Arch Virol Suppl* **15** 189-201.
- Baulcombe D** (1996) Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *The Plant Cell* **8** 1833-1844.
- Beachy RN** (1997) Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Curr.Opin.Biotechnol.* **8** (2): 215-220.
- Bejarano ER y Lichtenstein CP** (1994) Expression of TGMV antisense RNA in transgenic tobacco inhibits replication of BCTV but not ACMV geminiviruses. *Plant Mol.Biol.* **24** (1): 241-248.
- Bellincampi D y Morpurgo G** (1989) Evidence for the presence of a second conditioning factor in plant cell cultures. *Plant Science* **65** 125-130.
- Bendahmane M y Gronenborn B** (1997) Engineering resistance against tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) using antisense RNA. *Plant Mol.Biol.* **33** (2): 351-357.
- Bender J** (2004) DNA methylation and epigenetics. *Annu.Rev.Plant Biol.* **55** 41-68.
- Bennett P, Livesey C, Nathwani D, Reeves D, Saunders J, y Wise R** (2004) An assessment of the risks associated with the use of antibiotic resistance genes in genetically modified plants: report of the Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. *J Antimicrob Chemother* **53** 418-431.
- Bird A y Wolffe A** (1999) Methylatio-induced repression- belts, braces, and chromatin. *Cell* **99** 451-454.
- Bird C, Smith C, Ray J, Moureau P, Bevan M, Birds A, Hughes S, Morris P, Grierson D, y Schuch W** (1988) The tomato polygalacturonase gene and ripening specific expression in transgenic plants. *Plant Mol.Biol.* **11** 651-662.
- Birnboim HC y Doly J** (1979) A rapid alkaline extration procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7** 1513-1515.
- Blair M y Beaver J** (1993) Inheritance of bean golden mosaic resistance from bean genotype A429. *Ann Rept Bean Improv Coop* **36** 143.
- Bochardt A, Hodal L, Palmgren G, Mattsson O, y Okkels F** (1992) DNA methylation is involved in maintenance of an unusual expression pattern of an introduced gene. *Plant Physiol* **99** 409-414.
- Bock KR, Guthrie EJ, y Woods RD** (1974) Purification of maize streak virus and its relationship to viruses associated with streak diseases of sugar cane and *Panicum maximum*. *Annual Applied Biology* **77** 289-296.

- Bonfim K, Faria J, Nogueira E, Mendes E, y Aragao F** (2007) RNAi-mediated resistance to *Bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Mol Plant-Microbe Interact* **20** (6): 717-726.
- Borgstrom B y Johansen I** (2001) Mutations in pea seedborne mosaic virus genome-linked protein VPg after pathotype-specific virulence in *Pisum sativum*. *Mol Plant-Microbe Interact* **14** 707-714.
- Briddon RW, Pinner MS, Stanley J, y Markham PG** (1990) Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* **177** (1): 85-94.
- Brigneti G, Voinnet O, Li WX, Ji LH, Ding SW, y Baulcombe DC** (1998) Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* **17** (22): 6739-6746.
- Brommonschenkel S, Frary A, y Tanksley S** (2000) The broad-spectrum tospovirus resistance gene *Sw-5* of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene *Mi*. *Mol Plant-Microbe Interact* **13** 1130-1138.
- Brough C, Hayes R, Morgan A, Coutts R, y Buck K** (1988) Effects of mutagenesis in vitro on the ability of cloned tomato golden mosaic virus DNA to infect *Nicotiana benthamiana* plants. *J.Gen.Virol.* **69** 503-514.
- Brown JK** (2000) Molecular markers for the identification and global tracking of whitefly vector-Begomovirus complexes. *Virus Res.* **71** (1-2): 233-260.
- Brunetti A, Tavazza M, Noris E, Tavazza R, Caciagli P, Ancora G, Crespi S, y Accotto GP** (1997) High expression of truncated viral Rep protein confers resistance to tomato yellow leaf curl virus in transgenic tomato plants. *Mol.Plant Microbe Interact.* **10** 571-579.
- Brunt A, Crabtree K, Dallwitz M, Gibbs A, y Watson L** (1996) *Viruses of Plants*. CAB International (eds). Wallingford.
- Bullock WO, Fernandez JM, y Short JM** (1987) XL1-Blue, high efficiency plasmid transforming *recA Echericia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5** 376-378.
- Byoung-Cheorl K, Inhwa Y, y Molly M** (2005) Genetics of plant virus resistance. *Annu.Rev.Phytopathol.* **43** 581-621.
- Caciagli P, Bosco D, y Al-Bitar L** (2000) Relationships of the Sardinian isolate of tomato yellow leaf curl geminivirus with its whitefly vector *Bemisia tabaci*. *Gen.Eur.J.Plant Pathol.* **101** 163-170.
- Cahill M, Gorman K, Day S, Denholm J, Elbert A, y Naven R** (1996) Baseline determination and detection of resistance to imidacloprid in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Bull.Entomol.Res.* **86** 343-349.
- Caranta C, Palloix A, Lefebvre V, y Daubéze A** (1997) QTLs for a component of partial resistance to cucumber mosaic virus in pepper: restriction of virus installation in host-cells. *Theor.Appl.Genet.* **94** 431-438.

- Carrington J, Kassachau KD, Mahajan SK, y Shaad MC** (1996) Cell-to-cell and long-distance movement transport of viruses in plants. *Plant Cell* **8** 1669-1681.
- Channarayappa A y Shivashankar G** (1992) Resistance of *Lycopersicon* species to *Bemisia tabaci*, a tomato leaf curl virus vector. *Can.J.Bot.* **70** 2184-2192.
- Chatterji A, Beachy RN, y Fauquet CM** (2001) Expression of the oligomerization domain of the replication-associated protein (Rep) of Tomato leaf curl New Delhi virus interferes with DNA accumulation of heterologous geminiviruses. *J.Biol.Chem.* **276** (27): 25631-25638.
- Chen Y y Dribnenki P** (2004) Effect of medium osmotic potential on callus induction and shoot regeneration in flax anther culture. *Plant Cell Rep.* **23** 272-276.
- Cheung P y Lau P** (2005) Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. *Mol.Endocrinol.* **19** 563-573.
- Chiang B, Maxwell DP, y Green S** (1984) Leaf curl virus in Taiwan. *Tomato leaf curl Newsletter* **5** 3.
- Chyi Y y Phillips G** (1987) High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lycopersicon* based on conditions favorable for regeneration. *Plant Cell Rep.* **6** 105-108.
- Coego A, Vázquez R, Alfonso R, Coll Y, Pujol M, Ménendez E, López M, Molina P, Hernández L, Bencomo B, de la Riva G, y Selman-Housein G** (1996) Effect of promoter-stimulatory element combination on transient reporter gene expression in tobacco protoplast using PEG-treatment. *Biotechnología Aplicada* **13** (2): 147.
- Cooper B, Lapidot M, Heick JA, Dodds JA, y Beachy RN** (1995) A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility. *Virology* **206** (1): 307-313.
- Cordero M, Ramos PL, Hernandez L, Fernandez AI, Echemedia AL, Peral R, Gonzalez G, Garcia D, Valdes S, Estevez A, y Hernandez K** (2003) Identification of *Tomato mottle Taino begomovirus* strains in Cuban potato fields. *Phytoparasitica* **31** (5): 478-489.
- Cortina C y Culiáñez-Maciá F** (2003) Tomato transformation and transgenic plant production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **9** (23): 1-7.
- Cours-Darne G** (1968) Improving cassava in Africa. The Abidjan Conference: Agricultural Research Priorities for Economic Development in Africa. *U.S.Natl.Acad.Sci* **2** 330-339.
- Covey S, Al-Kaff N, Langara A, y Turner D** (1997) Plants combat infection by gene silencing. *Nature* **385** 781-782.
- Culianez-Macia F y Hepburn A** (1988) The kinetics of T-strand production in a nopaline-type helper strain of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Plant-Microbe Interact* **5** 207-214.

- Czosnek H, Ber R, Navot N, Antignus Y, Cohen Y, y Zamir D** (1989) Tomato yellow leaf curl virus DNA forms in the viral capsid, in infected plants and in the insect vector. *J. Phytopathology* **125** 47-54.
- Czosnek H y Laterrot H** (1997) A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses. *Arch. Virol.* **142** (7): 1391-1406.
- Dalmay T** (2000) An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* **101** 543-553.
- Dangl J y Jones J** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411** 826-833.
- Davis M, Lineberger D, y Miller R** (1991a) Effects of tomato cultivar, leaf age, and bacterial strain on transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **24** 115-121.
- Davis M, Miller A, y Lineberger R** (1991b) Temporal competence for transformation of *Lycopersicon esculentum* (L. Mill.) cotyledons by *Agrobacterium tumefaciens*: relation to wound-healing and soluble plant factors. *J Exp Bot* **42** 359-364.
- Day AG, Bejarano ER, Buck KW, Burrell M, y Lichtenstein CP** (1991) Expression of an antisense viral gene in transgenic tobacco confers resistance to the DNA virus tomato golden mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **88** (15): 6721-6725.
- De Barro PJ** (1995) *Bemisia tabaci* biotype B: A review of its biology, distribution and control. CSIRO (eds). Canberra, Australia.
- de Jager S, Maughan S, Dewitte W, Scofield S, y Murray A** (2005) The developmental context of cell-cycle control in plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **16** 385-396.
- Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, y Leemans J** (1985) Efficient octopine Ti plasmid vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* **13** 4777-4788.
- Dellaporta S, Wood J, y Hicks JB** (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol.* **1** 19-21.
- Dillon N** (2004) Heterochromatin structure and function. *Biol. Cell.* **96** 631-637.
- Domínguez M, Ramos PL, Echemedia AL, Peral R, Crespo J, Andino V, Pujol M, y Borroto C** (2002) Molecular Characterization of Tobacco leaf rugose virus, a New Begomovirus Infecting Tobacco in Cuba. *Plant Dis.* **86** (9): 1050.
- Dorsett Y y Tuschl T** (2004) siRNAs: Applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nature* **3** 318-328.
- Downward J** (2004) RNA interference. *BMJ* **328** 1245-1248.

Drake J y Holland J (1999) Mutation rates among RNA viruses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96** 13910-13913.

Duan YP, Powell CA, Purcifull DE, Broglio P, y Hiebert E (1997) Phenotypic variation in transgenic tobacco expressing mutated geminivirus movement/pathogenicity (BC1) proteins. *Mol.Plant Microbe Interact.* **10** (9): 1065-1074.

Dunoyer P, Lecellier C, Parizotto E, Himber C, y Voinnet O (2004) Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell* **16** (5): 1235-1250.

Eagle PA, Orozco BM, y Hanley-Bowdoin L (1994) A DNA sequence required for geminivirus replication also mediates transcriptional regulation. *Plant Cell* **6** (8): 1157-1170.

Echemendía AL, Ramos PL, Díaz L, Fuentes A, Pujol M, y González G (2004) First report of *Sida golden yellow vein virus* infecting *Sida* species in Cuba. *Plant Pathology* **53** (2): 234.

Echemendía AL, Ramos PL, Peral R, Fuentes A, Gonzalez G, Sanpedro J, y Morales FJ (2001) Cuban isolate of Bean golden yellow mosaic virus is a member of the Mesomaerican BGYMV group. *Plant Dis.* **85** (9): 1030.

Echemendía AL, Ramos PL, Peral R, Fuentes A, Pujol M, y Gonzalez G (2003) First report of *Dicliptera yellow mottle virus* (DiYMoV) infecting *Dicliptera vahliana* in Cuba. *Plant Pathology* **52** 787.

Ecker J y Davis R (1986) Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **83** 5372-5376.

Egelkrout EM, Robertson D, y Hanley-Bowdoin L (2001) Proliferating cell nuclear antigen transcription is repressed through an E2F consensus element and activated by geminivirus infection in mature leaves. *Plant Cell* **13** (6): 1437-1452.

Ellul P, García-Sogo B, Pineda B, Ríos G, Roig LA, y Moreno V (2003) The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.) is genotype and procedure dependent. *Theor.Appl.Genet.* **106** 231-238.

Elmer JS, Brand L, Sunter G, Gardiner WE, Bisaro DM, y Rogers SG (1988) Genetic analysis of the tomato golden mosaic virus. II. The product of the AL1 coding sequence is required for replication. *Nucleic Acids Res.* **16** (14B): 7043-7060.

Emani C, Sunilkumar G, y Rathore K (2002) Transgene silencing and reactivation in sorghum. *Plant Science* **162** 181-182.

Fauquet CM, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Harrison BD, Rybicki EP, Stenger DC, y Stanley J (2003) Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and an updated list of begomovirus species. *Arch.Virol.* **148** (2): 405-421.

Fauquet CM, Maxwell DP, Gronenborn B, y Stanley J (2000) Revised proposal for naming geminiviruses. *Arch.Virol.* **145** (8): 1743-1761.

Fauquet C y Stanley J (2005) Revising the way we conceive and name viruses below the species level: A review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. *Arch Virol* **150** 2151-2179.

Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, y Staus SE (1996) *Virology*. Lippincott-Raven Publishers (eds). Philadelphia.

Filkowski J, Yeoman A, Kovalchuk O, y Kovalchuk I (2004) Systemic plant signal triggers genome instability. *The Plant Journal* **38** 1-11.

Fillatti J, Kiser J, Rose B, y Comai L (1987a) Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *Bio/Technology* **5** 726-730.

Fillatti J, Kiser J, Rose B, y Comai L (1987b). Efficient transformation of tomato and the introduction and expression of a gene for herbicide tolerance. En *Tomato Biotechnology* (D. Nevins and R. Jones, Eds.), pp. 199-210. Alan,R. Liss,Inc., New York.

Finer JJ, Vain P, Jones MW, y McMullen MD (1992) Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Report* **11** 323-328.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, y Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391** (6669): 806-811.

Fontes EP, Eagle PA, Sipe PS, Luckow VA, y Hanley-Bowdoin L (1994a) Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *J.Biol.Chem.* **269** (11): 8459-8465.

Fontes EP, Gladfelter HJ, Schaffer RL, Petty IT, y Hanley-Bowdoin L (1994b) Geminivirus replication origins have a modular organization. *Plant Cell* **6** (3): 405-416.

Frankerberger E, Hasegawa P, y Tigchelaar E (1981) Influence of environmental and developmental state on the shoot forming capacity of tomato genotypes. *Z Pflawzenphysiol* **102** 221-232.

Franki RIB, Hatta T, Boccardo G, y Randless JW (1980) The composition of chloris striate mosaic virus, a geminivirus. *Virology* **101** 233.

Frary A y Earle ED (1996) An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. *Plant Cell Reports* **16** 235-240.

Fraser RSS (1990) The genetics of resistance to plant viruses. *Annu.Rev Phytopathol.* **28** 179-200.

Fraser RSS (1992) The genetics of plant-virus interactions: implications for plant breeding. *Euphytica* **63** 175-185.

- Friedmann M, Lapidot M, Cohen S, y Pilowsky M** (1998) A novel source of resistance to Tomato Yellow Leaf Curl Virus exhibiting a symptomless reaction to viral Infection. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **123** (6): 1004-1007.
- Frischmuth T y Stanley J** (1994) Beet curly top virus symptom amelioration in *Nicotiana benthamiana* transformed with a naturally occurring viral subgenomic DNA. *Virology* **200** (2): 826-830.
- Fuentes A, Ramos P, Ayra C, Rodríguez M, Ramírez N, y Pujol M** (2004) Development of a highly efficient system for assessing recombinant gene expression in plant cell suspensions via *Agrobacterium tumefaciens* transformation. *Biotechnol.Appl.Biochem.* **39** 355-361.
- Gadani F, Mansky L, Medici R, Miller W, y Hill J** (1990) Genetic engineering of plants for virus resistance. *Arch Virol* **115** 1-21.
- Gafni Y y Epel BL** (2002) The role of host and viral proteins in intra- and inter-cellular trafficking of geminiviruses. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **60** 231-241.
- Gallo-Meagher M, English R, y Abouzid A** (2000) Thidiazuron stimulates shoot regeneration of sugarcane embryogenic callus. *In Vitro Cell Dev Biol* **36** (1): 37-40.
- García-Andrés S, Monci F, Navas-Castillo J, y Moriones E** (2006) Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. *Virology in press*.
- Garrido-Ramírez ER, Sudarshana MR, y Gilbertson RL** (2000) *Bean golden yellow mosaic virus* from Chiapas, Mexico: Characterization, pseudorecombination with others bean-infecting geminiviruses and germ plas screening. *Phytopathology* **90** (11): 1224-1232.
- Gay P** (2001). The biosafety of antibiotic resistance markers in plant transformation and the dissemination of genes through horizontal gene flow. En Safety of genetic engineered crops Gent:VIB publications.
- Gay P y Gillespie S** (2005) Antibiotic resistance markers in genetically modified plants: a risk to human health. *Lancet Infect Dis* **5** 637-646.
- Ghanim M y Czosnek H** (2000) Tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV-Is) is transmitted among whiteflies (*Bemisia tabaci*) in a sex-related manner. *J.Virol.* **74** (10): 4738-4745.
- Ghanim M, Morin S, Zeidan M, y Czosnek H** (1998) Evidence for transovarial transmission of tomato yellow leaf curl virus by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Virology* **240** (2): 295-303.
- Gianessi L** (2003) Plant Biotechnology-Potential Impact for Improving Pest Management in European Agriculture. Tomato-Virus-Resistant Case Study. Sankula, S. and Reigner, N. 1-10NCFAP. National Center for Food and Agricultural Policy.
Ref Type: Generic

- Goldbach R, Bucher E, y Prins M** (2003) Resistance mechanisms to plant viruses: an overview. *Virus Res* **92** 207-212.
- Gómez O, Piñon M, Martínez Y, Quinones M, Fonseca D, y Laterrot H** (2004) Breeding for resistance to begomovirus in tropic-adapted tomato genotypes. *Plant Breeding* **123** 275-279.
- Goodman RM** (1977) Infectious DNA from a whitefly-transmitted virus of *Phaseolus vulgaris*. *Nature* **266** 54-55.
- Grafi G, Burnett RJ, Helentjaris T, Larkins BA, DeCaprio JA, Sellers WR, y Kaelin WG, Jr.** (1996) A maize cDNA encoding a member of the retinoblastoma protein family: involvement in endoreduplication. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93** (17): 8962-8967.
- Gray SM, Moyer JW, Kennedy GG, y Campbell LC** (1986) Virus suppression and aphid resistance effects on spatial and temporal spread of watermelon mosaic virus 2. *Phytopathology* **76** 1254-1259.
- Grimsley N, Hohn T, y Davis J** (1987) *Agrobacterium*-mediated delivery of infectious maize streak virus into maize plants. *Nature* **325** 177.
- Gutierrez C** (2000a) DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *EMBO J.* **19** (5): 792-799.
- Gutierrez C** (2000b) Geminiviruses and the plant cell cycle. *Plant Mol.Biol.* **43** (5-6): 763-772.
- Gutierrez C, Ramirez-Parra E, Mar CM, Sanz-Burgos AP, Luque A, y Missich R** (2004) Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. *Vet.Microbiol.* **98** (2): 111-119.
- Hammond S** (2005) Dicing and Slicing The core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett.* **579** 5822-5829.
- Hamza S y Chupeau Y** (1993) Re-evaluation of conditions for plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of Experimental Botany* **44** (269): 1837-1845.
- Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Echericia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* **166** (4): 557-580.
- Hanley-Bowdoin L, Settlage SB, Orozco BM, Nagar S, y Robertson D** (2000) Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit Rev Biochem.Mol.Biol.* **35** (2): 105-140.
- Hannon GJ** (2002) RNA interference. *Nature* **6894** 244-251.
- Hanson SF, Hoogstraten RA, Ahlquist P, Gilbertson RL, Russell DR, y Maxwell DP** (1995) Mutational analysis of a putative NTP-binding domain in the replication-associated protein (AC1) of bean golden mosaic geminivirus. *Virology* **211** (1): 1-9.

- Harrison B y Robinson D** (1999) Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (begomoviruses). *Annu.Rev.Phytopathol.* **37** 369-398.
- Harrison BD, Barker H, Bock KR, Guthrie EJ, Meredith G, y Atkinson M** (1977) Plant viruses with circular single-stranded DNA. *Nature* **266** 54.
- Harrison BD** (2002) Virus variation in relation to resistance-breaking in plants. *Euphytica* **124** 181-192.
- Hatta T y Franki RIB** (1979) The fine structure of chloris striate mosaic virus. *Virology* **92** 428.
- Herrera L, Guerra O, Ramos PL, Peral R, Echemendia AL, Ramírez N, Dorestes V, y Oramas P** (1999) Techniques for detection of Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus (TYLCV) in infected plants and viruliferous whiteflies. *Bioteconología Aplicada* **16** (4): 237-242.
- Himber C, Dunoyer P, Moissiard G, Ritzenthaler C, y Voinnet O** (2003) Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J* **22** (17): 4523-4533.
- Hoekema A** (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303** 179-180.
- Hofer P, Bedford ID, Markham PG, Jeske H, y Frischmuth T** (1997) Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. *Virology* **236** (2): 288-295.
- Hong Y, Saunders K, Hartley MR, y Stanley J** (1996) Resistance to geminivirus infection by virus-induced expression of diathin in transgenic plants. *Virology* **220** (1): 119-127.
- Hong YG, Robinson DJ, y Harrison BD** (1993) Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted geminiviruses in cassava. *J.Gen.Virol.* **74** (Pt 11) 2437-2443.
- Horsch R, Fry J, Hoffman N, Eichholtz D, Rogers S, y Fraley R** (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227** 1229-1231.
- Horsch R y Jones G** (1980) A double filter paper technique for plating cultured plant cells. *In Vitro* **16** 103-108.
- Hoshino Y y Mii M** (1998) Bialaphos stimulates shoot regeneration from hairy roots of snapdragon (*Antirrhinum majus* L.) transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.* **17** 256-261.
- Hou YM, Sanders R, Ursin VM, y Gilbertson RL** (2000) Transgenic plants expressing geminivirus movement proteins: abnormal phenotypes and delayed infection by Tomato mottle virus in transgenic tomatoes expressing the Bean dwarf mosaic virus BV1 or BC1 proteins. *Mol.Plant Microbe Interact.* **13** (3): 297-308.

- Hutvagner G** (2005) Small RNA asymmetry in RNAi: function in RISC assembly and gene regulation. *FEBS Lett.* **579** 5850-5857.
- Ieam Khang S y Chatchawankanphanich O** (2005) Augmentin as an alternative antibiotic for growth suppression of *Agrobacterium* for tomato (*Lycopersicon esculentum*) transformation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **82** 213-220.
- Ingham DJ, Pascal E, y Lazarowitz SG** (1995) Both bipartite geminivirus movement proteins define viral host range, but only BL1 determines viral pathogenicity. *Virology* **207** (1): 191-204.
- Ioannou N y Iordanou N** (1985) Epidemiology of tomato yellow leaf curl virus in relation to the population density of its whitefly vector *Bemisia tabaci* (Gennadius). Technical Bulletin No.71.Agricultural Research Institute, Ministry of Agricultural and Natural Resources, Nicosia, Cyprus , 7
Ref Type: Magazine Article
- Iyer L, Kumpatla S, Chandrasekharan M, y Hall T** (2000) Transgene silencing in monocots. *Plant Mol.Biol.* **43** 323-346.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, y Bevan MW** (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6** 3901-3907.
- Jenner C, Sánchez F, Netleship S, Foster G, Ponz F, y Walsh J** (2000) The cylindrical inclusion gene of Turnip mosaic virus encodes a pathogenic determinant to the *Brassica* resistance gene *TuRBO1*. *Mol Plant-Microbe Interact* **13** 1102-1108.
- Jenner C, Tomimura K, Ohshima K, Hughes S, y Walsh J** (2002) Mutations in Turnip mosaic virus P3 and cylindrical inclusion proteins are separately required to overcome two *Brassica napus* resistance genes. *Virology* **300** 50-59.
- Jenuwein T y Allis C** (2001) Translating the histone code. *Science* **293** 1074-1080.
- Jeske H, Lutgemeier M, y Preiss W** (2001) DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. *EMBO J.* **20** (21): 6158-6167.
- Jeske H, Menzel D, y Werz G** (1977) Electron microscopy studies on intranuclear virus-like inclusions in mosaic-diseased *Abutilon sellowianum* . *Phytopathol.Z.* **89** 289-295.
- Jiménez V** (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation* **47** 91-110.
- Jones AT** (1998). Control of virus infection in crops through breeding plants for vector resistance. En *Plant Virus Disease Control* (A. Hadidi, R. Kheterpal, and H. Koganezawa, Eds.), pp. 41-55. APS Press, St Paul.
- Jones DR** (2003) Plant viruses transmitted by whiteflies. *European Journal of Plant Pathology* **109** 195-219.

- Jones L, Hamilton AJ, Voinnet O, Thomas CL, Maule AJ, y Baulcombe DC** (1999) RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell* **11** (12): 2291-2301.
- Kammann M, Schalk HJ, Matzeit V, Schaefer S, Schell J, y Gronenborn B** (1991) DNA replication of wheat dwarf virus, a geminivirus, requires two cis-acting signals. *Virology* **184** (2): 786-790.
- Kapoor A, Agius F, y Zhu J** (2005) Preventing transcriptional gene silencing by active DNA demethylation. *FEBS Lett.* **579** 5889-5898.
- Kartha K, Gamborg O, Shyluk J, y Constabel F** (1976) Morphogenic investigations on *in vitro* leaf culture of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill cv Starfire) and high frequency plant regeneration. *Z Pflanzphysiol* **77** 292-301.
- Kasrawi M** (1989) Inheritance of resistance to tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Plant Dis.* **73** 435-437.
- Kazuo I, Toshiko U, Kenkou T, Masayuki O, y Masaaki N** (1995) Shoot regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) in tissue culture using several kinds of supporting materials. *Plant Science* **108** 93-100.
- Keller K, Johansen I, Hampton R, y Martin R** (1996) A recessive plant resistance gene governs the action of a putative potyvirus replication gene. *Phytopathology* **86** S18.
- Keller K, Johansen I, Martin R, y Hampton R** (1998) Potyvirus genome-linked protein (VPg) determines *Pea seedborne mosaic virus* pathotype-specific virulence in *Pisum sativum*. *Mol.Plant Microbe Interact.* **11** 124-130.
- Kheyr-Pour A, Gronenborn B, y Czosnek H** (1994) Agroinoculation of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) overcomes the virus resistance of wild *Lycopersicon* species. *Plant Breeding* **112** 228-233.
- Kim KS y Fulton RW** (1984) Ultrastructure of *Datura stramonium* infected with an Euphorbia virus 241 suggestive of a whitefly-transmitted geminivirus. *J.Phytopatology* **74** 236-241.
- Kirankumar S y Choong-Min R** (2004) Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Sci.* **9** (2): 97-104.
- Kohlenbach H y Wernicke W** (1977) Investigations on the inhibitory effect of agar and the function of active charcoal in anther culture. *Z Pflanzphysiol* **86** 463-472.
- Kong LJ y Hanley-Bowdoin L** (2002) A geminivirus replication protein interacts with a protein kinase and a motor protein that display different expression patterns during plant development and infection. *Plant Cell* **14** (8): 1817-1832.
- Kong LJ, Orozco BM, Roe JL, Nagar S, Ou S, Feiler HS, Durfee T, Miller AB, Gruissem W, Robertson D, y Hanley-Bowdoin L** (2000) A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants. *EMBO J.* **19** (13): 3485-3495.

- Koonin EV y Ilyina TV** (1992) Geminivirus replication proteins are related to prokaryotic plasmid rolling circle DNA replication initiator proteins. *J.Gen.Virol.* **73** (Pt 10) 2763-2766.
- Koornneef M, Bade J, Hanhart C, Horsman K, Schel J, Soppe W, Verkerk R, y Zabel P** (1993) Characterization and mapping of a gene controlling shoot regeneration in tomato. *The Plant Journal* **3** 131-141.
- Koornneef M, Jongsma M, Weide R, Zabel P, y Hille J** (1987). Transformation of tomato. En *Tomato Biotechnology* (D. Nevins and R. Jones, Eds.), pp. 169-178. Alan R. Liss, Inc., New York.
- Kumagai M, Donson J, della-Cioppa G, Harvey D, Hanley K, y Grill L** (1995) Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92** 1679-1683.
- Kunik T, Salomon R, Zamir D, Navot N, Zeidan M, Michelson I, Gafni Y, y Czosnek H** (1994) Transgenic tomato plants expressing the tomato yellow leaf curl virus capsid protein are resistant to the virus. *Biotechnology* **15** (5): 500-504.
- Kut SA y Evans DA** (1982) Plant regeneration from cultured leaf explants of eight wild tomato species and two related *Solanum* species. *In Vitro* **18** 593-598.
- Kwaks T y Otte A** (2006) Employing epigenetics to augment the expression of therapeutic proteins in mammalian cells. *Trends in Biotechnology* **24** (3): 137-142.
- Lai Y y Chen L** (2002) Flow cytometric analysis of nuclear cell cycle phases in relation to plant regeneration in *Petunia hybrida*. *J.Genet.Mol.Biol.* **13** 13-20.
- Lambe P, Schie H, Mutambel HSN, Fouche JG, Deltour R, Foidart JM, y Gaspar T** (1997) DNA methylation as a key process in regulation of organogenic totipotency and plant neoplastic progression? *In Vitro Cell Dev Biol* **33** 155-162.
- Lanfermeijer F, Dijkhuis J, Sturre M, Haan P, y Hille J** (2003) Cloning and characterization of the durable *Tomato mosaic virus* resistance gene *Tm-2²* from *Lycopersicon esculentum*. *Plant Mol.Biol.* **52** 1039-1051.
- Lapidot M, Friedmann M, Lachman O, Yehezkel A, Nahon S, Cohen S, y Pilowsky M** (1997) Comparison of resistance level to Tomato yellow leaf curl virus among commercial cultivars and breeding lines. *Plant Disease* **81** 1425-1428.
- Lapidot M, Gafny R, Ding B, Wolf S, Lucas W, y Beachy R** (1993) A dysfunctional movement protein of tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in transgenic plants. *Plant J* **4** 959-970.
- Lapidot M y Friedmann M** (2002) Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminiviruses. *Ann.Appl.Biol.* **140** (2): 109-127.
- LaRosaPeraza J, Lorenzo M, Vilaragut J, Pastor L, Rodríguez O, Campos T, García L, y Verdura J** (2006) *Organismos vivos modificados. Guía para evaluación y gestión de riesgos*. Centro Nacional de Seguridad Biológica (eds).

- Laterrot H** (1995) Breeding network to create tomato varieties resistant to tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). *Fruits* **50** 439-444.
- Laufs J, Jupin I, David C, Schumacher S, Heyraud-Nitschke F, y Gronenborn B** (1995a) Geminivirus replication: genetic and biochemical characterization of Rep protein function, a review. *Biochimie* **77** (10): 765-773.
- Laufs J, Traut W, Heyraud F, Matzeit V, Rogers SG, Schell J, y Gronenborn B** (1995b) In vitro cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92** (9): 3879-3883.
- Lazarowitz SG, Wu LC, Rogers SG, y Elmer JS** (1992) Sequence-specific interaction with the viral AL1 protein identifies a geminivirus DNA replication origin. *Plant Cell* **4** (7): 799-809.
- Lecoq H, Moury B, Desbiez A, Palloix A, y Pitrat M** (2004) Durable virus resistance in plants through conventional approaches: a challenge. *Virus Research* **100** 31-39.
- Leonard S, Chisholm J, Laliberte J, y Sanfacon H** (2002) Interaction in vitro between the proteinase of *Tomato ringspot virus* (genus Nepovirus) and the eukaryotic translation initiation factor iso4E from *Arabidopsis thaliana*. *J Gen.Virol.* **83** 2085-2089.
- Leroy X y Leon K** (2000) A rapid method for detection of plant genomic instability using unanchored-microsatellite primers. *Plant Molecular Biology* **18** 283a-283g.
- Li H, Li W, y Ding S** (2002) Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* **296** 1319-1321.
- Lin J, Assad-García N, y Kou J** (1995) Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissue by *Agrobacterium tumefaciens* cell. *Plant Science* **109** 171-177.
- Lindhout P** (2002) The perspectives of polygenic resistance in breeding for durable resistance. *Euphytica* **124** 217-229.
- Ling H, Kriseleit D, y Ganai M** (1998) Effect of ticarcilin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Cell Rep.* **17** 843-847.
- Lipp Joao K y Brown T** (1993) Enhanced transformation of tomato co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rifr::pGSFR1161 in the presence of acetocyringone. *Plant Cell Rep.* **12** 422-425.
- Lippman Z, Gendrel A, Back M, Vaughn M, Dedhia N, McCombie W, Lavine K, Mittal V, May B, Kasschau K, Carrington J, Doerge R, Colot V, y Martienssen R** (2004) Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature* **430** 471-476.
- Lippman Z y Martienssen R** (2004) The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* **431** 364-370.

- Liu J, Carmell M, Rivas F, Marsden C, Thomson J, Song J, Hammond S, Joshua-Tor L, y Hannon G** (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **305** 1437-1441.
- Liu L, Saunders K, Thomas CL, Davies JW, y Stanley J** (1999) Bean yellow dwarf virus RepA, but not rep, binds to maize retinoblastoma protein, and the virus tolerates mutations in the consensus binding motif. *Virology* **256** (2): 270-279.
- Liu S, Bedford ID, Briddon RW, y Markham PG** (1997) Efficient whitefly transmission of African cassava mosaic geminivirus requires sequences from both genomic components. *J.Gen.Virol.* **78 (Pt 7)** 1791-1794.
- Liu Y, Schiff M, y Dinesh-Kumar SP** (2002) Virus-induced gene silencing in tomato. *The Plant Journal* **31** (6): 777-786.
- Locky R** (1983) Callus formation and organogenesis by explant of six *Lycopersicon* species. *Can.J.Bot.* **61** 1072-1079.
- Lucas W, Bouche-Pillon S, Jackson D, Nguyen L, Baker L, Ding B, y Hake S** (1995) Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata. *Science* **270** 1980-1983.
- Martínez Y, de Blas C, Zabalgoceazcoa I, Quiñones C, Castellano C, Peralta EL, y Romero J** (1997) A bipartite geminivirus infecting tomatoes in Cuba. *Plant Dis.* **81** 1215.
- Martínez ZY, Zabalgoceazcoa I, Blas C, Sanchez F, Peralta EL, Ponz F, y Romero J** (1996) Geminivirus associated with diseased tomatoes in Cuba. *J.Phytopatology* **144** 277-279.
- Mason G** (2000) The effect of thiamethoxam, a Second Generation of Neonicotinoid Insecticide, in Preventing Transmission of Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus (TYLCV) by the Whitefly Bemisia Tabaci (Gennadius). *Crop Protection* **19** 473-479.
- Mathias T y Boyd L** (1986) Cefotaxime stimulates callus growth, embryogenesis and regeneration in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L. EM. Thell). *Plant Science* **46** 217-233.
- Matsubayashi Y, Takagi L, y Sakagami Y** (1997) Phytosulfokine- α , a sulfated pentapeptide, stimulates the proliferation of rice cells by means of specific high-and low-affinity binding sites. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94** 13357-13362.
- Matthews REF** (1979) Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology* **12** 129.
- Matzke M, Aufzats W, Kanno T, Daxinger L, Papp I, Mette M, y Matzke A** (2004) Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Biochim.Biophys.Acta* **1677** 129-141.
- Matzke M, Aufzats W, Kanno T, Mette M, y Matzke A** (2002) Homology-dependent gene silencing and host defense in plants. *Adv.Genet.* **46** 235-275.

- Matzke M y Birchler J** (2005) RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat.Rev.Genet.* **6** (1): 24-35.
- Matzke M y Matzke AJ** (1995) How and why do plants inactivate homologous (trans) genes? *Plant Physiol* **107** 679-685.
- Mazyad H, Hassan A, Nakhla M, y Moustagfa S** (1982) Evaluation of some wild *Lycopersicon* species as sources of resistance to tomato yellow leaf curl. *Egypt J.Hort.* **9** 241-246.
- McCormick S** (1991). Transformation of tomato with *Agrobacterium tumefaciens*. En Plant Tissue Culture Manual (K. Lindsey, Ed.), pp. 1-9. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- McCormick S, Niedermeyer J, Fry J, Barnason A, Horsch R, y Fraley R** (1986) Leaf disc transformation of cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* **5** 81-84.
- McGrath P y Harrison B** (1995) Transmission of tomato yellow leaf curl geminivirus by *Bemisia tabaci*: effects of virus isolate and vector biotype. *Ann.Appl.Biol.* **126** 307-316.
- McKinney H** (1929) Mosaic diseases in Canary Islands, West Africa, and Gibraltar. *J Agric Res* **39** 557.
- Mehta P, Wyman JA, Nakhla MK, y Maxwell DP** (1994) Transmission of tomato yellow leaf curl geminivirus by *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *J.Econ.Entomol.* **87** 1291-1297.
- Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Tang G, y Tuschl T** (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNA. *Mol.Cell* **15** 185-197.
- Meshi T, Motoyoshi F, Adachi A, Watanabe Y, Takamatsu N, y Okada Y** (1988) Two concomitant base substitution in the putative replicase gene of tobacco mosaic virus confer the ability to overcome the effects of a tomato resistance gene *Tm-1*. *EMBO J* **7** 1575-1581.
- Metzlaff M** (2002) RNA-mediated RNA degradation in transgene- and virus-induced gene silencing. *Biol.Chem.* **383** 1483-1489.
- Michelson I, Zamir D, y Czosnek H** (1994) Accumulation and translocation of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in a *Lycopersicon esculentum* breeding line containing the *L. chilense* TYLCV tolerance gene Ty-1. *Phytopathology* **84** 928-933.
- Moffat AS** (1999) Geminiviruses Emerge as Serious Crop Threat. *Science* **286** 1835-1836.
- Molina A y Beaver J** (1998) Inheritance of normal pod development in bean golden mosaic resistant common beans. *Annu.Rpt.Bean Improv.Coop.* **41** 3-4.

- Morales FJ** (1994). Situación del mosaico dorado en la América del Sur: Brasil. En *Bean Golden Mosaic: 1994 research advances*. (F. J. Morales, Ed.), pp. 90-95. CIAT, Palmira.
- Morales FJ y Anderson PK** (2001) The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Arch.Virol.* **146** (3): 415-441.
- Morales FJ y Jones PG** (2004) The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Res.* **100** (1): 57-65.
- Morales F** (2001) Conventional breeding for resistance to *Bemisia tabaci*-transmitted geminiviruses. *Crop Protection* **20** (9): 825-834.
- Morales F** (2000) El mosaico dorado y otras enfermedades del frijol común causadas por geminivirus transmitidos por mosca blanca en la América Latina. *CIAT* 169.
- Morales F y Niessen A** (1988) Comparative responses of selected *Phaseolus vulgaris* germplasm inoculated artificially and naturally with bean golden mosaic virus. *Plant Dis.* **72** 1020-1023.
- Morilla G, Krenz B, Jeske H, Bejarano ER, y Wege C** (2004) Tete a tete of tomato yellow leaf curl virus and tomato yellow leaf curl sardinia virus in single nuclei. *J.Virol.* **78** (19): 10715-10723.
- Morin S, Ghanim M, Sobol I, y Czosnek H** (2000) The GroEL protein of the whitefly *Bemisia tabaci* interacts with the coat protein of transmissible and nontransmissible begomoviruses in the yeast two-hybrid system. *Virology* **276** (2): 404-416.
- Morin S, Ghanim M, Zeidan M, Czosnek H, Verbeek M, y van den Heuvel JF** (1999) A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus. *Virology* **256** (1): 75-84.
- Moriones E y Navas-Castillo J** (2000) Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Res.* **71** (1-2): 123-134.
- Morra MR y Petty IT** (2000) Tissue specificity of geminivirus infection is genetically determined. *Plant Cell* **12** (11): 2259-2270.
- Moury B, Morel C, Johansen L, Guilbaud L, Souche S, Ayme V, Caranta C, Palloix A, y Jacquemond M** (2004) Mutations in Potato virus Y genome-linked protein determine virulence towards recessive resistances in *Capsicum annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. *Mol.Plant Microbe Interact.* **17** (3): 322-329.
- Mukherjee SK, Rathinasabapathi B, y Gupta N** (1991) Low sugar and osmotic requirements for shoot regeneration from leaf pieces of *Solanum melongena* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **25** 13-16.
- Muniyapa V, Jalikop S, Saikia A, Chennarayappa A, Shivashankar G, Ishwara A, y Ramappa H** (1991) Reaction of *Lycopersicon* cultivars and wild accessions to tomato leaf curl virus. *Euphytica* **56** 37-41.

- Murashige T y Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol* **15** 473-497.
- Murguido CA y Vázquez LL** (2000) Manejo integrado de plagas en el tomate. Boletín Fitosanitario 6(1)
Ref Type: Magazine Article
- Mysore KS y Ryu CM** (2004) Nonhost resistance: How much do we know? *Trends Plant Sci.* **9** 97-104.
- Nagar S, Hanley-Bowdoin L, y Robertson D** (2002) Host DNA replication is induced by geminivirus infection of differentiated plant cells. *Plant Cell* **14** (12): 2995-3007.
- Nagar S, Pedersen TJ, Carrick KM, Hanley-Bowdoin L, y Robertson D** (1995) A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *Plant Cell* **7** (6): 705-719.
- Nauerby B, Billing K, y Wyndaele R** (1997) Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* **123** 169-177.
- Navas-Castillo J, Sánchez-Campos S, Díaz JA, Sáez E, y Moriones E** (1999) Tomato yellow leaf curl virus-Is causes a novel disease of common bean and severe epidemics in tomato in Spain. *Plant Dis.* **81** 19-32.
- Navas-Castillo J, Sanchez-Campos S, Noris E, Louro D, Accotto GP, y Moriones E** (2000) Natural recombination between Tomato yellow leaf curl virus-is and Tomato leaf curl virus. *J.Gen.Virol.* **81** (Pt 11): 2797-2801.
- Ngo H, Tschudi C, Gull K, y Ullu E** (1998) Double-stranded RNA induces RNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95** 14687-14692.
- Noris E, Accotto GP, Tavazza R, Brunetti A, Crespi S, y Tavazza M** (1996) Resistance to tomato yellow leaf curl geminivirus in *Nicotiana benthamiana* plants transformed with a truncated viral C1 gene. *Virology* **224** (1): 130-138.
- Noris E, Hidalgo E, Accotto GP, y Moriones E** (1994) High similarity among the tomato yellow leaf curl virus isolates from the west Mediterranean basin: the nucleotide sequence of an infectious clone from Spain. *Arch.Virol.* **135** (1-2): 165-170.
- Noris E, Lucioli A, Tavazza R, Caciagli P, Accotto GP, y Tavazza M** (2004) Tomato yellow leaf curl Sardinia virus can overcome transgene-mediated RNA silencing of two essential viral genes. *J Gen.Virol.* **85** (Pt 6): 1745-1749.
- Orozco BM y Hanley-Bowdoin L** (1996) A DNA structure is required for geminivirus replication origin function. *J.Virol.* **70** (1): 148-158.
- Orozco BM, Miller AB, Settlege SB, y Hanley-Bowdoin L** (1997) Functional domains of a geminivirus replication protein. *J.Biol.Chem.* **272** (15): 9840-9846.

- Paddison P y Hannon G** (2002) RNA interference: the new somatic cell genetics. *Cancer Cell* **2** 17-23.
- Padgett H, Watanabe Y, y Beachy R** (1997) Identification of the TMV replicase sequence that activates the *N* gene-mediated hypersensitive response. *Mol Plant-Microbe Interact* **10** 709-715.
- Padidam M, Sawyer S, y Fauquet CM** (1999) Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* **265** (2): 218-225.
- Palmgren G, Mattson O, y Okkels F** (1993) Treatment of *Agrobacterium* or leaf disks with 5-azacytidine increases transgene expression in tobacco. *Plant Mol.Biol.* **21** 429-435.
- Pandolfini T, Molesini B, Avesani L, Spena A, y Polverari A** (2003) Expression of self-complementary hairpin RNA under the control of the rolC promoter confers systemic disease resistance to plum pox virus without preventing local infection. *BMC.Biotechnol.* **3** (1): 7.
- Park H, Morris J, Park J, Hirschi K, y Smith R** (2003) Efficient and genotype-independent *Agrobacterium*- mediated tomato transformation. *J.Plant Physiol* **160** (10): 1253-1257.
- Park YD, Moscone EA, Iglesias VA, Vaucheret H, Matzke AJ, y Matzke MA** (1996) Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *Plant J.* **9** 183-194.
- Pascal E, Goodlove PE, Wu LC, y Lazarowitz SG** (1993) Transgenic tobacco plants expressing the geminivirus BL1 protein exhibit symptoms of viral disease. *Plant Cell* **5** (7): 795-807.
- Paszy C y Lurquin P** (1987) Improved plant protoplast plating/selection technique for quantitation of transformation frequencies. *BioTechniques* **5** 716-718.
- Pelissier T, Thalmeir S, Kempe D, Sanger H, y Wassenegger M** (1999) Heavy de novo methylation at symmetrical and non-symmetrical sites is a hallmark of RNA-directed DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* **27** 1625-1634.
- Peña L, Pérez R, Cervera M, Juárez J, y Navarro L** (2004) Early events in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of citrus explants. *Annals of Botany* **94** 67-74.
- Pfitzner A** (1998) Transformation of tomato. *Methods Mol.Biol.* **81** 359-363.
- Pico B, Díez J, y Nuez F** (1998) Evaluation of whitefly-mediated inoculation techniques to screen *Lycopersicon esculentum* and wild relatives for resistance to Tomato Yellow Leaf Curl Virus. *Euphytica* **101** 259-271.
- Picó B, Díez MJ, y Nuez F** (1996) Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The tomato yellow leaf curl virus-a review. *Scientia Horticulturae* **67** 151-196.

- Picó B, Ferriol M, Díez J, y Nuez F** (1999) Developing tomato breeding lines resistant to tomato yellow leaf vurl virus. *Plant Breeding* **118** 537-542.
- Pilowsky M y Cohen S** (1974) Inheritance of resistance to tomato yellow leaf curl virus in tomatoes. *Phytophatology* **64** 632-635.
- Pilowsky M y Cohen S** (1990) Tolerance to tomato yellow leaf curl virus derived from *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Disease* **74** 248-250.
- Pita JS, Fondong VN, Sangare A, Otim-Nape GW, Ogwal S, y Fauquet CM** (2001) Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *J.Gen.Virol.* **82** (Pt 3): 655-665.
- Piven N, Uzcategui R, y Infante H** (1995) Resistance to tomato yellow mosaic virus in species of *Lycopersicon*. *Plant Dis.* **79** 590-594.
- Polston JE y Anderson PK** (1997) The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Dis.* **81** 1358-1369.
- Pooggin M y Hohn T** (2004) Fighting geminiviruses by RNAi and vice versa. *Plant Mol.Biol.* **55** (2): 149-152.
- Potrykus I** (1991) Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Annual Review of Plant Physiology and Plant MolecularBiology* **42** 205-225.
- Powell-Abel P, Nelson RS, De B, Hoffmann N, Rogers SG, Fraley RT, y Beachy RN** (1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* **232** (4751): 738-743.
- Pratta G, Zorzol R, y Picardi L** (1997) Intra and interspecific variability of in vitro culture response in *Lycopersicon* (tomatoes). *Brazilian Journal of Genetics* **20** 75-78.
- Preiss W y Jeske H** (2003) Multitasking in replication is common among geminiviruses. *J.Virol.* **77** (5): 2972-2980.
- Pringle CR** (1999) Virus taxonomy 1999. The universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the ICTV during 1998. *Arch.Virol.* **144** 421-429.
- Rakoczy-Trojanowska M** (2002) The effects of growth regulators on somaclonal variation in rye (*Secale cereale* L.) and selection of somaclonal variants with increased agronomic traits. *Cellular and Molecular Biology Letters* **7** 1111-1120.
- Ramos PL, Fernandez AI, Castrillo G, Diaz L, Echemedia AL, Fuentes A, Peral R, Pujol M, Ascencio-Ibanez JT, Rivera-Bustamante R, y Arguello-Astorga G** (2002) Macroptilium yellow mosaic virus, a New Begomovirus Infecting *Macroptilium lathyroides* in Cuba. *Plant Dis.* **86** (9): 1049.
- Ramos PL, Guerra O, Dorestes V, Ramírez N, Rivera-Bustamante R, y Oramas P** (1996) Detection of TYLCV in Cuba. *Plant Disease* **80** (10): 1208.

- Ramos PL, Guerra O, Peral R, Rivera-Bustamante R, y Oramas P** (1997) *Taino Tomato Mottle Virus*, a new bipartite geminivirus from Cuba. *Plant Disease* **81** 1095.
- Rangwala S y Richards E** (2004) The value-added genome: building and maintaining genomic cytosine methylation landscapes. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **14** 686-691.
- Ratcliff F, Harrison B, y Baulcombe D** (1997) A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* **276** 1558-1560.
- Register JC y Beachy RN** (1988) Resistance to TMV in transgenic plants results from interference with an early event in infection. *Virology* **166** (2): 524-532.
- Reina J, Morilla G, Bejarano ER, Rodríguez MD, y Janssen D** (1999) First report of *Capsicum annum* plants infected by tomato yellow leaf curl virus. *Plant Dis.* **83** 1176.
- Richards E y Elgin S** (2002) Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* **108** 489-500.
- Roberts EJ, Buck KW, y Coutts RH** (1988) Characterization of potato yellow mosaic virus as a geminivirus with a bipartite genome. *Intervirology* **29** (3): 162-169.
- Rochester DE, DePaulo JJ, Fauquet CM, y Beachy RN** (1994) Complete nucleotide sequence of the geminivirus tomato yellow leaf curl virus, Thailand isolate. *J.Gen.Virol.* **75** (Pt 3) 477-485.
- Roditakis E, Roditakis NE, y Tsagkarakou A** (2005) Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) populations from Crete. *Pest Manag Sci* **61** 577-582.
- Rojas MR, Gilbertson RL, Russell DR, y Maxwell DP** (1993) Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* **77** (4): 340-347.
- Rojas MR, Jiang H, Salati R, Xoconostle-Cazares B, Sudarshana MR, Lucas WJ, y Gilbertson RL** (2001) Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, Tomato yellow leaf curl virus. *Virology* **291** (1): 110-125.
- Rom M, Antignus Y, Gidoni D, Pilowsky M, y Cohen S** (1993) Accumulation of tomato yellow leaf curl virus DNA in tolerant and susceptible tomato lines. *Plant Disease* **77** 253-257.
- Roye ME, Wernecke ME, McLaughlin WA, Nakhla MK, y Maxwell DP** (1999) Tomato dwarf leaf curl virus, a new bipartite geminivirus associated with tomatoes and peppers in Jamaica and mixed infection with tomato yellow leaf curl virus. *Plant Pathology* **48** 370-378.

Rubinstein G y Czosnek H (1997) Long-term association of tomato yellow leaf curl virus with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity. *J.Gen.Virol.* **78 (Pt 10)** 2683-2689.

Rushing AE, Sunter G, Gardiner WE, Dute RR, y Bisaro DM (1987) Ultrastructural aspects of tomato golden mosaic virus infections in tobacco. *Phytophatology* **77** 1231-1236.

Rybicki EP, Briddon RW, Brown JE, Fauquet CM, Maxwell DP, Harrison BD, Markham PG, y Stanley J (2000) Geminiviridae. van Regenmortel MHV, Fauquet CM Bishop DHL, Carstens, E., Estes, M. K., Lemon, S., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D., Pringle, C. R., and Wickner, R. B. *Virus Taxonomy, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* , 285-297 New York, Academic Press.

Ref Type: Report

Sachs T y Thimann K (1967) The role of auxins and CKs in the release of buds from dominance. *Am J Bot* **54** 136-144.

Sambrook J, Fritsch EF, y Maniatis T (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, (eds). New York.

Sánchez-Campos S, Navas-Castillo J, Camero R, Soria C, Díaz JA, y Moriones E (1999) Displacement of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)-Sr by TYLCV-Is in tomato epidemics in Spain. *Phytophatology* **89** 1038-1043.

Sanchez-Campos S (1999) Displacement of Tomato Yellow Leaf Curl Virus-Sr by TYLCV-Is in tomato Epidemics in Spain. *Phytophatology* **89** 1038-1043.

Sanderfoot AA y Lazarowitz SG (1996) Getting it together in plant virus movement: cooperative interacciones between bipartite geminivirus movement proteins. *Trend in Cell Biology* **6** 353-358.

Sanford JC, Smith FD, y Russell JA (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in Enzymology* **217** 483-509.

Sanford J y Johnston S (1985) The concept of parasite-derived resistance: deriving resistance genes from the parasite's own genome. *J Theor Biol* **113** 395-405.

Sangare A, Deng D, Fauquet C, y Beachy R (1999) Resistance to African cassava mosaic virus conferred by a mutant of the putative NTP-binding domain of the Rep gene (AC1) in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Biology Reports* **5** 95-102.

Sangwan R, Bourgeois Y, Brown S, Vasseur G, y Sangwan-Norree I (1992) Characterization of competent cells and early events of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **188** 439-456.

Saunders K, Lucy A, y Stanley J (1992) RNA-primed complementary-sense DNA synthesis of the geminivirus African cassava mosaic virus. *Nucleic Acids Res.* **20** (23): 6311-6315.

Saunders K, Salim N, Mali VR, Malathi VG, Briddon R, Markham PG, y Stanley J (2002) Characterisation of Sri Lankan cassava mosaic virus and Indian cassava

mosaic virus: evidence for acquisition of a DNA B component by a monopartite begomovirus. *Virology* **293** (1): 63-74.

Schuster DJ, Mueller TF, Kring JB, y Price JF (1990) Relationship of the sweetpotato whitefly to a new tomato fruit disorder in Florida. *HortScience* **25** 1618-1620.

Seo YS, Gepts P, y Gilbertson RL (2004) Genetics of resistance to the geminivirus, Bean dwarf mosaic virus, and the role of the hypersensitive response in common bean. *Theor.Appl.Genet.* **108** (5): 786-793.

Sera T (2005) Inhibition of virus DNA replication by artificial zinc finger proteins. *J Virol.* **79** 2614-2619.

Settlage SB, Miller AB, y Hanley-Bowdoin L (1996) Interactions between geminivirus replication proteins. *J.Virol.* **70** (10): 6790-6795.

Shahin E, Sukhapinda K, Simpson R, y Spivey R (1986) Transformation of cultivated tomato by a binary vector in *Agrobacterium rhizogenes*: transgenic plants with normal phenotypes harbor binary vector T-DNA, but no Ri-plasmid T-DNA. *Theor.Appl.Genet.* **72** 770-777.

Sharma R y Schimke RT (1996) Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium. *BioTechniques* **20** (1): 42-44.

Sigarroa A (1985) *Biometría y diseño experimental*. Editorial Pueblo y Educación. (eds). La Habana.

Singh S, Morales F, Miklas P, y Terán H (2000) Selection for bean golden mosaic resistance in intra- and interracial bean populations. *Crop Sci* **40** 1565-1572.

Sinha ND, Biernat J, Mcmanus J, y Koster H (1983) Polymer supportoligonucleotide synthesis XVIII, use of cyanoethylN,N dialkyloamino N-morpho-llinophosphoramidite of deoxynucleosides for the syntesis of DNA fragments simplifying deprotection of the final product. *Nucleic Acids Res.* **12** 4539-4557.

Sinisterra X, Polston J, y Abouزيد A (1999) Tobacco plants transformed with a modified coat protein of tomato mottle begomovirus show resistance to virus infection. *Phytopathology* **89** 701-706.

Sit T, Leclerc D, y Abouhaidar M (1994) The minimal 5' sequence for *in vitro* initiation of papaya mosaic potexvirus assembly. *Virology* **199** 238-242.

Sivamani E, Shen P, Opalka N, Beachy R, y Fauquet C (1996) Selection of large quantities of embryogenic calli from indica rice seeds for production of fertile transgenic plants using the biolistic method. *Plant Cell Rep.* **15** 322-327.

Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk PA, Green AG, y Waterhouse PM (2000) Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407** (6802): 319-320.

Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* **98** 503-517.

- Stachel S, Nester E, y Zambryski P** (1986) A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens vir* gene expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **83** 379-383.
- Stam M, Mol J, y Kooter J** (1997) The silence of genes in transgenic plants. *Annals of Botany* **79** 3-12.
- Stanley J** (1995) Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggests strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. *Virology* **206** (1): 707-712.
- Stanley J, Frischmuth T, y Ellwood S** (1990) Defective viral DNA ameliorates symptoms of geminivirus infection in transgenic plants. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87** (16): 6291-6295.
- Staskawicz B** (1995) Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* **268** 661-667.
- Sudarshana M, Wang H, Lucas W, y Gilbertson R** (1998) Dynamics of bean dwarf mosaic geminivirus cell-to-cell and long-distance movement in *Phaseolus vulgaris* revealed, using green fluorescent protein. *Mol Plant-Microbe Interact* **11** 277-291.
- Sunter G, Stenger DC, y Bisaro DM** (1994) Heterologous complementation by geminivirus AL2 and AL3 genes. *Virology* **203** (2): 203-210.
- Taschner P, VanMarle G, Brederode F, Tumer N, y Bol J** (1994) Plants transformed with a mutant alfalfa mosaic virus coat protein gene are resistant to the mutant but not to wild-type virus. *Virology* **203** 269-276.
- Taylor RAJ, Shalhevet S, Spharim I, Berlinger MJ, y Lebiush-Mordechi S** (2001) Economic evaluation of insect-proof screens for preventing tomato yellow leaf curl virus of tomatoes in Israel. *Crop Protection* **20** 561-569.
- Teixeira da Silva J y Fukai S** (2001) The impact of carbenicillin, cefotaxime and vancomycin on chrysanthemum and tobacco TCL morphogenesis and *Agrobacterium* growth. *J.Appl.Hort.* **3** (1): 3-12.
- Tenllado F, Llave C, y Díaz-Ruiz J** (2004) RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants. *Virus Research* **102** 85-96.
- Thomas P y Mink G** (1998) Tomato hybrids with nonspecific immunity to viral and mycoplasma pathogens of potato and tomato. *HortScience* **33** 764-765.
- Thottappilly G** (2003) Plant virus diseases of importance to Africa agriculture. *J.Phytopatology* **134** 265-288.
- Tijsterman M, Ketting R, y Plasterk R** (2002) The genetics of RNA silencing. *Annu .Rev.Genet.* **36** 489-519.

- Toldi O, Tóth S, Oreifig A, Kiss E, y Jenes B** (2000) Production of phosphinothricin-tolerant rice (*Oryza sativa* L.) through the application of phosphinothricin as growth regulator. *Plant Cell Rep.* **19** 1226-1231.
- Toreli A, Soragni E, Bolchi A, Petrucco S, Ottonello S, y Branca C** (1996) New potential markers of *in vitro* tomato morphogenesis identified by mRNA differential display. *Plant Mol.Biol.* **32** 891-900.
- Tzfira T y Citovsky V** (2000) From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. *Molecular Plant Pathology* **1** (4): 201-212.
- Ullu E, Tschudi C, y Chakraborty T** (2004) RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol.* **6** 509-519.
- van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DH, Carstens E, Estes MK, Lemon S, Maniloff J, Mayo M, McGeoch D, Pringle CR, y Wickner RB** (2000) *Virus Taxonomy. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Academic Press (eds). San Diego.
- van Roekel J, Damm B, Melchers L, y Hoekema A** (1993) Factors influencing transformation frequency of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Rep.* **12** 644-647.
- van Wezel R, Dong X, Liu H, Tien P, Stanley J, y Hong Y** (2002) Mutation of three cysteine residues in Tomato yellow leaf curl virus-China C2 protein causes dysfunction in pathogenesis and posttranscriptional gene-silencing suppression. *Mol.Plant Microbe Interact.* **15** (3): 203-208.
- Vanitharani R, Chellappan P, y Fauquet C** (2005) Geminivirus and RNA silencing. *Trends Plant Sci.* **10** (3): 144-151.
- Vanitharani R, Chellappan P, y Fauquet CM** (2003) Short interfering RNA-mediated interference of gene expression and viral DNA accumulation in cultured plant cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*
- Vaucheret H y Fagard M** (2001) Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet.* **17** 29-35.
- Velez J, Basset M, Beaver J, y Molina A** (1998) Inheritance of resistance to bean golden mosaic virus in common bean. *J Amer.Soc.Hort.Sci.* **123** 628-631.
- Verdel A, Jia S, Gerber S, Sugiyama T, Gygi S, Grewal S, y Moazed D** (2004) RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* **303** 672-676.
- Vidavsky F y Czosnek H** (1998) Tomato breeding lines immune and tolerant to tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) issued from *Lycopersicon hirsutum*. *Phytopathology* **88** 910-914.
- Vidavsky F, Leviatov S, Milo J, Rabinowitch H, Kedar N, y Czosnek H** (1998) Response of tolerant breeding lines of tomato *Lycopersicon esculentum*, originating from three different sources *L. peruvianum*, *L. pimpinellifolium* and *L. chilense* to

- early controlled inoculation by Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). *Plant Breeding* **117** 165-169.
- Villemont E, Dubois F, Sangwan R, Vasseur G, Bourgeois Y, y Sangwan-Norreel B** (1997) Role of the host cell cycle in the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Petunia*: evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer. *Planta* **201** 160-172.
- Voinnet O, Vain P, Angell S, y Baulcombe DC** (1998) Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* **95** (2): 177-187.
- Volpe T, Kidner C, Hall I, Teng G, Grewal S, y Martienssen R** (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* **297** 1833-1837.
- von Arnim A y Stanley J** (1992) Determinants of tomato golden mosaic virus symptom development located on DNA B. *Virology* **186** (1): 286-293.
- Wang H, Gilbertson RL, y Lucas WJ** (1996) Spatial and temporal distribution of bean dwarf mosaic geminivirus in *Phaseolus vulgaris* and *Nicotina benthamiana* . *Phytopathology* **86** 1206-1214.
- Wang H, Sudarshana M, Gibertson R, y LucasW J** (1999) Analysis of cell-to-cell and long distance movement of a bean dwarf mosaic virus-green fluorescent protein reporter in host and non-host species: Identification of sites of resistance. *Mol Plant-Microbe Interact* **12** (345): 355.
- Wang MB, Abbott D, y Waterhouse PM** (2000) A single copy of virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus. *Molecular Plant Pathology* **1** (6): 347-356.
- Waterhouse PM, Graham MW, y Wang MB** (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95** (23): 13959-13964.
- Waterhouse PM y Helliwell CA** (2003) Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature Reviews Genetics* **4** 29-38.
- Watson J, Fusaro F, Wang M, y Waterhouse P** (2005) RNA silencing platforms in plants. *FEBS Lett.* **579** 5982-5987.
- Wege C, Saunders K, Stanley J, y Jeske H** (2001) Comparative analysis of tissue tropism of bipartite geminiviruses. *J.Phytopatology* **149** 359-368.
- Wernicke W y Kohlenbach H** (1976) Investigation on liquid culture medium as a means of anther culture in *Nicotiana*. *Z Pflanzphysiol* **79** 189-198.
- Wittmann S, Chatel H, Fortin M, y Laliberte J** (1997) Interaction of the viral protein genome linked to *Turnip mosaic potyvirus* with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology* **234** 84-92.

- Xie Q, Sanz-Burgos AP, Hannon GJ, y Gutierrez C** (1996) Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins. *EMBO J.* **15** (18): 4900-4908.
- Xie Q, Suarez-Lopez P, y Gutierrez C** (1995) Identification and analysis of a retinoblastoma binding motif in the replication protein of a plant DNA virus: requirement for efficient viral DNA replication. *EMBO J.* **14** (16): 4073-4082.
- Xie Z, Johansen L, Gustafson A, Kasschau K, Lellis A, Zilberman D, Jacobsen S, y Carrington J** (2004) Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS.Biol.* **2** (5): E104.
- Yang Y, Sherwood TA, Patte CP, Hiebert E, y Polston JE** (2004) Use of Tomato Yellow Leaf Curl Virus *Rep* gene sequences to engineer TYLCV resistance in tomato. *Phytopathology* **94** 490-496.
- Yoder JI** (1990) A genetic analysis of mutations recovered from tomato following *Agrobacterium*-mediated transformation with the maize transposable elements Activator and Dissociation. *Theor.Appl.Genet.* **79** 657-662.
- Yoo B, Kragler F, Varkonyi-Gasic E, Haywood V, Archer-Evans S, Lee Y, Lough T, y Lucas W** (2004) A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell* **16** (8): 1979-2000.
- Yu T, Yeh S, y Yang J** (2001) Effects of carbenicillin and cefotaxime on callus growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya. *Bot.Bull.Acad.Sin* **42** 281-286.
- Zakay Z, Navot N, Zeidan M, Kedar N, Rabinowitch HD, Czosnek H, y Zamir D** (1991) Screening of *Lycopersicon* accessions for resistance to tomato yellow leaf curl virus: presence of viral DNA and symptom development. *Plant Disease* **75** 279-281.
- Zamir D, Ekstein-Michelson I, Zakay Z, Navot N, Zeidan M, Sarfatti M, Eshed Y, Harel E, Pleban T, van-Oss H, Kedar N, Rabinowitch HD, y Czosnek H** (1994) Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, *TY1*. *Theor.Appl.Genet.* **88** 141-146.
- Zelcer A, Soferman O, y Izhar S** (1984) An *in vitro* screening for tomato genotypes exhibiting efficient shoot regeneration. *J.Plant Physiol* **115** 211-215.
- Zupan J, Muth T, Draper O, y Zambrisky P** (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal* **23** (1): 11-28.

9 ANEXOS

Anexo 1

Oligonucleótidos generados para la obtención de las construcciones que contienen *c1*antisentido y *hpc1*. (c): para amplificar a partir de la cadena complementaria de TYLCV-[CU]; (v): para amplificar a partir de la cadena viral de TYLCV-[CU].

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Sitio de restricción presente en la secuencia
A (c)	TCT <u>CTCGAG</u> TTACGCCTTATTGGTTTC	<i>Xho</i> I
B (v)	CGCGGATCCATGCCTCGTTTTATTTAAA	<i>Bam</i> HI
C (c)	CGGGGT <u>ACCT</u> TACGCCTTATTGGTTTC	<i>Kpn</i> I
D	CCATCGATCTGCAGGTAATTTCTAGTTTTTC	<i>Cla</i> I
E	CCATCGATCTGCAGTTATCATCATCATAG	<i>Cla</i> I

Anexo 2

Descripción de los plasmidios usados en la realización de este trabajo.

Plasmidio	Características	Referencia
pZero TM -2.1	Vector de 3.3 kb con 16 sitios únicos de clonación. Posee resistencia a Kan (Tn5). Contiene el origen de replicación CoIE1.	Zero Background TM /Kan (Invitrogen, Holanda)
pZTYL	Vector originado de la clonación del monómero de TYLCV-[CU] en el sitio <i>SacI</i> del vector pZero.	Este trabajo
pPZP200	Vector binario de 6741 pb con 9 sitios únicos de clonación. Posee un origen de replicación funcional en <i>E.coli</i> y otro funcional en <i>Agrobacterium</i> .	CAMBIA, Australia.
p2TYL	Vector originado de la clonación del dímero de TYLCV-[CU] en el sitio <i>BamHI</i> - <i>HindIII</i> del vector pPZP200.	Este trabajo.
pBPΩ8	Vector de clonación de 4400 pb, con resistencia a ampicilina.	(Coego y col., 1996)
pBP <i>c1</i> antisentido	Vector originado de la clonación de la secuencia <i>c1</i> antisentido en el sitio <i>BamHI</i> - <i>XhoI</i> del vector pBPΩ8.	Este trabajo.
pBP <i>c1</i> antisentido- <i>c1</i>	Vector originado de la clonación de la secuencia <i>c1</i> en el sitio <i>KpnI</i> - <i>BamHI</i> del vector pBP <i>c1</i> antisentido.	Este trabajo.
pPZP <i>c1</i> antisentido	Vector originado de la clonación de la secuencia <i>c1</i> antisentido en el sitio <i>HindIII</i> del vector pPZP200.	Este trabajo.
pPZP <i>c1</i> antisentido I-2 <i>c1</i>	Vector originado de la clonación de la secuencia <i>c1</i> antisentidoI-2 <i>c1</i> en el sitio <i>HindIII</i> del vector pPZP200.	Este trabajo.
pCAMBIA3300	Vector binario de 8400 pb que contiene 6 sitios únicos para clonación. Confiere resistencia a glufosinato de amonio. Posee un origen de replicación funcional en <i>E. coli</i> y otro en <i>A. tumefaciens</i> .	CAMBIA, Australia.
pCAMBIA3300 <i>c1</i> antisentidoI-2 <i>c1</i>	Vector originado de la clonación de la secuencia <i>c1</i> antisentidoI-2 <i>c1</i> en el sitio <i>HindIII</i> del vector pCAMBIA3300.	Este trabajo.
pWJJK.IN-2	Vector que contiene el intron 2 de la catalasa del frijol variedad Castor.	CSIRO, Australia.
pCAMBIA2301	Vector binario de 11621 pb que contiene 10 sitios únicos para clonación. Confiere resistencia a kanamicina y porta el gen reportero <i>uidA</i> . Posee un origen de replicación funcional en <i>E. coli</i> y otro en <i>A. tumefaciens</i> .	CAMBIA, Australia.

10 AUTOBIBLIOGRAFIA

Publicaciones relacionadas directamente con la tesis:

- Estudio de las condiciones de cultivo para la regeneración de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), a partir de cotiledones y hojas de la variedad Campbell 28. (1998) **A.Fuentes**, N.Soto, D.Alfonso y P.Ramos. Biotecnología Aplicada 15: 242-245.
- Intron-harpin RNA derived from replication associated protein *C1* gene confers immunity to Tomato Yellow Leaf Curl Virus infection in transgénic tomato plants. (2006) **A.Fuentes**, P.L.Ramos, E.Fiallo, D.Callard, Y.Sánchez, R.Peral, R.Rodríguez y M.Pujol. Transgénic Research 15: 291-304.
- A transformation procedure for the recalcitrant tomato by addressing transgénic plant-recover limiting factors. **A.Fuentes**, P.L.Ramos, Y.Sánchez, D.Callard, A. Ferreira, K.Cobas, K.Tiel, C.Borroto, V.Doreste y M.Pujol. Biotechnology Journal (en proceso editorial).
- Transgénic tobacco NT1 cell line: a permissive model for replication and assessment of transgénic resistance strategies against *Tomato yellow leaf curl virus*. **A.Fuentes**, P.L.Ramos, A.I.Fernández, K.Tiel, D.Callard, Y.Sánchez y M.Pujol. (en revisión).

Otras publicaciones en el tema de Geminivirus.

- Cuban Isolate of *Bean golden yellow mosaic virus* is a member of the Mesoamerican BGMV Group. (2001). A.L.Echemendía, P.L.Ramos, R.Peral, **A.Fuentes**, G.González, J.Sanpedro y F.Morales. Plant Disease 85(9).1030.
- Macroptilium yellow mosaic virus, a new begomovirus infecting *Macroptilium lathyroides* in Cuba. (2002). P.L.Ramos, A.Fernández, G.Castrillo, L.Díaz, A.L.Echemendía, **A.Fuentes**, R.Peral, M.Pujol, J.T.Ascencio-Ibañez, R.Rivera-Bustamante y G.Arguello-Astorga. Plant Disease 86(6). 1049.
- First report of *Dicliptera yellow mottle virus* (DiYMoV) infecting *Dicliptera vahliana* in Cuba (2003). A.L.Echemendía, P.L.Ramos, R.Peral, **A.Fuentes**, M.Pujol, G.González. Plant Pathology. 53. 787.
- Establishment of a non-radioactive nucleic acid hybridization technique for begomovirus detection. (2003). R.Rodríguez, P.L.Ramos, V.Doreste, K.Velásquez, R.Peral, **A.Fuentes** y M.Pujol. Biotecnología Aplicada 20. 164-169.
- First report of *Sida golden yellow vein virus* infecting *Sida* species in Cuba (2004). A.L.Echemendía, P.L.Ramos, L.Díaz, R.Peral, **A.Fuentes**, M.Pujol, G.González. Plant Pathology. 53(2). 234.
- Identification of the minimal sequences required for vascular-specific activity of *Tomato mottle Taino begomovirus* Replication-associated protein promoter in transgénic plants (2004) P.L.Ramos, **A.Fuentes**, Q.Quintana, G.Castrillo, R.G.Guevara-González, R.Peral, R.F.Rivera-Bustamante y M.Pujol. Virus Research 102(2): 125-132.
- Tobacco leaf curl Cuba virus, a new begomovirus infecting tobacco (*Nicotiana tabacum*) in Cuba. (2006). Y.M.Morán, P.L.Ramos, M.Domínguez, **A.Fuentes**, Y.Sánchez y J.A.Crespo. Plant Pathology 55:570.

Presentaciones en eventos

1995. Biotecnología Habana.

- Preliminary studies of shoot regeneration from cotyledon and hypocotyl explants of *Lycopersicon esculentum* Mill cultivar Campbell 28. **A.Fuentes**, D.Hernández, E.R.Carmona y G.Selman.

1998. Redbio 98, Cuba

- Study of Culture conditions for regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) plants from cotyledons and leaves of cultivar Campbell28. **A.Fuentes**, N.Soto, D.Alfonso, P.Oramas
- 2001. X Taller Iberoamericano y del Caribe sobre Moscas Blancas y Geminivirus, Cuba.**
- Exploring for geminiviruses in Cuba: the CIGB experience. P.L.Ramos, L.Díaz, L.Hernández, A.L.Echemendia, M.Domínguez, M.Cordero, G.Castrillo, **A.Fuentes**, R.Peral, A.I.Fernández, V.Doreste, R.Rodríguez y M.Pujol.
- 2002. Biotecnología Habana 2002.**
- Transgénic NT1 cellular lines as a system for the preliminary evaluation of pathogen derived resistance strategies against *Tomato yellow leaf curl virus*. A.I.Fernández, P.L.Ramos, **A.Fuentes**, G.Castrillo, R.Peral y M.Pujol.
 - Establishment of a non-radioactive nucleic acid hybridization technique for tomato yellow leaf curl geminivirus detection in transgénic plants. R.Rodríguez, K.Velásquez, P.L.Ramos, V.Doreste, R.Peral, **A.Fuentes** y M.Pujol.
 - Introducing pathogen-derived transgénés into tomato for resistance to geminivirus. **A.fuentes**, P.L.Ramos, A.I.Fernández, G.M.castrillo, A.Ferreira, R.Rodríguez, R.Peral, V.Doreste y M.Pujol.
 - Delimitation of minimal *cis* element involved in the activity of pAC1 promoter from *Tomato mottle Taino virus*. P.L.Ramos, **A.Fuentes**, Q.Quintana, G.Castrillo, R.Peral y M.Pujol.
- 2004. 44 Congreso de la Sociedad Americana de Fitopatología-División Caribe. La Habana, Cuba.**
- Tropism of *Tomato mottle Taino virus* could be determined by the expression pattern directed by its replication-associated protein promoter. P.L.Ramos, Y.Sánchez, **A.Fuentes**, V.Doreste, D.Callard, y M.Pujol.
- 2005. Biotecnología Habana 2005.**
- Intron-hairpin RNA derived from replicase associated protein C1 gene confers immunity to Tomato yellow leaf curl virus infection in transgénic tomato plants. **A.Fuentes**, P.L.Ramos, E.Fiallo, D.Callard, Y.Sánchez, R.Peral y M.Pujol.
 - Resistance to Tomato Yellow Leaf Curl Virus in Transgénic tomato plants is related to the presence of siRNA derived from the viral replication associated protein. E.Fiallo, P.L.Ramos, **A.Fuentes**, Y.Sánchez, D.Callard y M.Pujol.