

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 393**

21 Número de solicitud: 201630185

51 Int. Cl.:

**C12N 15/83** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

**21.09.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**28.05.2019**

62 Número y fecha presentación solicitud inicial:

**P 201490032 21.09.2012**

71 Solicitantes:

**UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH  
FOUNDATION, INC. (100.0%)  
223 Grinter Hall  
Gainesville US**

72 Inventor/es:

**DAWSON, William O.;  
FOLIMONOVA, Svetlana Y. y  
EL-MOHTAR, Choa**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **Vectores basados en el virus de la tristeza de los cítricos para la expresión de gen(es) exógeno(s)**

57 Resumen:

Vectores basados en el virus de la tristeza de los cítricos para la expresión de gen(es) exógeno(s). En el presente documento se divulgan vectores víricos basados en modificaciones del virus de la tristeza de los cítricos útiles para transfectar árboles cítricos para fines beneficiosos. Se incluyen en la divulgación vectores víricos que incluyen uno o más casetes génicos que codifican polipéptidos heterólogos. Los casetes génicos están colocados en localizaciones deseables en el genoma vírico, tales como la región p23-3'NTR, de modo que se permita la expresión al tiempo que se conserva la funcionalidad del virus. También se divulgan métodos de transfectar plantas y plantas transfectadas con formas de realización del vector vírico.

**ES 2 714 393 A2**

## DESCRIPCIÓN

Vectores basados en el virus de la tristeza de los cítricos para expresión de gen(es) exógeno(s)

5

### Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud está relacionada con la solicitud provisional en EE UU No. 61/537.154 presentada el 21 de septiembre de 2011, de la que se reivindica prioridad según 35 USC  
10 119 y que se incorpora en el presente documento mediante referencia.

### Antecedentes

El desarrollo temprano de vectores víricos se dirigía a la producción económica de altos  
15 niveles de proteínas especializadas que se podría aumentar a escala en el campo. El primer intento de un vector vírico vegetal utilizó el virus del mosaico de la coliflor, un virus de ADNbc (Brisson et al., 1984; Gronenborn et al., 1981). Sin embargo, este vector era demasiado inestable para ser útil (Fütterer et al., 1990). El desarrollo de sistemas genéticos inversos susceptibles para manipulación de virus de ARN hizo muchos más virus candidatos  
20 para el desarrollo de vectores (Ahlquist et al., 1984).

Los vectores de virus son ingredientes clave en investigación básica y tienen gran potencial para aplicaciones comerciales. La falta de estabilidad de insertos exógenos ha sido un inconveniente principal para potenciales aplicaciones de vectores víricos para expresión de  
25 proteínas comerciales en aplicaciones de campo.

### Compendio

La presente divulgación se basa en múltiples estudios que prueban los límites de vectores  
30 usando CTV para expresar genes exógenos que varían de 806 a 3480 nucleótidos de tamaño. En una forma de realización, se introdujeron casetes de genes en el genoma de CTV como sustitución del gen p13. En otras formas de realización, se insertó un gen en diferentes localizaciones (por ejemplo, p13-p20, p20-p23 y p23-3'NTR (región no traducida)). En otra forma de realización, se probaron una fusión a p23 y procesamiento por proteasa.  
35 En formas de realización alternativas, se insertaron genes detrás de secuencias IRES para crear mensajeros bicistrónicos.

Se han creado y probado veintisiete vectores de expresión en protoplastos y plantas de *Nicotiana benthamiana*. Notablemente, la mayoría de las construcciones de vectores recién desarrolladas divulgadas en el presente documento se replicaron, se propagaron sistémicamente en plantas, y produjeron su(s) gen(es) exógeno(s). Los vectores con expresión más alta incluyen las construcciones de “añadir un gen” que tienen una inserción entre los genes p13 y p20 o entre el gen p23 y la 3’NTR. De forma similar, los vectores con el gen insertado sustituyendo al gen p13 expresaron eficazmente diferentes genes indicadores. Sin embargo, la expresión óptima del gen indicador dependía tanto del tamaño como de la localización de la inserción. La expresión óptima de genes más pequeños es desde posiciones más cercanas al extremo 3’, mientras que los genes más grandes se expresan óptimamente desde posiciones más internas.

La expresión eficaz de dos genes simultáneamente desde el mismo vector se ha logrado tanto en *N. benthamiana* como en cítricos. Las construcciones de CTV novedosas divulgadas en el presente documento tienen genomas con elasticidad única capaces de acomodar y expresar gen/es exógeno/s mediante diferentes estrategias.

Manipular un vector eficaz requiere un equilibrio entre diferentes factores. Se necesita diseñar el vector de modo que la replicación y movimiento sistémico en la planta se reduzcan mínimamente mientras que el nivel de expresión de la proteína exógena sea máximo (Shivprasad et al., 1999). El factor final es la estabilidad del vector. En general, la utilidad del vector se correlaciona directamente con su estabilidad. La estabilidad es un producto de recombinación reducida y competitividad aumentada del vector con los recombinantes resultantes que han perdido parte o todo de las secuencias insertadas.

### Breve descripción de las figuras

**FIG. 1.** Sustitución de p13 por GFP para producir vectores de expresión basados en CTV. (A) Representación esquemática de CTV9RΔp33: las cajas representan los marcos abiertos de lectura; las cajas LP1, LP2, MT, IDR, HEL, y RdRP representan el bloque de genes de replicación mientras que las cajas p6, Hsp70h, p61, CPm y CP representan el bloque de genes conservados de closterovirus (Karasev, 2000); el círculo negro y las cajas p20 y p23 representan supresores de silenciamiento (Lu et al., 2004); las cajas Δp33, p18 y p13 representan genes dispensables para la infección de algunos genotipos de cítricos (Tatineni et al., 2008); el rectángulo de relleno negro representa la delección de los elementos

controladores y ORF de p33 (nt 10858-11660 Acceso de Genbank # AY170468) (Satyanarayana et al., 1999; 2000; 2003)); las flechas indican el procesamiento de las proteasas líder de CTV. Se indican LP1 y LP2 (dos proteasas líder en tándem), MT (metiltransferasa), Hel (helicasa), RdRp (ARN polimerasa dependiente de ARN,  $\Delta$ p33 (delección de la secuencia de la proteína de 33 kda), p6 (proteína de 6 kda), Hsp70h (homólogo de la proteína de choque térmico 70), p61 (proteína de 61 kda), CPm (proteína de cubierta menor), CP (proteína de cubierta principal, supresor de silenciamiento intercelular), p18 (proteína de 18 kda), p13 (proteína de 13 kda), p20 (proteína de 20 kda, supresor de silenciamiento inter/intracelular), y p23 (proteína de 23 kda, supresor de silenciamiento intracelular). Se muestra la modificación para producir los vectores de expresión CTV33- $\Delta$ 13-BY-GFP-57 (C57), CTV33- $\Delta$ 13-G-GFP-65 (C65), CTV33- $\Delta$ 13-B-GFP-66 (C66) con la CP-CE de BYSV, GLRaV-2 y BYV dirigiendo GFP, respectivamente. (B) Análisis por transferencia Northern de CTV de tipo salvaje (WT) y vector de expresión basado en CTV transfectado en protoplastos de *N. benthamiana* (T) y pasados a un nuevo conjunto de protoplastos (P). (C) Muestra representativa de fluorescencia en *N. benthamiana* infectada con la construcción CTV33- $\Delta$ 13-BY-GFP-57 aumentada en un estereoscopio fluorescente. Muestras representativas de fluorescencia en *N. benthamiana* infectada con CTV33- $\Delta$ 13-G-GFP-65, y CTV33- $\Delta$ 13-B-GFP-66 (no mostradas) presentan el mismo resultado. (D) Muestra representativa de fluorescencia en el floema de trozos de corteza de cítricos infectados con la construcción CTV33- $\Delta$ 13-G-GFP-65 a muchos (izquierda) y pocos (derecha) aumentos en un estereoscopio fluorescente. Muestra representativa de fluorescencia en el floema de trozos de corteza de cítrico infectados con la construcción CTV33- $\Delta$ 13-B-GFP-66 (no mostrada) presenta el mismo resultado.

**FIG. 2.** Sustitución de p13 por GUS para producir vectores de expresión basados en CTV. (A) Representación esquemática de CTV9R $\Delta$ p33 y su modificación creando el vector de expresión CTV33- $\Delta$ 13-BY-GUS-61 en el que p13 y su elemento controlador se sustituye por GUS bajo control de CP-CE de BYSV. (B) Análisis de hibridación por transferencia Northern de CTV de tipo salvaje (WT) y del vector de expresión basado en CTV CTV33- $\Delta$ 13-BY-GUS-61 (C61) transfectado en protoplastos de *N. benthamiana* (T) y pasados a un nuevo conjunto de protoplastos (P). (C) Muestra representativa de actividad GUS en trozos de corteza de árboles de cítricos infectados con la construcción CTV33- $\Delta$ 13-BY-GUS-61 (derecha) y la solución de GUS antes de fijar los trozos de corteza (izquierda) (A = control sano, B = infectado).

35



**FIG. 3.** Inserción de GFP entre p13 y p20 para producir vectores de expresión basados en CTV. (A) Representación esquemática de CTV9RΔp33 y su modificación insertando entre p13 y p20 la ORF de GFP bajo el control de BYSV creando el vector de expresión CTV33-13-BY-GFP-69 (B) Análisis de hibridación por transferencia Northern de protoplasto transfectado con el virus de tipo salvaje (WT) y con el vector de expresión CTV33-13-BY-GFP-69 (C69) de transcritos (T) y sus pases (P). Muestra representativa de fluorescencia en *N. benthamiana* (C) y trozos de floema de corteza pelada de *C. macrophylla* (D) infectados con CTV33-13-BY-GFP-69 aumentado en un estereoscopio fluorescente.

**FIG. 4.** Inserción de GFP entre p20 y p23 para producir vectores de expresión basados en CTV. (A) Representación esquemática de CTV9RΔp33 y su modificación para producir los vectores de expresión CTV33-20-B-GFP-49 y CTV33-20-BY-GFP-58, respectivamente. (B) Análisis de hibridación por transferencia Northern de protoplasto transfectado con el virus de tipo salvaje (WT) y los vectores de expresión CTV33-20-B-GFP-49 (C49) y CTV33-20-BY-GFP-58 (C58) de transcritos (T) y sus pases (P). (C) Fluorescencia bajo luz UV de protoplasto (izquierda) y la hoja (derecha) que muestra la falta de movimiento eficaz del vector. (D) Análisis por inmunotransferencia del mismo gen insertado en localizaciones diferentes en el genoma de CTV. Se indican BCN5 (Folimonov et al., 2007) que es el vector CTV original (contiene GFP bajo el promotor BYV entre CPm y CP), y las construcciones CTV33-23-BY-GFP-37 (C37, inserción de BYSV que dirige GFP detrás de p23), CTV33-20-BY-GFP-58 (C58, inserción de BYSV que dirige GFP entre p20 y p23), CTV33-13-BY-GFP-69 (C69, inserción de BYSV que dirige GFP entre p13 y p20), CTV33-Δ13-BY-GFP-57(C57, sustitución del gen p13 con CP-CE de BYSV dirigiendo GFP) y CTV33-27-BY-GFP-63 (C63, inserción de CP-CE de BYSV dirigiendo el ORF de GFP entre CPm y CP).

**FIG. 5.** Inserción de GFP entre p23 y 3'NTR para producir vectores de expresión basados en CTV. (A) Representación esquemática de CTV9RΔp33 y su modificación por inserción de GFP detrás de p23 bajo el control de CP-CE de BYSV, GLRaV-2 y BYV creando los vectores de expresión CTV33-23-BY-GFP-37 (C37), CTV33-23-G-GFP-40 (C40) y CTV33-23-B-GFP-42 (C42), respectivamente. (B) Análisis de hibridación por transferencia Northern de protoplasto transfectado con el virus de tipo salvaje (WT) y con los vectores de expresión CTV33-23-BY-GFP-37, CTV33-23-G-GFP-40 y CTV33-23-B-GFP-42 de transcritos (T) y sus pases (P). (C) Muestra representativa de fluorescencia en *N. benthamiana* infectada con la construcción CTV33-23-BY-GFP-37 aumentada en un estereoscopio fluorescente. Muestras representativas de fluorescencia en *N. benthamiana* infectada con CTV33-23-G-GFP-40 y CTV33-23-B-GFP-42 aumentadas bajo un estereoscopio fluorescente (no mostradas)

presentan el mismo resultado. (D) Muestra representativa de fluorescencia en el tejido de floema de *Citrus macrophylla* infectado con la construcción CTV33-23-BY-GFP-37. Muestras representativas de fluorescencia en el tejido de floema de *Citrus macrophylla* infectada con CTV33-23-G-GFP-40 (no mostradas) presentan el mismo resultado.

5

**FIG. 6.** Inserción de GUS entre p23 y 3'NTR para producir vectores de expresión basados en CTV. (A) Representación esquemática de CTV9RΔp33 y su modificación por inserción del ORF de GUS bajo el control de CP-CE de BYSV entre p23 y 3'NTR creando el vector de expresión CTV33-23-BY-GUS-60 (C60). (B) Análisis de hibridación por transferencia Northern de protoplasto transfectado con el virus de tipo salvaje (WT) y con los vectores de expresión CTV33-23-BY-GUS-60 de transcritos (T). (C) Actividad enzimática de la proteína GUS en tejido de *N. benthamiana* y trozos de floema de corteza de cítricos (la coloración oscura indica planta infectada y el tejido y solución incoloros indican controles sanos) y solución de GUS sometida al mismo tratamiento.

15

**FIG. 7.** GFP insertado detrás de secuencias IRES para crear vectores de expresión basados en CTV. (A) Representación esquemática de CTV9RΔp33 y CTVΔCia 333R y su modificación detrás de p23 creando los vectores de expresión CTV33-23-ITEV-GFP-41 y CTV33-23-I3XARC-GFP-43, que representan la IRES 5'NTR de TEV y la IRES 3xARC-1, respectivamente; y de CTVp333R-23-ITEV-GFP y CTVp333R-23-I3XARC-GFP que representan la IRES 5'NTR de TEV y la IRES 3xARC-1, respectivamente. (B) 1 - Análisis de hibridación por transferencia Northern de protoplasto de *N. benthamiana* transfectado con virus de tipo salvaje (WT), CTV33-23-ITEV-GFP-41 (C41) y CTV33-23-I3XARC-GFP-43 (C43); T = ARN aislado de protoplasto transfectado con transcrito y P = ARN aislado de protoplasto transfectado con virión aislado de protoplasto transfectado con ARN. 2 - Análisis de hibridación por transferencia Northern de protoplasto transfectado con CTVp333R-23-ITEV-GFP (Carril A); CTVp333R-23-I3XARC-GFP (carril B), CTVp333R (carril C) y CTVp333R-23-B-GFP (CP-CE de BYV dirige la expresión de GFP detrás de p23) (carril D).

**FIG. 8.** GFP y una proteasa fusionados a p23 para crear vectores de expresión basados en CTV. (A) Representación esquemática de CTV9RΔp33 y las modificaciones fusionando dos proteasas de TEV (Nla y HC-Pro) y sus secuencias de reconocimiento para crear los vectores de expresión CTV33-23-HC-GFP-72, CTV33-23-Nla-GFP-73, CTV33-23-HCØ-GFP-74 y CTV33-23-NlaØ-GFP-75.

35

**FIG. 9** Comparación de fluorescencia en *N. benthamiana*. (A) Comparación de fluorescencia en hojas infiltradas de muestras representativas de las construcciones CTV33-23-HC-GFP-72 (GFP fusionado) y CTV33-23-BY-GFP-37 (GFP libre) bajo luz UV de mano (derecha) y las mismas hojas bajo luz blanca (izquierda). Muestras representativas (no mostradas) de CTV33-23-NIa-GFP-73, CTV33-23-HCØ-GFP-74 y CTV33-23-NIaØ-GFP-75 (GFP fusionado), y de CTV33-23-G-GFP-40 y CTV33-23-B-GFP-42 (GFP libre) presentan el mismo resultado. (B) Comparación a nivel de planta entera entre muestras representativas de la construcción CTV33-23-HC-GFP-72 (GFP fusionado) y CTV33-23-BY-GFP-37 (GFP bajo su propio elemento controlador detrás de p23 (GFP libre)) bajo luz UV de mano (derecha) y las mismas plantas bajo luz blanca (izquierda). Muestras representativas (no mostradas) de la construcción CTV33-23-NIa-GFP-73 (GFP fusionada) y de las construcciones CTV33-23-G-GFP-40 y CTV33-23-B-GFP-42 (GFP libre) presentan el mismo resultado. (C) Comparación entre las superficies de hoja abaxial (inferior) y adaxial (superior) de la misma muestra de hoja representativa de la construcción CTV33-23-HC-GFP-72 bajo luz UV de mano (derecha) y luz blanca (izquierda). Muestras representativas de CTV33-23-NIa-GFP-73 (no mostradas) presentan el mismo resultado.

**FIG. 10** Análisis por inmunotransferencia de diferentes vectores de expresión infiltrados en hojas de *N. benthamiana* usando anticuerpo contra GFP. A= CTV9RΔp33GFP (GFP insertado bajo el elemento controlador CP-CE de BYV entre CPm y CP (produce GFP libre) (Tatineni et al., 2008)), B= CTV33-23-BY-GFP-HC-GUS-51, C= CTV33-23-G-GFP-NIa-GUS-54, D= pocillo vacío; E= CTV33-Δ13-BY-GFP-NIa-GUS-78, F= CTV33-23-HC-GFP-72, G= CTV33-23-NIa-GFP-73.

**FIG. 11** Sustitución de p13 por un gen híbrido (fusión GFP/proteasa/GUS) para crear vectores de expresión. (A) Representación esquemática de CTV9RΔp33 y su modificación para crear los vectores de expresión CTV33-Δ13-BYGFP-HC-GUS-77 y CTV33-Δ13-BYGFP-NIa-GUS-78 con los dos genes fusión bajo el control de CP-CE de BYSV, con HC-Pro y NIa de TEV abarcadas por su secuencia de reconocimiento de proteólisis separando GFP y GUS, respectivamente. (B) Actividad de genes indicadores en *N. benthamiana* y *Citrus macrophylla*. (a.) Muestra representativa de planta de *N. benthamiana* infectada con CTV33-Δ13-BYGFP-NIa-GUS-78. *N. benthamiana* bajo luz blanca y (b.) la misma planta bajo luz UV (c.) Dos imágenes de floema de trozos de corteza pelada de *C. macrophylla* infectado con la construcción CTV33-Δ13-BYGFP-NIa-GUS-78 en un estereoscopio fluorescente. (d.) Muestra representativa de actividad GUS en hojas de *N. benthamiana* sistémicas, hoja control (izquierda) y hoja infectada (derecha) (e.) Trozos de floema de

corteza pelada y solución GUS de planta *C. macrophylla* sana (f.) Trozos de floema de corteza pelada y solución GUS de planta *C. macrophylla* infectada con la construcción CTV33- $\Delta$ 13-BYGFP-NIa-GUS-78. Muestras representativas de una planta de *N. benthamiana* infectada con CTV33- $\Delta$ 13-BYGFP-HC-GUS-77 (no mostradas) presentan los mismos resultados.

**FIG. 12** Estabilidad de las construcciones en *N. benthamiana*. (A) Hoja superior de plantas de *N. benthamiana* agro-inoculadas que portan el vector binario CTV33- $\Delta$ 13-BYGFP-HC-GUS-77 (GFP/HC-Pro/GUS) fotografiadas en el microscopio fluorescente. (B) La misma hoja se ensayó para actividad GUS indicando un solapamiento casi perfecto entre los dos genes indicadores.

**FIG. 13** Gen híbrido (fusión GFP/proteasa/GUS) entre p23 y 3'NTR para crear vectores de expresión. (A) Representación esquemática de CTV9R $\Delta$ p33 y su modificación para producir los vectores de expresión CTV33-23-BY-GFP-HC-GUS-51 y CTV33-23-BY-GFP-NIa-GUS-52, que tienen el CP-CE de BYSV dirigiendo los genes híbridos que contienen las proteasas HC-Pro y NIa respectivamente; CTV33-23-G-GFP-HC-GUS-53 (C53) y CTV33-23-G-GFP-NIa-GUS-54 (C54), que tienen genes de fusión dirigidos por GLRaV-2 que contienen las proteasas HC-Pro y NIa, respectivamente; y CTV33-23-B-GFP-HC-GUS-55 (C55) y CTV33-23-B-GFP-NIa-GUS-56 (C56), que tienen genes de fusión dirigidos por BYV que contienen las proteasas HC-Pro y NIa, respectivamente. (B) Análisis de hibridación por transferencia Northern de protoplasto transfectado con virus de tipo salvaje (WT), y con las construcciones C53, C54, C55 y C56.

**FIG. 14** Actividad de genes indicadores generados por inserción del gen híbrido (fusión GFP/proteasa/GUS) detrás de p23. (A) Actividad de los genes indicadores en plantas de *N. benthamiana* (a.) Muestra representativa de planta de *N. benthamiana* infectada con CTV33-23-BY-GFP-HC-GUS-51 bajo luz blanca y (b.) la misma planta bajo luz UV de mano. (c.) Muestra representativa de actividad GUS en hojas sistémicas infectadas de *N. benthamiana* y hojas control (los tubos 1&2 representan la solución antes de fijar y tejidos en solución de fijación, respectivamente de hojas sanas mientras que 3&4 representan la solución y tejidos de hojas infectadas, respectivamente, el tubo G es el tampón de ensayo GUS. Muestras representativas de plantas de *N. benthamiana* infectadas con CTV33-23-G-GFP-HC-GUS-53, CTV33-23-BY-GFP-NIa-GUS-52 o CTV33-23-G-GFP-NIa-GUS-54 (no mostradas) presentan el mismo resultado. (B) Actividad de genes indicadores en *C. macrophylla* (a.) Imagen de trozos de floema de corteza pelada de *C. macrophylla* infectada con la

construcción CTV33-23-BY-GFP-HC-GUS-51 en un estereoscopio fluorescente (b.)  
 Actividad GUS de trozos de floema de corteza pelada en plantas de *C. macrophylla*  
 infectadas y sanas (los tubos 1&2 representan la solución y tejidos en solución de fijación de  
 hojas sanas mientras que 3&4 representan la solución y tejidos de hojas infectadas,  
 5 respectivamente.

**FIG. 15** Prueba de concepto de complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC). (A)  
 Representación esquemática del replicón CTV $\Delta$  Cla 333R (Gowda et al., 2001,  
 Satyanarayana et al., 2003) y su modificación para crear replicones de expresión: (a.)  
 10 Inserción de ambos genes BiFC entre p23 y 3'NTR dando lugar a CTVp333R-23-BYbJunN-  
 GbFosC y los controles con un gen detrás de p23, CTVp333R-23-BYbJunN(b.) o  
 CTVp333R-23-GbFosC(c.). (B) Análisis de hibridación por transferencia Northern de  
 protoplasto transfectado con CTVp333R-23-BYbJunN-GbFosC (carril a.), CTVp333R-23-  
 BYbJunN (carril c.) y CTVp333R-23-GbFosC (carril b.). (C) Fluorescencia de un protoplasto  
 15 transfectado cuando se fotografía en un estereoscopio (superior) o microscopio confocal de  
 barrido láser (inferior) que indica la fluorescencia del núcleo.

**FIG. 16** Sustitución con genes BiFC de p13 para producir vectores de expresión basados en  
 CTV. (A) Representación esquemática de CTV9R $\Delta$ p33 y su modificación para producir el  
 20 vector CTV33- $\Delta$ 13-BYbJunN-GbFosC-76 y los vectores control CTV33-23-G-bFosC-98 y  
 CTV33-23-BY-bJunN-97 (inserción detrás de p23 nts 19020-19021). (B) Muestra  
 representativa de fluorescencia en *N. benthamiana* en plantas sistémicamente infectadas  
 con CTV33- $\Delta$ 13-BYbJunN-GbFosC-76.

**FIG. 17** Vector de expresión basado en CTV construido para expresar simultáneamente dos  
 genes bajo dos elementos controladores. (A) Representación esquemática de CTV9R $\Delta$ p33 y  
 su modificación para producir los vectores de expresión CTV33-23-BYbJunN-GbFosC-59 y  
 CTV33- $\Delta$ 13-BYbJunN-23-GbFosC-67. (B) Análisis de hibridación por transferencia Northern  
 de protoplasto transfectado con ARN con el virus de tipo salvaje (WT,T), dos clones de  
 30 CTV33- $\Delta$ 13-BYbJunN-23-GbFosC-67 (C67, T1 y T2) y dos clones de CTV33-23-BYbJunN-  
 GbFosC-59 (C59, T3 y T4) detectados mediante la sonda 3'NTR+p23 (Satyanarayana et al.,  
 1999). (C) Fluorescencia de partes de plantas de *N. benthamiana* en un estereomicroscopio  
 fluorescente (CTV33-23-BY-bJunN-Gb-FosC-59 = a., b., c. y d; CTV33- $\Delta$ 13-BYbJunN-23-  
 GbFosC-67= e.) (a.) yema (b.) corola, (c.) hojas sistémicas, (d.) trozos de floema de corteza  
 35 pelada y (e.) hoja infiltrada.

**FIG. 18** Vectores de expresión basados en CTV contruidos para expresar simultáneamente dos genes bajo dos elementos controladores. (A) Representación esquemática de CTV9R $\Delta$ p33 y su modificación para producir los vectores de expresión CTV33- $\Delta$ 13-BYGUS-23-GGFP-71. (B) Análisis de hibridación por transferencia Northern de protoplasto transfectado con ARN con el virus de tipo salvaje (WT) y el vector de expresión CTV33- $\Delta$ 13-BYGUS-23-GGFP-71 (C71) detectados mediante la sonda 3'NTR+p23 (Satyanarayana et al., 1999). (C) Actividad biológica de genes indicadores en *N. benthamiana* y Citrus. Planta de *N. benthamiana* bajo luz blanca (a.) y luz ultravioleta de mano (b.). (c.) Actividad GUS de *N. benthamiana* sana (tubo 1 (solución de ensayo) & 2 (tejido) e infectada (tubo 3 (solución de ensayo y tubo 4 (tejido)). (d.) Trozos de floema de corteza pelada bajo microscopio fluorescente y (e.) actividad del ensayo GUS en cítricos similar a (c.).

**FIG. 19** Análisis por inmunotransferencia de las diferentes construcciones en cítrico para evaluar la expresión de GFP y GUS. (A) Anticuerpos contra GFP y CP, respectivamente, usados para determinar el nivel de expresión de GFP relativo a CP en planta 708 de cítrico infectada con  $\Delta$ p33CTV9R (Tatineni et al., 2008), planta 1808 infectada con BCN5 (Folimonov et al., 2007), planta 1916 infectada con CTV33-23-G-GFP-40, planta 1874 infectada con CTV33-23-BY-GFP-37, plantas 1934, 1935 y 1937 infectadas con CTV33-13-BY-GFP-69, y plantas 1931 y 1939 infectadas con la construcción CTV33- $\Delta$ 13-G-GFP-65 y CTV33- $\Delta$ 13-B-GFP-66, respectivamente. (B) Anticuerpos contra GUS y CP, respectivamente, usados para determinar el nivel de expresión de GUS relativo a CP en plantas 2084, 2085, 2086 y 2087 de cítrico infectadas con la construcción CTV33- $\Delta$ 13-BYGUS-61, planta 2132 infectada con la construcción CTV33-23-BYGUS-60 y planta 2096 infectada con el vector de expresión CTV33- $\Delta$ 13-BYGFP-NIa-GUS-78, E= pocillo vacío y tampón = -iveC.

**FIG. 20** Vector de expresión basado en CTV construido para expresar simultáneamente cuatro genes de cuatro elementos controladores. (A) Representación esquemática de CTV9R. (B) Modificación de CTV9R para crear el vector de expresión CTV $\Delta$ 13-BRFP-GbFosC-BYbJunN-CTMVCP-118 que expresa 4 genes de localizaciones diferentes en el genoma de CTV. El primer gen es el gen de la proteína fluorescente roja (tagRFP) expresada de entre las proteínas de cubierta menor y principal bajo el control del elemento controlador de la proteína de cubierta (CP-CE) del virus del amarilleo de la remolacha (BYV), el segundo y el tercer genes son los factores de transcripción de mamíferos truncados bFos y bJun fusionados al extremo C-terminal y N-terminal de EYFP (Hu et al., 2002) bajo el control de virus asociado al enrollamiento de la hoja de la vid 2 (GLRaV-2) y

CP-CE del virus del enanismo amarillo de la remolacha (BYSV) respectivamente sustituyendo el gen p13 y el cuarto gen es la proteína CP de TMV expresado desde detrás de p23 bajo el control de CP-CE principal duplicada de CTV.

5 **FIG. 21** Vector de expresión basado en CTV construido para expresar simultáneamente tres genes de tres elementos controladores. (A) Representación esquemática de CTV9R. (B) Modificación de CTV9R para crear el vector de expresión CTV $\Delta$ 13-GbFosC-BYbJunN-CTMVCP-129 que expresa 3 genes de localizaciones diferentes en el genoma de CTV. El primer y segundo genes son los factores de transcripción de mamíferos truncados bFos y bJun fusionados al extremo C-terminal y N-terminal de EYFP (Hu et al., 2002) bajo el control de virus asociado al enrollamiento de la hoja de la vid 2 (GLRaV-2) y CP-CE del virus del enanismo amarillo de la remolacha (BYSV) respectivamente sustituyendo el gen p13 y el cuarto gen es CP de TMV expresado desde detrás de p23 bajo el control de CP-CE principal duplicada de CTV.

15

**FIG. 22** Vector de expresión basado en CTV construido para expresar simultáneamente tres genes de tres elementos controladores. (A) Representación esquemática de CTV9R. (B) Modificación de CTV9R para crear el vector de expresión CTV-BRFP-BYGFP-CTMVCP-117 que expresa 3 genes de localizaciones diferentes en el genoma de CTV. El primer gen es el gen de la proteína fluorescente roja (tagRFP) expresada de entre las proteínas de cubierta menor y principal bajo el control del elemento controlador de la proteína de cubierta (CP-CE) del virus del amarilleo de la remolacha (BYV), el segundo gen es la proteína fluorescente verde (GFPC3) bajo el control de CP-CE del virus del enanismo amarillo de la remolacha (BYSV) insertado entre los genes p13-p20 y el tercer gen es CP de TMV expresado desde detrás de p23 bajo el control de CP-CE principal duplicada de CTV.

25

**FIG. 23** Vector de expresión basado en CTV construido para expresar simultáneamente tres genes de tres elementos controladores. (A) Representación esquemática de CTV9R. (B) Modificación de CTV9R para crear el vector de expresión CTV-BASL-BYPTA-CP7-119 que expresa 3 genes de diferentes localizaciones en el genoma de CTV. El primer gen es una lectina de *Allium sativum* (ASL) expresada de entre las proteínas de cubierta menor y principal bajo el control del elemento controlador de la proteína de cubierta (CP-CE) del virus del amarilleo de la remolacha (BYV), el segundo gen es una aglutinina de *Pinellia ternata* (PTA) bajo el control de CP-CE del virus del enanismo amarillo de la remolacha (BYSV) insertado entre los genes p13-p20 y el tercer gen es un péptido antimicrobiano de

35

Tachypleus tridentatus (P7) expresado desde detrás de p23 bajo el control de CP-CE principal duplicada de CTV.

**FIG. 24** Vector de expresión basado en CTV construido para expresar simultáneamente tres genes de tres elementos controladores. (A) Representación esquemática de CTV9R. (B) Modificación de CTV9R para crear el vector de expresión CTV-BASL-BYPTA-CP10-120 que expresa 3 genes de diferentes localizaciones en el genoma de CTV. El primer gen es una lectina de *Allium sativum* (ASL) expresada de entre las proteínas de cubierta menor y principal bajo el control del elemento controlador de la proteína de cubierta (CP-CE) del virus del amarilleo de la remolacha (BYV), el segundo gen es una aglutinina de *Pinellia ternata* (PTA) bajo el control de CP-CE del virus del enanismo amarillo de la remolacha (BYSV) insertado entre los genes p13-p20 y el tercer gen es un péptido antimicrobiano de *Sus scorfa* (P10) expresado desde detrás de p23 bajo el control de CP-CE principal duplicada de CTV.

**FIG. 25** Vector de expresión basado en CTV construido para expresar simultáneamente tres genes de tres elementos controladores. (A) Representación esquemática de CTV9R. (B) Modificación de CTV9R para crear el vector de expresión CTV-BASL-BYP10-CP7-131 que expresa 3 genes de diferentes localizaciones en el genoma de CTV. El primer gen es una lectina de *Allium sativum* (ASL) expresada de entre las proteínas de cubierta menor y principal bajo el control del elemento controlador de la proteína de cubierta (CP-CE) del virus del amarilleo de la remolacha (BYV), el segundo gen es un péptido antimicrobiano de *Sus scorfa* (P10) bajo el control de CP-CE del virus del enanismo amarillo de la remolacha (BYSV) insertado entre los genes p13-p20 y el tercer gen es un segundo péptido antimicrobiano de *Tachypleus tridentatus* (P7) expresado desde detrás de p23 bajo el control de CP-CE principal duplicada de CTV.

**FIG. 26** Vector de expresión basado en CTV construido para expresar simultáneamente tres genes de tres elementos controladores. (A) Representación esquemática de CTV9R $\Delta$ p33. (B) Modificación de CTV9R $\Delta$ p33 para crear el vector de expresión CTV33-BGFP-BYGUS-GTMVCP-79 que expresa 3 genes de diferentes localizaciones en el genoma de CTV. El primer gen es una proteína fluorescente verde expresada de entre las proteínas de cubierta menor y principal bajo el control del elemento controlador de la proteína de cubierta (CP-CE) del virus del amarilleo de la remolacha (BYV), el segundo gen es un gen de  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) de *Escherichia coli* bajo el control de CP-CE del virus del enanismo amarillo de la remolacha (BYSV) insertado entre los genes p13-p20 y el tercer gen es la CP de TMV



expresado desde detrás de p23 bajo el control de CP-CE del virus asociado al enrollamiento de la hoja de la vid 2 (GLRaV-2).

**FIG. 27** Vector de expresión basado en CTV construido para expresar simultáneamente cuatro genes de cuatro elementos controladores. (A) Representación esquemática de CTV9R $\Delta$ p33. (B) Modificación de CTV9R $\Delta$ p33 para crear el vector de expresión CTV33-BGFP-GbFosC-BYbJunN-81 que expresa 3 genes de diferentes localizaciones en el genoma de CTV. El primer gen es el gen de la proteína fluorescente verde (GFPC3) expresado de entre las proteínas de cubierta menor y principal bajo el control del elemento controlador de la proteína de cubierta (CP-CE) del virus del amarilleo de la remolacha (BYV), el segundo y tercer genes son los factores de transcripción de mamíferos truncados bFos y bJun fusionados al extremo C-terminal y N-terminal de EYFP (Hu et al., 2002) bajo el control de virus asociado al enrollamiento de la hoja de la vid 2 (GLRaV-2) y CP-CE del virus del enanismo amarillo de la remolacha (BYSV) respectivamente. Los genes bFosC y bJunN se insertan detrás del gen de p23.

**FIG. 28** Vector de expresión basado en CTV construido para expresar simultáneamente cuatro genes de cuatro elementos controladores. (A) Representación esquemática de CTV9R $\Delta$ p33. (B) Modificación de CTV9R $\Delta$ p33 para crear el vector de expresión CTV33- $\Delta$ 13-BGFP-BYbJunN-GbFosC-82 que expresa 3 genes de diferentes localizaciones en el genoma de CTV. El primer gen es el gen de la proteína fluorescente verde (GFPC3) expresado de entre las proteínas de cubierta menor y principal bajo el control del elemento controlador de la proteína de cubierta (CP-CE) del virus del amarilleo de la remolacha (BYV), el segundo gen es el factor de transcripción de mamíferos truncado bJun al extremo N-terminal de EYFP (bJunN) (Hu et al., 2002) bajo el control de CP-CE del virus del enanismo amarillo de la remolacha (BYSV) sustituyendo al gen p13 de CTV y el tercer es el factor de transcripción de mamíferos truncado bFos fusionado el extremo C-terminal de EYFP (bFosC) bajo el control de CP-CE del virus asociado al enrollamiento de la hoja de la vid 2 (GLRaV-2) insertado detrás de p23.

30

**FIG. 29** Imágenes de microscopía electrónica de tinción negativa de baños de hojas de hojas de *N. benthamiana* infiltradas. (A) Los baños de hojas de *N. benthamiana* infiltradas con la construcción CTV33-BGFP-BYGUS-GTMVCP-79 revelan la formación de viriones del vector CTV y pseudoviriones de TMV indicando la expresión del gen de la proteína de cubierta de TMV. (B) El baño de hojas de *N. benthamiana* infiltradas con la construcción CTV33- $\Delta$ 13-BGFP-BYbJunN-GbFosC-82 revela la formación de viriones.

35

### Descripción detallada

El desarrollo temprano de vectores víricos se dirigía a la producción económica de altos niveles de proteínas de especialidad que se podría aumentar a escala en el campo. El primer intento de un vector vírico vegetal utilizó el virus del mosaico de la coliflor, un virus de ADNbc (Brisson et al., 1984; Gronenborn et al., 1981). Sin embargo, este vector era demasiado inestable para ser útil (Fütterer et al., 1990). El desarrollo de sistemas genéticos inversos susceptibles para manipulación de virus de ARN hizo muchos más virus candidatos para desarrollo de vectores (Ahlquist et al., 1984). Hubo considerable controversia respecto al valor de virus de ARN para vectores (Siegel, 1983; 1985; Van Vloten-Dotting, 1983, Van Vloten-Dotting et al., 1985). Se argumentó que la falta de actividad correctora de las replicasas de virus de ARN produciría cambio de secuencia demasiado rápido para mantener las secuencias exógenas durante la replicación. Sin embargo, el posterior desarrollo y uso de vectores basados en virus de ARN demostró que esta preocupación era exagerada.

Los esfuerzos en curso han estado en marcha para crear vectores basados en virus para cítricos basado en el virus de la tristeza de los cítricos (CTV, *Citrus tristeza virus*). CTV tiene el mayor ARN descrito de un virus vegetal de aproximadamente 20 kb (Karasev et al., 1995; Pappu et al., 1994). Tiene dos bloques de genes conservados asociados con replicación y formación de viriones (Karasev, 2000). El bloque de genes de replicación ocupa la mitad 5' del genoma. Sus proteínas se expresan del ARN genómico a través de estrategia de poliproteínas con un cambio de fase ribosómico +1 para expresar ocasionalmente la ARN polimerasa dependiente de ARN (Karasev et al., 1995). Los viriones filamentosos de CTV se encapsidan por dos proteínas de cubierta, la proteína de cubierta principal (CP) encapsida aproximadamente el 97% del virión y los ~700 nts 5' encapsidados por la proteína de cubierta menor (CPm) (Satyanarayana et al., 2004). La formación de viriones es un proceso complejo que requiere dos proteínas (Hsp70h y p61) además de las proteínas de cubierta (Satyanarayana et al., 2000, 2004; Tatineni et al., 2010). Estos cuatro genes, así como los 6 genes restantes se expresan diferencialmente a través de un conjunto anidado de ARN subgenómicos (sg) coterminales 3' (Hilf et al., 1995). Antes de cada ORF hay un elemento controlador (CE) que determina el nivel de transcripción (Gowda et al., 2001). Los niveles de transcripción también están asociados con el sitio de inicio de transcripción +1 (Ayllón et al., 2003), la presencia de una región no traducida antes del ORF (Gowda et al., 2001), y la proximidad del ORF al extremo 3' (Satyanarayana et al., 1999).

Las primeras generaciones de vectores CTV examinaron tres estrategias diferentes que eran fusión del gen CP, inserción de un gen extra, y sustitución del ORF de p13 (Folimonov et al., 2007). La sustitución del ORF de p13 y fusión del ORF de la proteína de cubierta no produjeron vectores eficaces, pero la adición de un gen extra produjo vectores viables que producían cantidades relativas grandes de gen exógeno y eran estables en árboles de cítricos durante años. Sin embargo, los primeros esfuerzos en diseñar vectores basados en CTV examinaron solo unas pocas de las muchas posibilidades para expresar genes exógenos en este virus grande. En este trabajo, los inventores intentaron examinar las limitaciones de CTV a ser manipulado en un vector. Los inventores examinaron si el virus permitía inserciones en diferentes posiciones en el genoma y cuales produjeron expresión máxima con diferentes tamaños de insertos. Los inventores también examinaron si son viables diferentes estrategias de fusión con diferentes genes víricos y si se pueden expresar múltiples genes exógenos. Las construcciones de CTV divulgadas en el presente documento son increíblemente tolerantes a manipulación en varias posiciones en el genoma lo que da una multitud de diferentes estrategias de vector que son viables.

Una vez el cítrico se infecta con un vector CTV que contienen un gen exógeno, es fácil mover el vector a otros árboles cítricos mediante injerto. Sin embargo, una limitación del sistema de vectores CTV es la dificultad de infectar inicialmente cítricos con las nuevas construcciones de vectores. Inocular directamente cítricos de los clones de ADNc, ya sea por agro-inoculación, bombardeo de partículas, o inoculación mecánica con transcritos de ARN es extremadamente difícil e impredecible (Gowda et al., 2005; Satyanarayana et al., 2001). Una alternativa ha sido inocular con viriones purificados de protoplastos de *Nicotiana benthamiana* (Folimonov et al., 2007; Robertson et al., 2005; Satyanarayana et al., 2001; Tatineni et al., 2008). Sin embargo, se ha alcanzado la infección de solo aproximadamente el 0,01-0,1% de protoplastos con ARN transcrito *in vitro* (Satyanarayana et al., 2001). Con todo, puesto que los viriones son mucho más infecciosos para los protoplastos que el ARN (Navas-Castillo et al., 1997), los inventores fueron capaces de amplificar la infección por pase secuencial en protoplastos (Folimonov et al., 2007; Robertson et al., 2005; Satyanarayana et al., 2001; Tatineni et al., 2008). Aunque factible, este es un sistema extremadamente difícil. Los inventores son ahora capaces de agro-inocular plantas de *N. benthamiana* que produce infección sistémica. Este resultado permite el análisis de construcciones de vectores más rápidamente en estas plantas y proporciona cantidades copiosas de virus recombinantes para la inoculación de cítricos. Por tanto, los inventores

describen la actividad de las diferentes construcciones de vectores en *N. benthamiana* y Citrus.

5 Según una forma de realización, la invención se refiere a un vector vírico de CTV manipulado para comprender un casete génico que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido heterólogo. El casete génico está localizado en una posición diana en el genoma de CTV. En una forma de realización más específica, el vector vírico de CTV está manipulado de forma que el casete génico está colocado en las regiones del genoma de CTV p13-p20, p20-p23 o p23-3'NTR. En otras formas de realización, el vector vírico de CTV  
10 está manipulado para incluir múltiples genes en una o múltiples posiciones. Se muestra en el presente documento que vectores víricos de CTV se pueden manipular con éxito para incluir hasta 3 o al menos 4 genes que son expresables por el vector, mientras se mantiene la apropiada función e infectividad del vector.

15 En formas de realización relacionadas, la invención se refiere a una planta que incluye al menos una célula transfectada con el vector vírico de CTV manipulado para comprender un casete génico que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido heterólogo, el vector vírico de CTV manipulado de tal manera que uno o más casetes génicos están colocados en las regiones del genoma de CTV p13-p20, p20-p23 o p23-3'NTR. Otras formas  
20 de realización relacionadas se refieren a métodos de expresar al menos un polipéptido heterólogo en una planta infectando la planta con el vector especificado.

En una forma de realización adicional, la invención se dirige a un vector vírico de CTV manipulado para comprender al menos un casete génico que incluye un polinucleótido que  
25 codifica un polipéptido heterólogo, en donde el vector vírico de CTV manipulado de modo que el casete génico se inserta en lugar del gen p13 de CTV. En formas de realización relacionadas, la invención se refiere a una planta que incluye al menos una célula transfectada con el vector vírico de CTV o a métodos de expresar el polipéptido heterólogo en una planta infectando la planta con el vector especificado.

30 En otra forma de realización, la invención se refiere a un vector vírico de CTV manipulado para comprender al menos un casete génico que incluye un polinucleótido que codifica un polipéptido heterólogo y secuencia IRES conjugada al mismo. En formas de realización relacionadas, la invención se refiere a una planta que incluye al menos una célula  
35 transfectada con el vector vírico de CTV o a métodos de expresar el polipéptido heterólogo en una planta infectando la planta con el vector especificado.

En formas de realización adicionales, la invención se refiere a un vector vírico de CTV manipulado para comprender una secuencia de polinucleótido con codones de aminoácidos continuos que se extienden desde el ORF de p23 que codifican un primer polipéptido heterólogo (proteasa) con sitios de corte en cada lado más un segundo polipéptido heterólogo. En formas de realización relacionadas, la invención se refiere a una planta que incluye al menos una célula transfectada con el vector vírico de CTV o a métodos de expresar el polipéptido heterólogo en una planta infectando la planta con el vector especificado.

10

En formas de realización adicionales, el polinucleótido comprende además una secuencia que codifica un primer elemento de control antes de dicho primer polipéptido heterólogo, y una segunda secuencia que codifica una proteasa con sitios de corte insertados en cada lado, y una secuencia que codifica un segundo polipéptido heterólogo.

15

Según otra forma de realización, la invención se dirige al vector vírico de CTV manipulado para comprender un primer casete génico que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un primer polipéptido heterólogo y un primer elemento controlador antes de dicha secuencia que codifica el primer polipéptido heterólogo; y un segundo casete génico que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un segundo polipéptido heterólogo y un segundo elemento controlador antes de dicha secuencia que codifica el segundo polipéptido heterólogo. Opcionalmente, el vector vírico de CTV comprende además un tercer casete génico que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un tercer polipéptido heterólogo y un tercer elemento controlador antes de dicha secuencia que codifica el tercer polipéptido heterólogo; y un cuarto casete génico que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un cuarto polipéptido heterólogo y un cuarto elemento controlador antes de dicha secuencia que codifica el cuarto polipéptido heterólogo. Los expertos en la materia apreciarán que se pueden añadir casetes génicos adicionales al vector siempre que la función e infectividad del vector se mantengan. En formas de realización relacionadas, la invención se refiere a una planta que incluye al menos una célula transfectada con el vector vírico de CTV o a métodos de expresar el polipéptido heterólogo en una planta infectando la planta con el vector especificado.

Los ejemplos de elementos controladores (CE) útiles según las enseñanzas en el presente documento incluyen, pero no están limitados a, elementos controladores homólogos a CTV o elementos controladores heterólogos. Los elementos controladores heterólogos incluyen,

35

pero no están limitados a, elementos controladores de la proteína de cubierta (CP-CE) de tres closterovirus: virus del amarilleo de remolacha (BYV) (94 nts de 13547-13640, acceso de Genbank # AF190581, versión 1, 4 de enero de 2000) (Peremyslov et al., 1999), virus del enanismo amarillo de la remolacha (BYSV) (101 nts de 8516-8616 acceso de Genbank # U51931, versión 1, 5 de abril de 1999) (Karasev et al., 1996) y virus asociado al enrollamiento de hoja de vis 2 (GLRaV-2) (198 nts de 9454-9651 acceso de Genbank # DQ286725, versión 2, 4 de diciembre de 2009). Será evidente para los expertos en la materia, a la vista de las enseñanzas en el presente documento, que se pueden implementar otros elementos controladores, y en particular elementos controladores que tienen actividad similar a promotor fuerte.

Estas y otras formas de realización se describen adicionalmente a continuación y están abarcadas en las reivindicaciones adjuntas.

## 15 ***Materiales y métodos para los ejemplos 1-7 posteriores***

### **Construcción de plásmidos**

Se usaron pCTV9R $\Delta$ p33 y pCTV $\Delta$ Cla 333R (Gowda et al., 2001; Satyanarayana et al., 1999, 2000, 2003; Tatineni et al., 2008) como plásmidos base para desarrollar todos los vectores de expresión que se usaron en el sistema genético inverso de protoplastos. La numeración de los nucleótidos (nts) se basa en el clon T36 de longitud completa (acceso de Genbank # AY170468, versión 1, 11 de septiembre de 2003) (Satyanarayana et al., 1999, 2003). Se crearon CTVp333R-23-ITEV-GFP y CTVp333R-23-I3XARC-GFP (Fig. 7A) fusionando la región no traducida (NTR) 5' del virus del grabado del tabaco (TEV) (nucleótidos (nts) 2-144 acceso de Genbank DQ986288, versión 1, 18 de enero de 2007) (Carrasco et al., 2007) y 3xARC-1 (secuencia complementaria activa del ribosoma) (Akergerov et al., 2004) detrás del codón de terminación de p23 (entre los nts19020-19021 en el clon T36 de longitud completa) usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con extensión solapada (Horton et al., 1989). Para crear vectores de expresión mediante adición y/o sustitución de genes en localizaciones diferentes, se seleccionaron elementos controladores (CE) heterólogos de los elementos controladores de la proteína de cubierta (CP-CE) de tres closterovirus: virus del amarilleo de remolacha (BYV) (94 nts de 13547-13640, acceso de Genbank # AF190581, versión 1, 4 de enero de 2000) (Peremyslov et al., 1999), virus del enanismo amarillo de la remolacha (BYSV) (101 nts de 8516-8616 acceso de Genbank # U51931, versión 1, 5 de abril de 1999) (Karasev et al., 1996) y virus asociado al

enrollamiento de hoja de la vid 2 (GLRaV-2) (198 nts de 9454-9651 acceso de Genbank # DQ286725, versión 2, 4 de diciembre de 2009) para dirigir el ORF para GFP ciclo 3 (GFP) (Chalife et al., 1994; Crameri et al., 1996), ORF de  $\beta$ -Glucuronidasa (GUS) de *Escherichia coli*, *bFosYC155-238* (bFosC), *bJunYN1-154* (bJunN). Se crearon CTVp333R-23-BYbJunN-  
 5 GbFosC, CTVp333R-23-BYbJunN, CTVp333R-23-GbFosC (Fig. 15A) por PCR de extensión solapada de los plásmidos pBiFC-bFosYC155 y pBiFC-bJunYN155 (Hu et al., 2002) y CTV9R (Satyanarayana et al., 1999; 2003). Puesto que existen dos sitios *NotI* en los genes de fluorescencia bimolecular (BiFC), los productos de PCR de extensión solapada se digirieron parcialmente por la endonucleasa de restricción *NotI*. Los productos de PCR se  
 10 introdujeron en pCTV $\Delta$ Cla 333R digerido con *StuI* y *NotI* (Fig. 7A & 15A).

Los vectores de expresión creados en pCTV9R $\Delta$ p33 se introdujeron en el genoma de CTV digiriendo el plásmido con *PstI* (nts 17208-17213) y *NotI* o *StuI* (introducido detrás de 19.293 el nucleótido final de CTV). Se usó PCR de extensión solapada (Horton et al., 1989) para  
 15 introducir los genes apropiados en las diferentes localizaciones. La sustitución del gen p13 se hizo por delección de los nts 17293-17581 en el ORF y (CE) de p13 por PCR de extensión solapada (Fig 1A, 2A, 11A, 16A, 17A & 18A). De forma similar, la inserción entre p13 y p20 (nts # 17685-17686) (Fig. 3A), p20-p23 (nts # 18312-18313) (Fig. 4A) y p23-3'NTR (nts #19020-19021) (Fig. 5A, 6A, 13A, 16A, 17A & 18A) se hicieron por PCR de extensión  
 20 solapada. Se creó un gen híbrido fusionando el ORF de GFP (Chalife et al., 1994; Crameri et al., 1996) y ORF de GUS separados por el motivo de la proteasa HC-Pro (nts 1966-2411 acceso de Genbank # M11458, versión 1, 3 de agosto de 1993) (Allison et al., 1985; Carrington et al., 1989) y su secuencia de reconocimiento fusionada al extremo N-terminal de GUS (ATGAAACTTACAATGTTGGAGGGATG (SEQ ID NO: 1) (nts 2412-2438 acceso  
 25 de Genbank # M11458, versión 1, 3 de agosto de 1993) (Allison et al., 1985; Carrington et al., 1989) (secuencia de aminoácidos (A.A.) MKTYNVG↓GM) (SEQ ID NO: 2) (la flecha indica el sitio de procesamiento) y al extremo C-terminal de GFP (ATGAAGACCTATAACGTAGGTGGCATG) (SEQ ID NO: 3), y se insertó detrás de p23 (Fig. 13A) o como sustitución de p13 (Fig. 11A) bajo diferentes elementos controladores. Se creó  
 30 un gen híbrido similar usando el motivo de la proteasa Nla de TEV (nts 6270-6980 acceso de Genbank # M11458, versión 1, 3 de agosto de 1993) (Allison et al., 1985) y su secuencia de reconocimiento (GAGAATCTTTATTTTCAGAGT (SEQ ID NO: 4) (nts 8499-8519 acceso de Genbank # M11458, versión 1, 3 de agosto de 1993) (A.A. ENLYFQ↓S) (SEQ ID NO: 5) (la flecha indica el sitio de procesamiento) (Carrington y Dougherty, 1988) en el extremo C-  
 35 terminal de GFP y GAAAACCTATACTTCCAATCG (SEQ ID NO: 6) en el extremo N-terminal de GUS). La redundancia del código genético de aminoácidos se usó para eliminar la

5 duplicación completa de las secuencias de nucleótidos de los motivos de reconocimiento. Se usó una estrategia similar para crear un gen híbrido entre el ORF de p23 y ORF de GFP en la construcción CTV33-23-HC-GFP-72 y CTV33-23-NIa-GFP-73 (Fig. 8). Cambiar el motivo de reconocimiento de las proteasas generó los vectores control CTV33-23-HCØ-GFP-74 y CTV33-23-NIaØ-GFP-75 (Fig. 8).

10 El plásmido binario pCAMBIACTV9R (Gowda et al., 2005) se modificó para eliminar el gen p33 delecionando los nts 10858-11660 (Satyanarayana et al., 2000; Tatineni et al., 2008) e introduciendo un sitio *Swal* detrás de la ribozima manipulada basada en el virusoide moteado del trébol subterráneo (Turpen et al., 1993). Los productos de PCR amplificados de los vectores de expresión en el esqueleto pCTV9RΔp33 se introdujeron en el plásmido binario modificado pCAMBIACTV9RΔp33 digerido con *Pst*I (cebador directo C-749) y *Swal* (cebador inverso C-1894). Cuando se introducen genes de complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC) en las construcciones CTV33-23-BYbJunN-GbFosC-59 (Fig. 17) , CTV33-Δ13-BYbJunN-23-GbFosC-67 (Fig. 17) , CTV33-Δ13-BYbJunN-GbFosC-76 (Fig. 16) , CTV33-23-GbFosC-98 (Fig. 16) y CTV33-23-BYbJunN-97 (Fig. 16) se usó un cebador que cambia *Pst*I al compatible *Nsi*I (cebador C-2085) para facilidad de clonación (la secuencia del gen *bFosC* contiene un sitio *Pst*I mientras que la secuencia del gen *bJunN* contiene dos sitios *Pst*I). El cribado preliminar para los insertos correctos en los diferentes vectores de expresión se hizo por digestión de restricción usando las enzimas apropiadas. Las uniones donde se introdujeron genes exógenos en los vectores de expresión se confirmaron por secuenciación en el Centro Interdisciplinar para Investigación en Biotecnología (Universidad de Florida, Gainesville, FL). Todos los cebadores se enumeran en la tabla 1-1.

25

Tabla 1-1. Lista de cebadores usados en construir vectores de expresión

Nombre de cebador	SEQ ID NO:	Secuencia 5'-3'*	Descripción*
C-749	7	AGT <u>CCT CGA GAA</u> CCA CTT AGT TGT TTA GCT ATC	Extremo 3' de p18 (clones CTV T36 nts n.º 17121-17145) con un sitio <i>Xho</i> I añadido antes del nt n.º17121) (hacia 3' de este cebador existe dentro del genoma de CTV un sitio <i>Pst</i> I (nts 17208-17213 de



			CTV T36) usado para la clonación) (F.P.)
<b>C-1358</b>	8	<b>TTA <u>TGC GGC CGC AGG CCT</u> TGG ACC TAT GTT GGC CCC CCA TAG</b>	Extremo 3' de 3'NTR (nts 19.270-19.293 del clon CTV T36) contienen (sitios <i>Stu</i> l y <i>Not</i> l) (R.P.)
<b>C-1568</b>	9	<b>TAA TCG TAC TTG AGT TCT AAT ATG GCT AGC AAA GGA GAA GAA</b>	Extremo 5' de GFP (nts 1-21) con extensión en el extremo 3' de BYV CP IR (nts n.º <b>13620-13640</b> <b>Genbank</b> n.º <b>acceso AF190581</b> , versión 1, 4 de enero de 2000) (F.P.)
<b>C-1894</b>	10	<b><u>GCC GCA CTA GTA TTT AAA</u> <u>ICC CGT TTC GTC CTT TAG</u> GGA CTC GTC AGT GTA CTG ATATAA GTA CAG ACT GGA CCT ATG TTG GCC CCC CAT AGG GAC AGT G</b>	Extremo 3' de 3'NTR (nts 19.262- 19.293 del clon CTV T36) con extensiones que incluyen una ribozima del virusoide del trébol subterráneo (subrayado) (Turpen et al., 1993) y sitios de restricción <i>Swa</i> I y <i>Spe</i> I (R.P.)
<b>C-1973</b>	11	<b>ATG GAT GAG CTC TAC AAA TGA TTG AAGTGG ACG GAATAA GTT CC</b>	Extremo 5' de 3'NTR(nts 19021-19043 del clon CTV T36) con extensión en el extremo 3' de GFP (nts 700-720) (F.P.)
<b>C-1974</b>	12	<b>GGA ACT TAT TCC GTC CACTTC AAT CAT TTG TAG AGCTCA TCC AT</b>	Extremo 3' de GFP (nts 700-720) con extensión en el extremo 5' de 3'NTR (nts 19021-19043 del clon CTV T36) (R.P.)
<b>C-1975</b>	13	<b><u>GCA CGT TGT GCT ATA GTA</u> <u>CGT GCC ATA ATA GTG AGT</u> <u>GCT AGC AAA GTATAA ACG</u> <u>CTG GTGTTT AGC GCA TAT</u></b>	Región intergénica GLRaV-2 de CP (nts 9568-9651 <u>Genbank</u> número de <u>acceso</u> DQ286725, versión

		<b><u>TAA ATA CTA ACG</u></b>	2, 4 de diciembre de 2009) (F.P.)
<b>C-1976</b>	14	<b><u>CAG CTT GCT TCT ACCTGA</u></b> <b><u>CAC AGT TAA GAA GCG</u></b> <b><u>GCATAA ATC GAA GCC AAA</u></b> <b><u>CCCTAA ATT TTG CAA</u></b> <b><u>CTC GAT CAATTG TAA CCT</u></b> <b><u>AGA GCG AAGTGC AAT CA</u></b>	Región intergénica BYSV CP de ( <u>nts 8516-8616</u> Genbank n.º acceso U51931, versión 1, 5 de abril de 1999) (F.P.)
<b>C-1977</b>	15	<b><u>TTT AGC GCA TAT TAA ATA</u></b> <b><u>CTA ACG ATG GCT AGC AAA</u></b> <b>GGA GAA GAA</b>	Extremo 5' de GFP ( <i>nts 1-21</i> ) con extensión en el extremo 3' de la región intergénica GLRaV-2 CP ( <u>nts 9628-9651</u> Genbank número de acceso <u>DQ286725</u> , versión 2, 4 de diciembre de 2009) (F.P.)
<b>C-1979</b>	16	<b><u>ACT GTG TCA GGT AGA AGC</u></b> <b><u>AAG CTG TCA GAT GAA GTG</u></b> <b>GTGTTT CAC</b>	Extremo 3' de p23 ( <i>nts 19,000-19,020</i> del clon CTV T36) con extensión en el extremo 5' de BYSV CP IR ( <u>nts 8516-8539</u> Genbank n.º acceso <u>U51931</u> , versión 1, 5 de abril de 1999) (R.P.)
<b>C-1982</b>	17	<b>TTG GAT TTA GGT GAC ACT</b> <b>ATA GTG GAC CTATGTTGG</b> <b>CCC CCC ATA</b>	Promotor Sp6 (subrayado y en cursiva) con el extremo 3' de 3'NTR ( <i>nts 19271-19293</i> del clon CTV T36) usado para desarrollar la sonda marcada con dig (R.P.)
<b>C-1983</b>	18	<b><u>GTA ACCTAG AGC GAA GTG</u></b> <b><u>CAA TCA ATG GCT AGC AAA</u></b> <b>GGA GAA GAA</b>	Extremo 5' de GFP ( <i>nts 1-23</i> ) con extensión en el extremo 3' de BYSV IR de CP ( <u>nts 8593-8616</u> Genbank n.º acceso

			<u>U51931, versión 1, 5 de abril de 1999) (F.P.)</u>
<b>C-1984</b>	19	<b><u>GCC TAA GCT TAC AAA TAC</u> <u>TCC CCC ACA ACA GCT TAC</u> <u>AAT ACT CCC CCA CAC AGC</u> <u>TTA CAA ATA CTC CCC CAC</u> <u>AAC AGCTTG TCG AC</u></b>	Secuencia complementaria de ribosoma activo 3X (3XARC-1 <u>nts 1-86</u> ) (Akbergenov et al., 2004) (F.P.)
<b>C-1985</b>	20	<b><u>CTC CGT GAA CAC CACTTC</u> <u>ATC TGA <u>AAA TAA CAA ATC</u></u> <u>TCA ACA CAA</u></b>	Extremo 5' de TEV 5'NTR ( <u>nts 1-21 Genbank n.º acceso M11458</u> , versión 1, 3 de agosto de 1993) con extensión en el extremo 3' de p23 ( <u>nts 18997-19020 del clon CTV T36</u> ) (F.P.)
<b>C-1986</b>	21	<b><u>TTG TGT TGA GAT TTG TTA</u> <u>TTT TCA GAT GAA GTG GTG</u> <u>TTC ACG GAG</u></b>	Extremo 3' de p23 ( <u>nts 18997-19020 del clon CTV T36</u> ) con extensión en el extremo 5' de TEV 5'NTR ( <u>nts 1-21 Genbank n.º acceso M11458</u> , versión 1, 3 de agosto de 1993) (R.P.)
<b>C-1989</b>	22	<b><u>GGA GTATTT GTA AGCTTA</u> <u>GGC TCA GAT GAA GTG</u> <u>GTGTTC ACG GAG</u></b>	Extremo 3' de p23 ( <u>nts 18997-19020 del clon CTV T36</u> ) con extensión en el extremo 5' de 3XARC-1 ( <u>nts 1-21</u> ) (R.P.)
<b>C-1990</b>	23	<b><u>CCC CAC AAC AGCTTG TCG</u> <u>ACA TGG CTA GCA AAG GAG</u> <u>AAG AAC TTT</u></b>	Extremo 5' de GFP ( <u>nts 1-25</u> ) con extensión en el extremo 3' de 3XARC-1 ( <u>nts 66-86</u> ) (F.P.)
<b>C-2007</b>	24	<b><u>CGT GAA CAC CACTTC ATC</u> <u>TGA <u>TTC GAC CTC GGT CGT</u></u> <u>CTT AGT TAA</u></b>	Extremo 3' BYV de CPm y la región intergénica de CP ( <u>nts 13547-13570 Genbank n.º acceso AF190581</u> , versión 1, 4 de enero de

			2000) con extensión en el extremo 3' de p23 (nts 19.000-19.020 del clon CTV T36) (F.P.)
<b>C-2008</b>	25	<b><u>TTA ACT AAG ACG ACC GAG</u> <u>GTC GAA TCA GAT GAA GTG</u> <u>GTG TTC ACG</u></b>	Extremo 3' de p23 (nts 19,000-19,020 del clon CTV T36) con extensión en el extremo 3' de CPm y región intergénica de CP de BYV ( <u>nts 13,547-13,570 Genbank n.º acceso AF190581</u> , versión 1, 4 de enero de 2000) (R.P.)
<b>C-2009</b>	26	<b><u>GGC GAT CAC GAC AGA GCC</u> <u>GTGTCA ATT GTC GCG GCT</u> <u>AAG AAT GCT GTG GAT CGC</u> <u>AGC GCT TTC ACT GGA GGG</u> <u>GAG AGA AAA ATA GTT AGT</u> <u>TTG TAT GCCTTA GGA AGG</u> <u>AACTAA GCA CGT TGT GCT</u> <u>ATA GTA CGT GC</u></b>	Extremo 3' GLRaV-2 de CPm y extremo 5' de región intergénica CP ( <u>nts 9454-9590 Genbank número de acceso DQ286725</u> , versión 2, 4 de diciembre de 2009) (F.P.)
<b>C-2010</b>	27	<b><u>TGA CAC GGC TCT GTC GTG</u> <u>ATC GCC TCA GAT GAA GTG</u> <u>GTGTTT ACG</u></b>	Extremo 3' de p23 (nts 19.000-19.020 del clon CTV T36) con extensión en el extremo 3' de la secuencia codificante GLRaV-2 CPm ( <u>nts 9454-9477 Genbank n.º acceso DQ286725</u> , versión 2, 4 de diciembre de 2009) (R.P.)
<b>C-2011</b>	28	<b><u>GCC ACC TAC GTT ATA GGT</u> <u>CTT CAT TTT GTA GAG CTC</u> <u>ATC CAT GCC</u></b>	Extremo 3' de GFP ( <u>nts 697-717</u> ) con extensión en la secuencia de reconocimiento de proteasa TEV HC-Pro ( <u>nts 2412-2435</u> (redundancia de

			<i>código genético usada para eliminar la duplicación Genbank n.º acceso M11458, versión 1, 3 de agosto de 1993) (R.P.)</i>
<b>C-2012</b>	29	<b><i>AAG ACC TAT AAC GTA GGT GGC ATG <u>AAG GCT CAATAT</u> TCG GAT CTA</i></b>	Extremo 5' de motivo de proteasa TEV HC-Pro ( <i>nts 1959-1979 Genbank n.º acceso M11458, versión 1, 3 de agosto de 1993</i> ) con extensión en la secuencia de reconocimiento HC-Pro ( <i>nts 2415-2438 redundancia de código genético usada para eliminar la duplicación Genbank n.º acceso M11458, versión 1, 3 de agosto de 1993</i> ) (F.P.)
<b>C-2013</b>	30	<b><i>ATG AAA ACT TAC AAT GTT GGA GGG ATG <u>TTA CGT CCT</u> GTA GAA ACC</i></b>	Extremo 5' de GUS ( <i>nts 4-21</i> ) con extensión en la secuencia de reconocimiento TEV HC-Pro y el extremo 3' del motivo de proteasa TEV HC-Pro ( <i>nts 2412-2438 Genbank n.º acceso M11458, versión 1, 3 de agosto de 1993</i> ) (F.P.)
<b>C-2014</b>	31	<b><i>GGT TTC TAC AGG ACG TAA CAT CCC TCC AAC ATT GTA AGT TTT CAT</i></b>	Secuencia de reconocimiento TEV HC-Pro ( <i>nts 2412-2438 Genbank n.º acceso M11458, versión 1, 3 de agosto de 1993</i> ) con extensión en el extremo 5'

---

			de la secuencia ORF de GUS ( <u>nts 4-21</u> ) (R.P.)
<b>C-2015</b>	32	<b><u>CCG CAG CAG GGA GGC</u> <u>AAA CAA TGA TTG AAGTGG</u> ACG GAA TAA GTT</b>	Extremo 5' de 3'NTR (nts 19021-19041 del clon CTV T36) con extensión en el extremo 3' de ORF de GUS ( <u>nts 1789-1812</u> ) (F.P.)
<b>C-2016</b>	33	<b>AAC TTA TTC CGT CCA CTT CAA <u>TCA TTG TTT GCCTCC</u> <u>CTG CTG CGG</u></b>	Extremo 3' de GUS ( <u>nts 1789-1812</u> ) con extensión en el extremo 5' de 3'NTR (nts 19021-19041 del clon CTV T36) (R.P.)
<b>C-2017</b>	34	<b><u>CTT ACT CTG AAA ATA AAG</u> <u>ATT CTC TTT GTA GAG CTC</u> ATC CAT GCC</b>	Extremo 3' de GFP ( <b>nts 697-717</b> ) con extensión en el extremo 5' de secuencia de reconocimiento de proteasa TEV-NIa ( <u>nts 8499-8519 Genbank n.º acceso M11458</u> , versión 1, 3 de agosto de 1993) y extremo 5' del motivo de proteasa TEV NIa ( <u>nts 6270-6272 Genbank n.º acceso M11458</u> , versión 1, 3 de agosto de 1993) (R.P.)
<b>C-2018</b>	35	<b><u>AAA GAG AAT CTT TAT TTT</u> <u>CAG AGT AAG GGA CCA CGT</u> GAT TAC AAC</b>	Extremo 5' del motivo de proteasa TEV NIa ( <b>nts 6270-6290 Genbank n.º acceso M11458</b> , versión 1, 3 de agosto de 1993) con extensión en su secuencia de reconocimiento ( <u>nts 8499-8519 Genbank n.º acceso M11458</u> , versión 1,

---

---

			3 de agosto de 1993) y extremo 3' de GFP ( <u>nts 715-717</u> ) (F.P.)
<b>C-2019</b>	36	<b><u>CGA TTG GAA GTA TAG GTT</u> <u>TTC TTG CGA GTA CAC CAA</u> <u>TTC ACT CAT</u></b>	Extremo 3' del motivo TEV Nla ( <i>nts 6961-6980 Genbank n.º acceso M11458, versión 1, 3 de agosto de 1993) con extensión en la secuencia de reconocimiento Nla (nts 8499-8519 Genbank n.º acceso M11458, versión 1, 3 de agosto de 1993 redundancia de código genético usada para eliminar la duplicación)</i> ) (R.P.)
<b>C-2020</b>	37	<b><u>CAA GAA AAC CTA TAC TTC</u> <u>CAA TCG ATG TTA CGT CCT</u> <u>GTA GAA ACC</u></b>	Extremo 5' de GUS con extensión en la secuencia de reconocimiento TEV Nla ( <i>nts 8499-8519 Genbank n.º acceso M11458, versión 1, 3 de agosto de 1993 redundancia de código genético usada para eliminar la duplicación)</i> ) y extremo 3' del motivo de proteasa TEV Nla ( <u>nts 6978-6980 Genbank n.º acceso M11458, versión 1, 3 de agosto de 1993</u> ) (F.P.)
<b>C-2021</b>	38	<b><u>GTC ACT TTG TTT AGC GTG</u> <u>ACT TAG CAG CTT GCT TCT</u> <u>ACC TGA CAC</u></b>	Extremo 5' de BYSV CP IR ( <u>nts 8516-8536 Genbank n.º acceso U51931, versión</u>

---

---

			1, 5 de abril de 1999) con extensión en el extremo 3' de p18 (nts 17269-17292 del clon CTV T36) (F.P.)
<b>C-2022</b>	39	<b><u>GTG TCA GGT AGA AGC AAG</u> <u>CTG CTA AGT CAC GCT AAA</u> CAA AGT GAC</b>	Extremo 3' de p18 (nts 17269-17292 del clon CTV T36) con extensión en el extremo 5' BYSV CP IR ( <a href="#">nts 8516-8536 Genbank n.º acceso U51931</a> , versión 1, 5 de abril de 1999) (R.P.)
<b>C-2023</b>	40	<b>TTA GTC TCT CCA TCT TGC <u>GTG TAG CAG CTT GCT TCT</u> <u>ACC TGA CAC</u></b>	Extremo 5' de BYSV CP IR( <a href="#">nts 8516-8536 Genbank n.º acceso U51931</a> , versión 1, 5 de abril de 1999) con extensión en el extremo 3' de p20 (nts 18286-18309 del clon CTV T36) (F.P.)
<b>C-2024</b>	41	<b><u>GTG TCA GGT AGA AGC AAG</u> <u>CTG CTA CAC GCA AGATGG</u> AGA GAC TAA</b>	Extremo 3' de p20 (nts 18286-18309 del clon CTV T36) con extensión en el extremo 5' de BYSV CP IR ( <a href="#">nts 8516-8536 Genbank n.º acceso U51931</a> , versión 1, 5 de abril de 1999) (R.P.)
<b>C-2025</b>	42	<b>ATG GAT GAG CTC TAC AAA TGA--GTT TCA GAA ATT GTC GAATCG CAT</b>	Extremo 3' de ORF de p13 (nts 17581-17604 del clon CTV T36) con extensión en el extremo 3' de ORF de GFP ( <i>nts 700-720</i> ) (F.P.)
<b>C-2026</b>	43	<b>ATG CGA TTC GAC AAT TTC TGA AAC TCA TTT GTA GAG CTC ATC CAT</b>	Extremo 3' de ORF de GFP ( <i>nts 700-720</i> ) con extensión en el extremo 3' de ORF de p13 (nts 17581-

---



---

			17604 del clon CTV T36) (R.P.)
<b>C-2027</b>	44	<b>ATG GAT GAG CTC TAC AAA TGA GTT AAT ACG CTT CTC AGA ACG TGT</b>	Extremo 5' de p23 IR (nts 18,310-18,330 del clon CTV T36) con extensión en el extremo 3' de GFP (nts 700-720) (F.P.)
<b>C-2028</b>	45	<b>ACA CGT TCT GAG AAG CGT ATT AAC TCA TTT GTA GAG CTC ATC CAT</b>	Extremo 3' de GFP (nts 700-720) con extensión en p23 IR (nts 18310-18330 del clon CTV T36) (R.P.)
<b>C-2029</b>	46	<u>TTT AGC GCATAT TAA ATA</u> <b>CTA ACG ATG TAC CCATAC GAT GTT CCA</b>	Extremo 5' de HA TAG (21nts) en bFos que lleva pHA-CMV (AA 118-210)- YC ( AA 155-238) (Hu et al., 2002) con extensión en el extremo 3' de GLRaV-2 CP IR (nts <u>9628-9651</u> <u>Genbank número de</u> <u>acceso DQ286725</u> , versión 2, 4 de diciembre de 2009) (F.P.)
<b>C-2030</b>	47	<u>TGG AAC ATC GTATGG GTA</u> <u>CAT CGT TAGTAT TTA</u> <b>ATATGC GCT AAA</b>	Extremo 3' de CPm GLRaV-2 (nts 9628-9651 <u>Genbank número de</u> <u>acceso DQ286725</u> , versión 2, 4 de diciembre de 2009) con extensión en el extremo 5' de marca HA (21nts) en bFos que lleva pHA-CMV (AA 118-210)- YC ( AA 155-238) (Hu et al., 2002) (R.P.)
<b>C-2031</b>	48	<u>ACT GTGTCA GGT AGA AGC</u> <u>AAG CTG TTA CTT GTA CAG</u> <b>CTC GTC CAT</b>	Extremo 3' EYFP-YC (AA 232-238) (Hu et al., 2002) con extensión en BYSV CP

---

---

			5'IR ( <u>nts 8516-8539</u> <u>Genbank n.º acceso</u> <u>U51931</u> , versión 1, 5 de abril de 1999) (R.P.)
<b>C-2032</b>	49	<b><u>GTA ACCTAG AGC GAA GTG</u> <u>CAATCA ATG GACTAC AAA</u> <u>GAC GAT GAC</u></b>	Extremo 5' de FLAG tag (21nts) de bJunN que lleva pFLAG-CMV2 (Hu et al., 2002) con extensión en el extremo 3' de BYSV CP IR ( <u>nts 8593-8616 Genbank</u> <u>n.º acceso U51931</u> , versión 1, 5 de abril de 1999) (F.P.)
<b>C-2051</b>	50	<b><u>GTC ACT TTG TTT AGC GTG</u> <u>ACT TAG GGC GAT CAC GAC</u> <u>AGA GCC GTG</u></b>	Extremo 3' de GLRaV-2 CPm ( <u>nts 9454-9474</u> <u>Genbank n.º acceso</u> <u>DQ286725</u> , versión 2, 4 de diciembre de 2009) con extensión en el extremo 3' de p18 (nts 17269-17292 del clon CTV T36) (F.P.)
<b>C-2052</b>	51	<b><u>CAC GGC TCT GTC GTG ATC</u> <u>GCC CTA AGT CAC GCT AAA</u> <u>CAA AGT GAC</u></b>	Extremo 3' de p23 (nts 19,000-19,020) con extensión en el extremo 3' de la secuencia codificante GLRaV-2 CPm ( <u>nts 9454-</u> <u>9474 Genbank n.º acceso</u> <u>DQ286725</u> , versión 2, 4 de diciembre de 2009) (R.P.)
<b>C-2053</b>	52	<b><u>GTC ACT TTG TTT AGC GTG</u> <u>ACT TAG TTC GAC CTC GGT</u> <u>CGT CTT AGT</u></b>	Extremo 3' BYV de CPm y la región intergénica de CP ( <u>nts 13547-13567 Genbank</u> <u>n.º acceso AF190581</u> , versión 1, 4 de enero de 2000) con extensión en el extremo 3' de p18 (nts

---

---

			17269-17292 del clon CTV T36) (F.P.)
<b>C-2054</b>	53	<b><u>ACT AAG ACG ACC GAG GTC</u> <u>GAA CTA AGT CAC GCT AAA</u> <b>CAA AGT GAC</b></b>	Extremo 3' de p18 (nts 17269-17292 del clon T36 CTV) con extensión en el extremo 3' BYV de CPm y la región intergénica de CP ( <u>nts 13547-13567 Genbank n.º acceso AF190581</u> , versión 1, 4 de enero de 2000) (R.P.)
<b>C-2055</b>	54	<b><u>CAC AAC GTC TAT ATC ATG</u> <u>GCC TAG GTT TCA GAA ATT</u> <b>GTC GAA TCG</b></b>	Extremo 3' de ORF de p13 (nts 17581-17601 del clon CTV T36) con extensión en el extremo 3' de EYFP-YN( <u>AA 147-154</u> ) de bJun-YN que lleva pFlag-CMV2 (Hu et al., 2002)
<b>C-2056</b>	55	<b><u>CGA TTC GAC AAT TTC TGA</u> <u>AAC CTA GGC CAT GAT ATA</u> <u>GAC GTT GTG</u></b>	Extremo 3' de EYFP-YN( <u>AA 147-154</u> ) de bJun-YN que lleva pFlag-CMV2 (Hu et al., 2002) con extensión en el extremo 3' de p13 (nts 17581-17601 del clon CTV T36)
<b>C-2057</b>	56	<b><u>GGC ATG GAC GAG CTG TAC</u> <u>AAGTAA TTG AAGTGG ACG</u> <b>GAATAA GTT</b></b>	Extremo 3' EYFP-YC ( <u>AA 231-238</u> ) (Hu et al., 2002) con extensión en el extremo 5' de 3'NTR (nts 19021-19041 del clon CTV T36)
<b>C-2058</b>	57	<b><u>AAC TTA TTC CGT CCA CTT</u> <u>CAA TTA CTT GTA CAG CTC</u> <u>GTC CAT GCC</u></b>	Extremo 5' de 3'NTR (nts 19021-19041 del clon CTV T36) con extensión en el extremo 3' EYFP-YC ( <u>AA 231-238</u> ) (Hu et al., 2002)

---

<b>C-2059</b>	58	<b>TCG CTC TTA CCT TGC GAT AAC TAG <u>CAG CTT GCT TCT</u> <u>ACCTGA CAC</u></b>	BYSV CP 5'IR ( <u>nts 8516-8536 Genbank n.º acceso U51931</u> , versión 1, 5 de abril de 1999) con extensión en el extremo 3' de p13 ( <u>nts 17.662-17,685 del clon CTV T36</u> ) (F.P.)
<b>C-2063</b>	59	<b><u>GTA ACCTAG AGC GAA GTG</u> <u>CAA TCA ATG TTA CGT CCT</u> GTA GAA ACC</b>	Extremo 5' de ORF de GUS ( <u>nts 1-21</u> ) con extensión en el extremo 3' de BYSV CP IR (con extensión en el extremo 3' de BYSV CP IR ( <u>nts 8593-8616 Genbank n.º acceso U51931</u> , versión 1, 5 de abril de 1999) (F.P.))
<b>C-2064</b>	60	<b>GGT TTC TAC AGG ACG TAA CAT <u>TGA TTG CACTTC GCT</u> <u>CTA GGTTAC AA</u></b>	Extremo 3' de BYSV CP IR ( <u>nts 8591-8616 Genbank n.º acceso U51931</u> , versión 1, 5 de abril de 1999) con extensión en el extremo 5' de ORF de GUS ( <u>nts 1-21</u> )(R.P)
<b>C-2067</b>	61	<b><u>CCG CAG CAG GGA GGC</u> <u>AAA CAA TGA GTT TCA GAA</u> ATT GTC GAATCG</b>	Extremo 3' de p13 ( <u>nts 17581-17601 del clon CTV T36</u> ) con extensión en el extremo 3' de GUS ( <u>nts 1789-1812</u> ) (F.P.)
<b>C-2068</b>	62	<b>CGA TTC GAC AAT TTC TGA AAC <u>TCA TTG TTT GCCTCC</u> <u>CTG CTG CGG</u></b>	Extremo 3' de GUS ( <u>nts 1789-1812</u> ) con extensión en el extremo 3' de p13 ( <u>nts 17581-17601 del clon CTV T36</u> )
<b>C-2069</b>	63	<b><u>GTG TCA GGT AGA AGC AAG</u> <u>CTG CTA GTT ATC GCA AGG</u> TAA GAG CGA</b>	Extremo 3' de p13 ( <u>nts 17662-17685 del clon CTV T36</u> ) con extensión en el

---

			extremo 5' de BYSV IR CP 5'IR ( <b><u>nts 8516-8536</u></b> <b><u>Genbank n.º acceso</u></b> <b><u>U51931</u></b> , versión 1, 5 de abril de 1999) (R.P.)
C-2070	64	<b>ATG GAT GAG CTC TAC</b> <b>AAATGA AGT CTA CTC AGT</b> <b>AGT ACG TCT ATT</b>	5'IR de p20 (nts 17686- 17709 del clon CTV T36) con extensión en el extremo 3' de GFP ( <i>nts</i> 700-720) (F.P.)
C-2071	65	<b>AAT AGA CGT ACT ACT</b> <b>GAGTAG ACT TCA TTT GTA</b> <b>GAG CTC ATC CAT</b>	Extremo 3' de GFP ( <i>nts</i> 700-720) con extensión en el 5'IR de p20 (nts 17686- 17709 del clon CTV T36) (R.P.)
C-2085	66	<b>GCG G <u>ATGCAT</u> TATTT</b> <b>GGTTTT ACA ACA ACG GTA</b> <b>CGT TTC AAA ATG</b>	Extremo 3' de p18 (nts 17201-17245 del clon CTV T36) con dos mutaciones puntuales (C-A(17205) y G-T(17210)) que crean un sitio <i>Nsi</i> I para reemplazar el sitio <i>Pst</i> I (F.P.)
C-2087	29	<b><u>AAG ACC TAT AAC GTA GGT</u></b> <b><u>GGC ATG AAG GCT CAA TAT</u></b> <b>TCG GAT CTA</b>	Extremo 5' del motivo de proteasa TEV HC-Pro ( <i>nts</i> 1959-1979 <i>Genbank n.º</i> <i>acceso M11458</i> , versión 1, 3 de agosto de 1993) con extensión en la secuencia de reconocimiento HC-Pro ( <i>nts 2415-2438 se usó</i> <i>redundancia de secuencia</i> <i>de código genético para</i> <i>eliminar la duplicación</i> <i>Genbank n.º acceso</i> <i>M11458</i> , versión 1, 3 de agosto de 1993 (F.P.)

---

<b>C-2088</b>	67	<b><u>ATG AAA ACT TAC AAT GTT</u> <u>GGA GGG ATG GCT AGC AAA</u> <b>GGA GAA GAA</b></b>	Extremo 5' de ORF de GFP( <i>nts</i> 4-21) con extensión en la secuencia de reconocimiento TEV HC-Pro ( <i>nts</i> 2412-2438 Genbank n.º acceso M11458, versión 1, 3 de agosto de 1993) (F.P.)
<b>C-2089</b>	68	<b><u>TTC TTC TCC TTT GCT AGC</u> <u>CAT CCC TCC AAC ATT GTA</u> <b>AGT TTT CAT</b></b>	Secuencia de reconocimiento TEV HC-Pro ( <i>nts</i> 2412-2438 Genbank n.º acceso M11458, versión 1, 3 de agosto de 1993) con extensión en el extremo 5' de la secuencia ORF de GFP ( <i>nts</i> 4-21) (R.P.)
<b>C-2091</b>	69	<b><u>GAG AAT CTT TAT TTT CAG</u> <u>AGT AAG GGA CCA CGT GAT</u> <b>TAC AAC C</b></b>	Extremo 5' del motivo de proteasa TEV Nla ( <i>nts</i> 6270-6291 Genbank n.º acceso M11458, versión 1, 3 de agosto de 1993) con extensión en su secuencia de reconocimiento ( <i>nts</i> 8499-8519 Genbank n.º acceso M11458, versión 1, 3 de agosto de 1993) (F.P.)
<b>C-2092</b>	70	<b><u>GAA AAC CTA TACTTC</u> <u>CAATCG ATG GCT AGC AAA</u> <b>GGA GAA GAA CT</b></b>	Extremo 5' de ORF de GFP ( <i>nts</i> 1-23) con extensión en la secuencia de reconocimiento de proteasa TEV- Nla ( <i>nts</i> 8499-8519 redundancia de secuencia de código genético usada para

			eliminar la duplicación <u>Genbank n.º acceso</u> <u>M11458</u> , versión 1, 3 de agosto de 1993) (F.P.)
<b>C-2093</b>	71	<b><u>AGT TCT TCT CCT TTG CTA</u> <u>GC CAT CGA TTG GAA GTA</u> <u>TAG GTT TTC</u></b>	Secuencia de reconocimiento de proteasa TEV Nla ( <i>nts 8499-8519 redundancia de secuencia de código genético usada para eliminar la duplicación Genbank n.º acceso M11458</i> , versión 1, 3 de agosto de 1993) con extensión en la secuencia ORF de GFP ( <u>nts 1-23</u> ) (R.P.)
<b>C-2094</b>	72	<b><u>AAG ACCTAT AAC GTA GGT</u> <u>GGC ATG AAG GGA CCA CGT</u> <u>GAT TAC AAC</u></b>	Extremo 5' de la secuencia de motivo de proteasa TEV-Nla ( <i>nts 6270-6291 Genbank n.º acceso M11458</i> , versión 1, 3 de agosto de 1993) con extensión en la secuencia de reconocimiento HC-Pro ( <u>nts 2415-2438 se usó redundancia de secuencia de código genético para eliminar la duplicación Genbank n.º acceso M11458</u> , versión 1, 3 de agosto de 1993) (F.P.)
<b>C-2095</b>	73	<b><u>CCC TCC AAC ATT GTA AGT</u> <u>TTT CAT TTG CGA GTA CAC</u> <u>CAATTC ACT</u></b>	Extremo 3' del motivo de proteasa TEV Nla ( <i>nts 6959-6981 Genbank n.º acceso DQ986288</i> , versión

			1, 18 de enero de 2007) con extensión en el motivo de proteasa TEV HC-Pro ( <u>nts 2415-2438 Genbank n.º acceso M11458</u> , versión 1, 3 de agosto de 1993) (R.P.)
<b>C-2096</b>	74	<b><u>GAG AAT CTT TAT TTT CAG</u> <u>AGT AAG GCT CAATAT TCG</u> <u>GAT CTA AAG</u></b>	Extremo 5' del motivo de proteasa TEV HC-Pro ( <u>nts 1959-1979 Genbank n.º acceso M11458</u> , versión 1, 3 de agosto de 1993) con extensión en la secuencia de reconocimiento de proteasa TEV Nla ( <u>nts 8499-8519 Genbank n.º acceso M11458</u> , versión 1, 3 de agosto de 1993) (F.P.)
<b>C-2097</b>	75	<b><u>CGA TTG GAA GTATAG GTT</u> <u>TTC TTC GGATTC CAA</u> <u>ACCTGA ATG AAC</u></b>	Extremo 3' del motivo de proteasa HC-Pro ( <u>nts 2388-2411 Genbank n.º acceso M11458</u> , versión 1, 3 de agosto de 1993) con extensión en la secuencia de reconocimiento de proteasa TEV Nla ( <u>nts 8499-8519 Genbank n.º acceso M11458</u> , versión 1, 3 de agosto de 1993)(R.P.)
<b>C-2098</b>	76	<b><u>GCC ACCTAC GTT ATA GGT</u> <u>CTT CAT GAT GAA GTG</u> <u>GTGTTT ACG GAG</u></b>	Extremo 3' de p23(nts 18997-19017 del clon CTV T36) con extensión en el extremo 5' de la secuencia de reconocimiento de proteasa TEV HC-Pro <b>nts</b>



			<u>2412-2435 (redundancia de secuencia de código genético usada para eliminar la duplicación) Genbank n.º acceso M11458, versión 1, 3 de agosto de 1993) (R.P.)</u>
<b>C-2099</b>	77	<b><u>ACT CTG AAA ATA AAG ATT</u> <u>CTC GAT GAA GTG GTGTTC</u> <u>ACG GAG AAC</u></b>	Extremo 3' de p23(nts 18994-19017 del clon CTV T36) con extensión en el extremo 5' de la secuencia de reconocimiento de proteasa TEV Nla (nts <u>8499-8519 Genbank n.º acceso M11458, versión 1, 3 de agosto de 1993) (R.P.)</u>
<b>M-804</b>	78	<u>CAT TTA CGA ACG ATA GCC</u> <u>ATG GCT AGC AAA GGA GAA</u> <u>GAA</u>	Extremo 5' de GFP (nts 1-20) con extremo 3' de TEV 5'NTR (nts <u>126-143 Genbank n.º acceso M11458, versión 1, 3 de agosto de 1993) (F.P.)</u>

---

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se realizó PCR usando plásmidos diluidos (1:50) como moldes usando ADN polimerasa  
5 Vent (New England Biolabs, Ipswich, Ma.) según las recomendaciones del fabricante.

### Agro-Inyección/Infiltración

Se realizó la agro-inoculación de *Nicotiana benthamiana* según el procedimiento  
10 desarrollado por Gowda et al., (2005) con modificaciones menores. Se transformó *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 con el plásmido binario que contiene CTV, variantes (vectores de expresión) y supresores de silenciamiento (p19 del virus del enanismo

5 arbustivo del tomate (Gowda et al., 2005); p24 de GLRaV-2 (Chiba et al., 2006), P1/HC-Pro  
 de virus del mosaico del nabo (Kasschau et al., 2003) y p22 del virus de la clorosis del  
 tomate (Cañizares et al., 2008) por el método del choque térmico (37°C durante 5 minutos) y  
 posteriormente se hicieron crecer a 28°C durante 48 horas en placas de Luria Burtani (LB)  
 10 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) suplementadas con antibióticos (kanamicina (50 microgramos  
 (µg)/mililitro (ml)) y rifampicina (50 µg/ml)). Las colonias (dos colonias individuales por  
 construcción) se hicieron crecer durante la noche como cultivos semilla en medio LB  
 suplementado con antibióticos. Al día siguiente se usaron 0,5 ml del cultivo semilla para  
 15 inocular 35 ml de medio LB suplementado con antibióticos para crecimiento durante la  
 noche. El cultivo bacteriano se centrifugó a 6.000 rotaciones por minuto (rpm) y se  
 resuspendió en MgCl<sub>2</sub> 10 milimolar (mM) y MES 10 mM. El precipitado se lavó con MgCl<sub>2</sub> 10  
 mM y MES 10 mM y se resuspendió en medio de inducción; MgCl<sub>2</sub> 10 mM y MES 10 mM  
 que contenía acetosiringona a una concentración final de 150 µM. La suspensión se incubó  
 en el medio de inducción durante al menos 5 h antes de la inyección en el tallo o infiltración  
 en la superficie abaxial (inferior) de hojas de *N. benthamiana*.

### Condiciones de crecimiento de plantas

20 Las plantas de *N. benthamiana* mantenidas en una sala de crecimiento (21°C con 16 h de  
 luz en un periodo de 24 horas) se usaron para agro-inyección/agro-infiltración cuatro  
 semanas después de trasplantar.

### Infección de plantas de cítricos

25 Se obtuvieron viriones recombinantes de CTV para la infección de plantas de cítricos de  
 hojas infiltradas y/o sistémicas de *N. benthamiana*. Los viriones se purificaron parcialmente y  
 se enriquecieron por concentración sobre un colchón de sacarosa en un rotor TL 100 o  
 SW41 (Robertson et al., 2005). Los viriones de construcciones que expresan dos proteínas  
 exógenas se concentraron dos veces en un gradiente escalonado seguido por un gradiente  
 30 en colchón en rotores SW28 y SW41, respectivamente (Garnsey y Henderson, 1982). La  
 inoculación de plantas de cítricos se llevó a cabo por inoculación en solapa de corteza en  
 plántulas de *Citrus macrophylla* de 1-1,5 años de edad (Robertson et al., 2005) que se  
 hicieron crecer en un invernadero con temperaturas que variaban entre aproximadamente  
 25-32°C.

35

### **Preparación de protoplastos, transfección, aislamiento de ARN y análisis por transferencia Northern**

5 Se prepararon protoplastos de mesófilo de hoja de *N. benthamiana* según el procedimiento previamente desarrollado por Nava-Castillo et al., (1997). Hojas esterilizadas en la superficie de plantas de *N. benthamiana* de tres semanas de edad se cortaron suavemente en el lado inferior con una cuchilla estéril y se incubaron durante la noche en la oscuridad (16-20 h) en MMC 0,7 M (manitol 0,7 M, MES 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM) suplementado con celulosa al 1% (Yakult Honsh, Tokio, Japón) y enzimas pectinasa macerada al 0,5% (Calbiochem, La Jolla, Ca.).

10 Se generaron transcritos de ARN con caperuza in vitro de ADN de plásmido linealizado con *NotI* o *StuI* (Satyanarayana et al., 1999) usando ARN polimerasa Sp6 (Epicentre Technologies, WI) y se transfectaron en los protoplastos usando PEG (polietilenglicol) como describen Satyanarayana et al., (1999). Cuatro días después de la transfección, los protoplastos se usaron para la preparación de ARN total para análisis de hibridación por transferencia Northern y aislamiento de viriones. Los protoplastos se precipitaron en cantidades iguales en dos tubos eppendorf de 1,5 ml. El primer tubo se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C para el aislamiento de viriones para inocular

15 posteriormente un nuevo lote de protoplastos para amplificar viriones (Satyanarayana et al., 2000). El segundo tubo se usó para el aislamiento de ARN mediante la disrupción con tampón buffard de protoplastos seguida por extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y precipitación con etanol como han descrito previamente Navas-Castillo et al., (1997) y Robertson et al., (2005). El ARN total se resuspendió en 20 µl de

20 agua sin DNasa/RNasa y se usó en análisis de hibridación por transferencia Northern como han descrito previamente Lewandowski y Dawson (1998). Brevemente, el ARN aislado se desnaturalizó con calor en tampón de desnaturalización (formaldehído al 8,6%, formamida al 67% en MOPS 1X (acetato de sodio 5 mM, EDTA 1 mM, MOPS 0,02 M pH = 7,0) se separó en un gel de agarosa al 0,9% en MOPS 1X que contenía formaldehído al 1,9%, y se

25 transfirió a una membrana de nailon (Boehringer Mannheim, Alemania) por electrotransferencia. La prehibridación (al menos 1 h) e hibridación (durante la noche) se llevaron a cabo en un horno de hibridación (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a 68°C. Una sonda de ARN marcada con digoxigenina de 900 nts correspondiente al extremo 3' del genoma de CTV (la sonda es específica para la hebra de ARN positiva) (Satyanarayana et

30 al., 1999) se usó para la hibridación excepto cuando la inserción del material genético exógeno estaba detrás de p23 en cuyo caso una sonda de ARN marcado con digoxigenina

se produjo de ADN amplificado por PCR (cebador inverso que contiene 3'NTR de CTV y promotor del fago SP6 (C-1982) según la recomendación del fabricante (Boehringer Mannheim, Alemania) que es complementaria a la secuencia insertada detrás de p23 además de la secuencia 3'NTR de CTV.

5

### **Inmunotransferencias**

Después de pulverizar el tejido vegetal en nitrógeno líquido moliendo en un mortero con mano, se añadió (100 µl por 100 mg de tejido) tampón de Laemmli (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, 2-mercaptoetanol al 2,5%, SDS al 2%, azul de bromofenol al 0,1%, glicerol al 10%). La muestra se transfirió a un tubo de centrifuga de 1,5 ml y se hirvió en un baño de agua durante 3 minutos, seguido por centrifugación a máxima velocidad durante 2 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se almacenó a -20°C hasta su uso posterior. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de SDS-poliacrilamida al 12% (Bio-Rad, Hercules, Ca) seguido por dos horas de transferencia semiseca para transferir la proteína a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, Ca). La membrana se bloqueó durante 1 h a temperatura ambiente seguido por incubación con el anticuerpo primario de CP (1:5000), GFP (1:100) (Clontech Laboratories, Palo Alto, Ca.) o GUS (1:1000) (Molecular probes, Eugene, Or.) durante una hora seguido por incubación durante 1 h en anticuerpo secundario anti-conejo de burro conjugado a peroxidasa de rábano (1:10.000) (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido). Por último, se usó el sistema de quimioluminiscencia para revelado de inmunotransferencia (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) en una película de rayos X (Kodak, Rochester, NY) según las recomendaciones del fabricante.

### **Fotos de plantas y protoplastos**

Se tomaron imágenes de plantas con luz UV o blanca con una cámara Canon (Canon EOS Digital Rebel XTi 400D, Lake Success, Nueva York). Las imágenes de fluorescencia de primer plano de partes de plantas o protoplastos se tomaron usando un microscopio de disección fluorescente (microscopio de disección fluorescente Zeiss Stemi SV 11 UV, Carl Zeiss Jena, GmbH, Jena, Alemania). Las imágenes de protoplastos a alta resolución se tomaron usando un microscopio de barrido confocal (Leica TCS SL, Leica Microsystems, Inc., Exton, PA).

### **Enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA)**

Se usó ELISA en sándwich con doble anticuerpo según el procedimiento desarrollado por Garnsey y Cambra (1991). Se usó un anticuerpo policlonal de conejo (1 µg/ml) para recubrir la placa de ELISA. La muestra de tejido vegetal se diluyó a 1:20 en tampón de extracción PBS-T (solución salina tamponada en fosfato- Tween 20 al 1%). El anticuerpo de detección usado fue Acm ECTV 172 (dilución 1:100K).

### Ensayo GUS

Trozos de corteza de cítricos u hojas sistémicas de plantas de *N. benthamiana* agro-inoculadas que se esterilizaron en la superficie en alcohol (etanol al 70%) seguido por hipoclorito de sodio (solución al 10%) y lavar tres veces en agua destilada estéril antes de teñir para GUS. Las muestras se incubaron durante la noche en un tampón EDTA-fosfato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1M, Na<sub>2</sub>EDTA 1mM) que contenía X-gluc 1 mg/ml (sal ciclohexilamonio; Gold Biotechnology, St. Louis, MO). Se hizo la fijación del tejido en solución de etanol al 95%:ácido acético glacial (3:1).

### Ejemplo 1: Sistemas usados para examinar los vectores de expresión basados en CTV

Los vectores de expresión basados en CTV se examinaron en tres sistemas, protoplastos de mesófilo de *N. benthamiana*, así como plantas enteras de *N. benthamiana* y *Citrus macrophylla*. El clon de ADNc de longitud completa de CTV (pCTV9R) y un mutante con la mayor parte del gen p33 deletado (pCTV9RΔp33), que tiene un sitio de restricción *Pst*I eliminado lo que hace la clonación más fácil y aún retiene la capacidad de infectar a la mayoría de las variedades de cítrico (Tatineni et al., 2008), se usó para construir las construcciones para infectar plantas enteras. Se hicieron ensayos relativamente rápidos en protoplastos de *N. benthamiana*, que requiere que se construyan las construcciones en el plásmido de transcripción SP6 (Satyanarayana et al., 1999). Un minireplicón pCTVΔCln 333R (Gowda et al., 2001), con la mayoría de los genes en 3' eliminados, era conveniente para usar en protoplastos. El fin último para obtener árboles de cítricos infectados con los diferentes vectores de expresión de CTV era mucho más difícil y requería tiempo. Hasta ahora, agro-inocular árboles de cítricos se ha demostrado difícil. Por tanto, para evitar esta dificultad, se amplificaron y concentraron viriones para la inoculación de árboles de cítricos por corte en el tallo o inoculación en solapa de corteza (Robertson et al., 2005; Satyanarayana et al., 2001). Los protoplastos de *N. benthamiana* se pueden inocular con transcritos producidos in vitro de construcciones de CTV recombinantes y el virus amplificar pasando sucesivamente viriones en savia cruda a través de una serie de protoplastos

(Folimonov et al., 2007; Satyanarayana et al., 2001; Tatineni et al., 2008). Además, se pueden amplificar CTV recombinantes en plantas de *N. benthamiana* después de agro-inoculación (Gowda et al., 2005). El virus puede infectar células de mesófilo de áreas de hojas agro-infiltradas, pero según el virus se mueve sistémicamente a hojas superiores no inoculadas, se limita a tejidos vasculares y habitualmente induce aclaramiento de nervadura y después necrosis de nervadura. Todas las construcciones de vectores se examinaron durante la infección sistémica de plantas de *N. benthamiana*. Puesto que los viriones de CTV no se resuspenden después de centrifugar a un precipitado, los viriones se tienen que concentrar por centrifugación a través de un gradiente escalonado de sacarosa (Garnsey et al., 1977; Robertson et al., 2005). Después de la inoculación, las partes superiores de las plantas de cítricos se eliminaron, y las infecciones víricas sistémicas se siguieron en nuevo crecimiento después de 2-3 meses. Una vez los árboles se infectaron, se usó después inóculo (yemas, trozos de hojas, brotes) de las primeras plantas infectadas para propagar nuevas plantas para experimentación. El proceso entero lleva aproximadamente un año. Por esta razón, los inventores eligieron examinar solo las construcciones de vectores más prometedoras en árboles de cítricos. Algunas de las construcciones posteriormente desarrolladas todavía no están en cítricos.

## **Ejemplo 2: Adición de un gen extra en diferentes localizaciones en el genoma de CTV**

20

### ***Inserciones en el sitio del gen p13***

El vector de CTV eficaz desarrollado previamente (Folimonov et al., 2007) tiene el gen adicional insertado entre los dos genes de las proteínas de cubierta, colocando el gen exógeno como el sexto gen desde el extremo 3'. Con todo, los genes que más se expresan en CTV tienden a estar más cerca al extremo 3'. Por tanto, parecía que colocar un gen insertado más cerca del extremo 3' produciría mayores niveles de expresión. P13, el tercer gen desde el extremo 3', es un gen relativamente muy expresado y no es necesario para la infección de la mayoría de la gama de huéspedes de CTV (Tatineni et al., 2008; Tatineni et al., en preparación). Con todo, la sustitución del ORF de p13 con el ORF de GFP no tuvo éxito en intentos anteriores (Folimonov et al., 2007). Había razones posibles para el fracaso. La construcción previa se diseñó con la asunción de que la traducción se iniciaba en el primer codón de iniciación, pero el ORF de p13 tiene un segundo AUG en el mismo marco de lectura. La traducción podría empezar normalmente en el segundo AUG. Sin embargo, la fusión del ORF de GFP detrás del segundo AUG en el mismo marco de lectura tampoco expresó el gen indicador (Gowda et., resultado no publicado). Una segunda posibilidad es

35

que el elemento controlador (CE) de p13 pudiera extenderse en el ORF de p13 o que el reclutamiento de ribosomas está dirigido desde dentro del ORF. Aquí, los inventores delecionaron el CE y ORF de p13 e insertaron un nuevo ORF detrás de un CE heterólogo en la posición de p13. El ORF de GFP controlado por el CP-CE de BYSV (101 nts de 8516-8616 acceso # U51931, versión 1, 5 de abril de 1999), GLRaV-2 (198 nts de 9454-9651 acceso # DQ286725, versión 2, 4 de diciembre de 2009) o BYV (94 nts de 13547-13640 Genbank n.º acceso AF190581, versión 1, 4 de enero de 2000) se introdujeron en pCTV9RΔp33 como un sustituto para los nts 17293-17581 (CTV33-Δ13-BY-GFP-57, CTV33-Δ13-G-GFP-65, CTV33-Δ13-B-GFP-66 respectivamente) (Fig. 1 A). Se usaron transcritos de ARN para inocular una serie de protoplastos para determinar si las construcciones se podían replicar y si los viriones se formaban suficientemente para pasar en savia cruda a un nuevo lote de protoplastos. La fluorescencia de protoplastos infectados (datos no presentados) y análisis de hibridación por transferencia Northern demostraron el pase sucesivo de los vectores de expresión a través de transferencias de protoplastos (Fig. 1B). Además, el nivel del ARNm de GFP era similar al de CP. Las secuencias de vectores CTV33-Δ13-BY-GFP-57, CTV33-Δ13-G-GFP-65 y CTV33-Δ13-B-GFP-66 se transfirieron después al plásmido binario de *Agrobacterium* para agro-inoculación de plantas de *N. benthamiana*. Los tres vectores infectaron y se movieron sistémicamente en tejido vascular de las plantas de *N. benthamiana* como se indica por la fluorescencia en hojas, yemas, flores y corola (Fig. 1C), fenotipo de aclaramiento de nervadura en fases tempranas, así como confirmado por ELISA (datos no presentados).

CTV33-Δ13-G-GFP-65 y CTV33-Δ13-B-GFP-66 se amplificaron y usaron para inocular plantas de *Citrus macrophylla*. Las plantas inicialmente infectadas mostraron fluorescencia brillante en tejido vascular (Fig. 1D). La fluorescencia siguió en estas plantas 2 años después de la inoculación.

El ORF de GFP (720 nts) se sustituyó con el ORF de GUS (1812 nts) en la misma posición para examinar la expresión de un gen exógeno mayor. Se seleccionó el CP-CE de BYSV para dirigir el ORF de GUS en el vector de expresión CTV33-Δ13-BY-GUS-61 (Fig. 2A). Se transfectaron transcritos de esta construcción en protoplastos donde el virus se replicó y pasó eficazmente de un lote de protoplastos a otro como se indica por análisis de hibridación por transferencia Northern (Fig. 2B). Además, reveló que el nivel de acumulación del ARNm de GUS era idéntico al ARNm de CP, y los ARNm de CP y CPm de vectores eran similares a los del virus de tipo salvaje. La agro-inoculación de plantas de *N. benthamiana* reveló que la construcción infectó y se extendió por todo el tejido vascular de las plantas

basado en tinción de GUS y confirmado por ELISA (datos no presentados) y fenotipo de aclaramiento de nervadura.

Viriones aislados de hojas de plantas de *N. benthamiana* de CTV33- $\Delta$ 13-BY-GUS-61 infectaron plantas de *Citrus macrophylla* confirmado por ELISA (datos no presentados) y la bioactividad de la proteína GUS (Fig. 2C). El gen GUS todavía era biológicamente activo en cítricos 1,5 años después de la inoculación.

Técnicamente, las construcciones anteriores sustituyeron un gen (p13) más que añadir un gen extra. Para examinar un vector con un gen extra entre p13 y p20, se insertó el CP-CE de BYSV que controla el ORF de GFP entre los nts 17685-17686 para dar CTV33-13-BY-GFP-69 (Fig. 3A). Este vector debe producir un ARN subgenómico extra entre los ARN subgenómicos de p13 y p20. El vector CTV33-13-BY-GFP-69 se examinó en protoplastos y plantas de *N. benthamiana*. En el sistema de protoplastos, CTV33-13-BY-GFP-69 se replicó eficazmente y se pasó con éxito de un lote de protoplastos a otro demostrando eficaz replicación y formación de viriones como se indica por fluorescencia (datos no presentados) y análisis de hibridación por transferencia Northern (Fig. 3B). El ARNm exógeno se acumuló a un nivel relativamente alto, pero el ARNm de CP se redujo. Similares a las construcciones de sustitución de p13, la agro-inoculación del vector de expresión CTV33-13-BY-GFP-69 en plantas de *N. benthamiana* permitió que el nuevo vector infectara y se extendiera a lo largo del tejido vascular (Fig. 3C).

La construcción CTV33-13-BY-GFP-69 infectó plantas de *Citrus macrophylla* como se indica por la fuerte fluorescencia a lo largo del tejido vascular (Fig. 3C) y confirma por ELISA (datos no presentados). Las plantas aún tenían fluorescencia 2 años después de la inoculación.

### ***Inserción entre p20 y p23***

Para examinar la expresión de un gen exógeno más cerca de la 3' NTR de CTV, se insertó un gen extra entre los genes p20 y p23 (nts 18312-18313). Se usó el CP-CE de BYV o BYSV para dirigir el ARNm de GFP en dos vectores basados en T36 CTV9R $\Delta$ p33 (CTV33-20-B-GFP-49 y CTV33-20-BY-GFP-58) (Fig. 4A). Los nuevos vectores produjeron un ARNm ARNsg extra entre los ARNsg de p20 y p23 (Fig. 4B). Sin embargo, la acumulación del ARNm sg de p20 estaba sustancialmente reducida. Ambos vectores se replicaron y pasaron en protoplastos, pero el pase de protoplastos se redujo como se demuestra por números reducidos de células con fluorescencia de GFP e hibridación por transferencia Northern (Fig.



4B & C). Cuando se infiltraron los vectores tanto CTV33-20-B-GFP-49 como CTV33-20-BY-GFP-58 en hojas de *N. benthamiana* para expresión transitoria, los vectores se replicaron y produjeron cantidades abundantes de GFP como se indica por fluorescencia (datos no presentados) y análisis de inmunotransferencia (Fig. 4D). Sin embargo, cuando se agro-inocularon en plantas de *N. benthamiana*, las construcciones se replicaron, pero el movimiento a hojas superiores no inoculadas era aleatorio y con frecuencia sin éxito. Puesto que la infección sistémica de plantas de *N. benthamiana* era marginal, no se hizo intento de inocular cítricos.

### 10 ***Inserción entre p23 y 3'NTR***

La siguiente posición que se va a examinar era hacer el gen insertado el gen más cercano al extremo 3'. Puesto que la expresión génica en CTV tiende a ser más alta para posiciones de genes más cercanos al extremo 3', se podría esperar que esta posición produjera el nivel de expresión más alto de un gen exógeno (Navas-Castillo et al., 1997; Hilf et al., 1995). Aunque se ha analizado la 3' NTR (Satyanarayana et al., 2002a), no se sabía que efecto tendría un gen extra en el área sobre la eficacia de replicación. La inserción de un gen extra entre el gen CP y la 3'NTR en el virus del mosaico del tabaco (TMV) y virus del mosaico de la alfalfa (AMV) fracasó para producir vectores viables (Dawson et al., 1989; Sánchez-Navarro et al., 2001). Se insertó el CP-CE de BYSV, GLRaV-2 o BYV delante del ORF de GFP entre los nucleótidos 19020 y 19021 creando los vectores CTV33-23-BY-GFP-37, CTV33-23-G-GFP-40 y CTV33-23-B-GFP-42, respectivamente (Fig. 5A). Todas las construcciones cuando se transfectaron en protoplastos se replicaron y pasaron eficazmente como indica el análisis de hibridación por transferencia Northern (Fig. 5B) y fluorescencia de GFP (datos no presentados). El ARNm de GFP fue el ARNm que se acumuló más, con solo ligeros descensos respecto a los otros ARNm comparados con los del virus de tipo salvaje (Fig. 5B). Además, las construcciones con una inserción de GFP 3' del ORF de p23 tenían la acumulación más alta del ARNm de gen exógeno entre las construcciones examinadas. Las construcciones CTV33-23-BY-GFP-37, CTV33-23-G-GFP-40 y CTV33-23-B-GFP-42 se agro-inocularon en plantas de *N. benthamiana*. Las infecciones se propagaron sistémicamente a lo largo del tejido vascular como demuestra la fluorescencia (Fig. 5C), fenotipo (aclaramiento de nervadura seguido por necrosis), y ELISA (datos no presentados). La fluorescencia en el tejido vascular de plantas de *N. benthamiana* era extremadamente brillante y siguió durante la vida de las plantas infectadas (Fig. 5C).

35

La construcción CTV33-23-BY-GFP-37 se amplificó por pase a través de 12 conjuntos de protoplastos antes de la inoculación en cítricos. Plantas de *C. macrophylla* que se inocularon en solapa de corteza con los viriones concentrados se infectaron. La infección de cítricos se confirmó por fluorescencia de GFP (Fig. 5D) y ELISA (datos no presentados). La inoculación de cítricos con la construcción CTV33-23-G-GFP-40 se hizo a través de amplificación en plantas de *N. benthamiana* agro-inoculadas. El índice de infección era de 1 de 4 plantas de *C. macrophylla* indicado por fluorescencia (Fig. 5D) y confirmado por ELISA (datos no presentados). Similar a *N. benthamiana*, las plantas de cítricos expresaron fluorescencia brillante en el tejido vascular 12 semanas después de la inoculación y todavía tienen fluorescencia 2,5 años después (Fig. 5D).

Para examinar la capacidad del vector para expresar un gen más grande en esta posición, se insertó el ORF de GUS detrás de CP-CE de BYSV 3' del gen p23 produciendo la construcción CTV33-23-BY-GUS-60 (Fig. 6A). La construcción se replicó en protoplastos transfectados con éxito. Sin embargo, los niveles de acumulación de todos los ARN subgenómicos de CTV disminuyeron profundamente comparados con los del virus de tipo salvaje demostrado por análisis de hibridación por transferencia Northern (Fig. 6B). Además, la construcción CTV33-23-BY-GUS-60 se pasó mal en protoplastos (datos no presentados). Con todo, después de la agro-inoculación de plantas de *N. benthamiana*, el vector se replicó y movió sistémicamente como demuestran los síntomas sistémicos (aclaramiento de nervadura seguido por necrosis), ELISA (datos no presentados) y ensayos GUS. La actividad GUS en las plantas de *N. benthamiana* se produjo continuamente en hojas viejas y nuevas hasta la muerte de la planta (Fig. 6C). Similar a CTV33- $\Delta$ 13-BY-GUS-61, la localización entre p23 y 3'NTR fue capaz de acomodar genes de moderadamente a grandes, aunque con un efecto diferencial sobre los niveles de ARN sg de genes anteriores (Fig. 5B & Fig. 6B).

Se usaron viriones concentrados de la construcción CTV33-23-BY-GUS-60 para inocular plantas de *C. macrophylla*, que se infectaron confirmado por ELISA (datos no presentados) y actividad del gen GUS (Fig. 6C). Además, la actividad GUS y análisis de inmunotransferencia revelaron la presencia del gen GUS en cítricos 1,3 años después de la inoculación (Fig. 6C, Fig. 19).

### **Ejemplo 3: Producción de polipéptido extra sin producir un ARNm subgenómico extra**

35

#### **Estrategia de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES)**

**El IRES del virus del grabado del tabaco (TEV)**

La 5'NTR de TEV media la traducción independiente de caperuza del ARNm vírico. Estudios sobre la 5'NTR de TEV demuestran su capacidad de iniciar la traducción de un ORF interno en un ARNm bicistrónico (Gallie, 2001; Niepel y Gallie, 1999). La 5'NTR de TEV (nts 2-144 acceso de Genbank # DQ986288, versión 1, 18 de enero de 2007) se insertó en un minireplicón de CTV detrás del ORF de p23 (entre nts 19020-19021) seguido por el ORF de GFP (CTVp333R-23-ITEV-GFP) (Fig. 7A) para examinar si un ARNm subgenómico bicistrónico funcionaría con este virus. Aunque el análisis de hibridación por transferencia Northern demostró que el minireplicón se replicaba y producía cantidades abundantes del ARNm bicistrónico en protoplastos de *N. benthamiana* transfectados, no se observó fluorescencia de GFP, lo que sugiere una falta de traducción del segundo ORF en el ARNm bicistrónico. Los inventores también examinaron la construcción de IRES de la 5'NTR de TEV en CTV de longitud completa en protoplastos y plantas de *N. benthamiana*. La construcción CTVp33-23-ITEV-GFP-41 se pasó eficazmente de protoplasto al siguiente conjunto de protoplastos (Fig. 7B), lo que indica buena replicación y formación de viriones, pero no se observaron protoplastos con fluorescencia demostrando que este IRES no funcionaba bien en CTV (datos no presentados). Esta construcción infectó y se movió sistémicamente en plantas de *N. benthamiana* basado en los síntomas sistémicos de aclaramiento de nervadura seguido por necrosis y ELISA (datos no presentados), pero no se observó fluorescencia de GFP con luz UV (datos no presentados).

**IRES de secuencia complementaria de ribosoma activa (ARC)**

La inserción de una secuencia consenso de IRES obtenida de análisis de ARNm huésped y víricos (el IRES 3xARC-1 manipulado (86 nts) (Akbergenov et al., 2004)) se examinó a continuación para actividad en CTV. Este IRES se fusionó detrás del ORF de p23 (nts 19020-19021) tanto en el minireplicón de CTV (CTVp333R-23-I3XARC-GFP) como en  $\Delta$ p33CTV9R (CTV33-23-I3XARC-GFP-43) como se ha descrito anteriormente (Fig. 7A). Sin embargo, después de la infección de protoplastos y plantas, no se observó fluorescencia de GFP incluso aunque el virus se replicó bien en ambos (Fig. 7B).

**Fusión de polipéptidos**

35

P23, el gen más expresado de CTV, es una proteína multifuncional que es esencial para la infección de cítricos. P23 es un supresor de silenciamiento y controla la proporción de ARN positivo respecto a negativo en células infectadas a través de un dominio de unión a ARN constituido de residuos de aminoácidos cargados positivos y un dominio de dedo de Zn presente entre los aminoácidos 50-86 (Lopez et al., 2000; Satyanarayana et al., 2002b; Lu et al., 2004). Para crear una fusión génica, los motivos de proteasas HC-Pro o Nla de TEV se seleccionaron para fusionar al extremo C-terminal de p23 (entre los nts 19017 y 19018) (Fig. 8). La secuencia de reconocimiento de proteasa de HC-Pro y Nla se duplicó entre p23 y la proteasa y entre la proteasa y GFP creando los CTV33-23-HC-GFP-72 y CTV33-23-Nla-GFP-73, respectivamente (Fig. 8). El procesamiento del motivo de proteasa de p23 debe liberar p23 con 7 aminoácidos extra en su extremo C-terminal en el caso de HC-Pro y 6 aminoácidos en el caso de Nla. La proteína GFP debe tener dos aminoácidos extra y uno extra después de ser cortada de HC-Pro y Nla, respectivamente. Las secuencias de reconocimiento se cambiaron entre HC-Pro y Nla creando los vectores CTV33-23-HCØ-GFP-74 y CTV33-23-NlaØ-GFP-75 como controles que no se pueden cortar (Fig. 8). Todos los vectores de fusión de polipéptidos se crearon en vectores binarios de CTV para infección de plantas porque se mostró que en protoplastos la fusión de p23 no afectaba la capacidad de replicarse y pasar entre conjuntos de protoplastos (Tatineni y Dawson, resultado no publicado). En hojas infiltradas de *N. benthamiana*, todas las construcciones fluorescieron de forma similar entre sí y respecto a las construcciones de GFP libre detrás de p23 (Fig. 9A). Además, el análisis de inmunotransferencia de hojas infiltradas indicó un procesamiento casi perfecto del gen indicador de la fusión de polipéptidos (Fig. 10). La proteína GFP no se localizó en el núcleo a diferencia de la fusión a p23 sin procesamiento de proteasas que libere el gen indicador. Tras la agro-inoculación de plantas, solo las construcciones con la proteasa y sus sitios de procesamiento homólogos fueron capaces de moverse sistémicamente a hojas superiores no inoculadas. La fluorescencia en hojas superiores no inoculadas era más débil que esa para los vectores de expresión CTV33-23-BY-GFP-37, CTV33-23-G-GFP-40 y CTV33-23-B-GFP-42 que portan GFP bajo su propio elemento controlador (Fig. 9B). Además, era más fácil visualizar la fluorescencia en la superficie de la hoja abaxial más que en la adaxial (Fig. 9C). Tras la inoculación de cítricos con la construcción CTV33-23-HC-GFP-72, una planta fue positiva con valor de ELISA relativamente bajo comparado con otros (datos no presentados). No se detectó actividad del gen indicador.

#### 35 **Ejemplo 4: Producción de más de una proteína exógena extra de vectores de CTV**

### **Uso de elementos controladores únicos para expresar múltiples proteínas**

Para aprovechar la estrategia de polipéptidos para expresar múltiples genes dirigidos por el mismo elemento controlador en un vector basado en CTV, se creó un polipéptido de fusión que consistía en GFP/proteasa (Pro)/GUS. Se usaron dos motivos diferentes de proteasas en las diferentes construcciones, HC-Pro y NIa, con sus motivos proteolíticos y secuencias de reconocimiento separando el ORF de GFP y ORF de GUS (Fig. 14A & 16) (Carrington y Dougherty, 1988, Carrington et al., 1989). Teóricamente, en el caso de que NIa fuera el motivo de proteasa en la fusión, seis aminoácidos extra se acoplan con la proteína N-terminal (GFP) en su extremo C-terminal mientras que solo un aminoácido extra se añade al extremo N-terminal de GUS. De forma similar, donde HC-Pro era la proteasa en el polipéptido fusión, se añaden 7 aminoácidos extra al extremo C-terminal de GFP y se añaden dos aminoácidos extra al extremo N-terminal de GUS. Los genes de fusión variaban de tamaño entre 3127 y 3480 nts.

15

### **Sustitución del gen p13**

Las dos fusiones de GFP/Pro/GUS descritas anteriormente se introdujeron en el sitio de p13 de CTV en el vector binario de agro-inoculación bajo el control del CP-CE de BYSV (CTV33- $\Delta$ 13-BYGFP-HC-GUS-77 con el motivo de proteasa HC-Pro y CTV33- $\Delta$ 13-BYGFP-NIa-GUS-78 con el motivo de proteasa NIa) (Fig. 11A). Las construcciones se agro-inocularon en *N. benthamiana* para seguir la capacidad para infectar sistémicamente la planta y producir GUS y GFP. Ambos genes se produjeron basado en sus ensayos (Fig. 11B). El análisis por inmunotransferencia indicó el procesamiento eficaz de la proteína GFP de la fusión de polipéptidos (Fig. 10). El virus se multiplicó y propagó a altos títulos en plantas de *N. benthamiana* indicado por desarrollo de síntomas en las hojas superiores (Fig. 11B) y ELISA. Sin embargo, el nivel de fluorescencia de GFP era menor que el de los vectores CTV33- $\Delta$ 13-BY-GFP-57, CTV33- $\Delta$ 13-G-GFP-65 y CTV33- $\Delta$ 13-B-GFP-66 que expresan GFP sola y se propagan más lentamente a las hojas superiores no inoculadas que esos vectores (datos no presentados). En plantas de *N. benthamiana*, se demostraron fluorescencia solapante y actividad enzimática de GUS 7 meses después de la inyección de la construcción revelando su estabilidad (Fig. 12).

### **Inserción entre p23 y 3'NTR**

35

En un intento de mejorar el nivel de expresión de GFP y GUS, el polipéptido fusión se movió más cerca de la 3'NTR. El gen de fusión con cualquiera de CP-CE de BYSV, GLRaV-2 o BYV con la proteasa HC-Pro se insertó entre p23 y 3'NTR denominado CTV33-23-BY-GFP-HC-GUS-51, CTV33-23-G-GFP-HC-GUS-53 y CTV33-23-B-GFP-HC-GUS-55 mientras que las construcciones con la proteasa Nla se nombraron, CTV33-23-BY-GFP-Nla-GUS-52, CTV33-23-G-GFP-Nla-GUS-54 y CTV33-23-B-GFP-Nla-GUS-56, respectivamente (Fig. 13). Después de agro-inocular plantas de *N. benthamiana*, todas las construcciones se multiplicaron y propagaron a las hojas superiores no inoculadas indicado por fluorescencia de GFP (Fig. 14A) y actividad GUS (Fig. 14A). De manera similar a las construcciones CTV33- $\Delta$ 13-BYGFP-HC-GUS-77 y CTV33- $\Delta$ 13-BYGFP-Nla-GUS-78, se demostró fluorescencia solapante con actividad enzimática GUS 7 meses después de la inyección indicando la estabilidad de la fusión. Sin embargo, plantas de *C. macrophylla* infectadas con CTV33-23-BY-GFP-HC-GUS-51 solo revelaron fluorescencia tenue y casi nada de actividad GUS (Fig. 14B) y altos valores de ELISA.

15

### **Ejemplo 5: Uso de múltiples promotores para expresar genes exógenos simultáneamente**

#### ***Complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC) en CTV***

20

Para examinar la inserción de dos CP-CE que controlan diferentes ORF, se usó el sistema BiFC, que produce fluorescencia visible solo cuando las dos proteínas se acumulan en la misma célula. Este sistema se desarrolló usando bJun fusionado al extremo N-terminal de EYFP (A.A. 1-154) (denominado bJunN) y el ORF de bFos fusionado al extremo C-terminal de EYFP (A.A. 155-238) (denominado bFosC) (Hu et al., 2002).

25

Ambas proteínas se transportan al núcleo donde interaccionan directamente permitiendo que la proteína EYFP recupere su patrón de plegamiento de tipo salvaje y produzca emisión de fluorescencia tras la activación por una fuente de luz azul (la longitud de onda de excitación es 525 nm y la longitud de onda de emisión es 575 nm) (Hu et al., 2002). Uno o ambos componentes de BiFC se introdujeron en el minireplicón de CTV 3' del ORF de p23 (entre nts #19020 y 19021 Acceso de Genbank # AY170468, versión 1, 11 de septiembre de 2003) denominados CTVp333R-23-BYbJunN, CTVp333R-23-GbFosC y CTVp333R-23-BYbJunN-GbFosC (Fig. 15A). El análisis de hibridación por transferencia Northern demuestra la transfección con éxito de las tres construcciones en protoplastos de *N. benthamiana* (Fig. 15B). Los dos factores de transcripción interactuaron en la célula vegetal

35

demostrado por fluorescencia nuclear observada solo en protoplastos infectados con CTVp333R-23-BYbJunN-GbFosC (Fig. 15C). Merece la pena indicar que el tamaño de los dos genes insertados es aproximadamente idéntico al del ORF de GUS.

- 5 Como control para los experimentos de BiFC, los inventores utilizaron los vectores CTV333R-23-BYbJunN y CTVp333R-23-GbFosC que solo producen un componente (Fig. 15B). Ninguna construcción mostró fluorescencia en el núcleo.

### ***Expresión de múltiples genes exógenos simultáneamente en la misma localización***

10

**Sustitución de p13.** Ambos genes se introdujeron en un  $\Delta$ p33CTV9R (Satyanarayana et al., 1999, 2000, 2003; Tatineni et al., 2008) como sustitución del gen p13 (sustitución de los nucleótidos deletados entre 17292 y 17581), produciendo CTV33- $\Delta$ 13-BYbJunN-GbFosC-76 (Fig. 16A). La transfección de protoplastos con los transcritos de ARN de CTV33- $\Delta$ 13-BYbJunN-GbFosC-76 produjo fluorescencia nuclear de los protoplastos infectados (datos no presentados). De forma similar, hojas infiltradas de plantas de *N. benthamiana* con CTV33- $\Delta$ 13-BYbJunN-GbFosC-76 de longitud completa emitieron fluorescencia nuclear (Fig. 16B). Por el contrario, las hojas infiltradas con las construcciones CTV33-23-BYbJunN-97 y CTV33-23-GbFosC-98 no mostraron ninguna fluorescencia nuclear (datos no presentados). El seguimiento del floema del tallo y la nervadura de las hojas de plantas de *N. benthamiana* infiltradas con CTV33- $\Delta$ 13-BYbJunN-GbFosC-76 siete semanas después de la infiltración reveló fluorescencia del tejido vascular que indica la capacidad de esta construcción para infectar sistémicamente las hojas superiores de *N. benthamiana* (Fig. 16B).

25

**Inserción entre p23 y 3'NTR.** El siguiente paso fue examinar la expresión de los dos genes cuando se colocan más cerca del extremo 3'. Los dos componentes génicos del sistema BiFC se introdujeron en CTV $\Delta$ p33 detrás de p23 (entre los nts # 19020 y 19021), CTV33-23-BYbJunN-GbFosC-59 (Fig. 17A). Tras la transfección de ARN de la construcción CTV33-23-BYbJunN-GbFosC-59, se observó fluorescencia nuclear de los protoplastos infectados en el microscopio de fluorescencia. Sin embargo, era difícil pasar la nueva construcción de un lote de protoplastos a otro, similar a GUS y los genes de fusión GFP/Pro/GUS insertados en la misma localización. Tras agro-infiltración de plantas de *N. benthamiana* con CTV33-23-BYbJunN-GbFosC-59 en CTV de longitud completa, se observó fluorescencia en áreas infiltradas. Los síntomas sistémicos similares a los esperados para la infección de *N. benthamiana* por CTV estaban extremadamente retrasados. Sin embargo, el seguimiento de

35

las hojas superiores no inoculadas y tejido de floema del tallo siete semanas después de la agro-infiltración de hojas reveló fluorescencia de núcleos del tejido vascular, demostrando la infección sistémica por el vector (Fig. 17C). Estos resultados confirmados por ELISA, indican que la posición entre p23 y 3'NTR puede acomodar dos genes extra sin afectar la capacidad de CTV de invadir sistémicamente las plantas. Similar a ambos genes sustituyendo a p13 en la construcción CTV33- $\Delta$ 13-BYbJunN-GbFosC-76 hubo un retraso en el periodo de tiempo de colonizar los tejidos vasculares superiores por la construcción CTV33-23-BYbJunN-GbFosC-59. La fluorescencia nuclear del tejido de floema del tallo sistémico indica que CTV33- $\Delta$ 13-BYbJunN-GbFosC-76 infectó más células que la construcción CTV33-23-BYbJunN-GbFosC-59 (Fig. 16B & Fig. 17C). Esta diferencia en el número de células infectadas indica la mejor capacidad de CTV33- $\Delta$ 13-BYbJunN-GbFosC-76 para moverse en *N. benthamiana* comparado con CTV33-23-BYbJunN-GbFosC-59.

#### **Ejemplo 6: Expresión de múltiples genes exógenos simultáneamente de diferentes localizaciones**

Para expresar múltiples genes exógenos de dos posiciones diferentes, los inventores eligieron sustituir el gen p13 e insertar un segundo gen detrás de p23. CTV33- $\Delta$ 13-BYbJunN-23-GbFosC-67 (Fig. 17A) se creó mediante la sustitución del gen p13 con el CP-CE de BYSV dirigiendo el ORF de bJunN y el CP-CE de GLRaV-2 controlando el ORF de bFosC insertado entre el ORF de p23 y la 3'NTR. Se transfectó CTV33- $\Delta$ 13-BYbJunN-23-GbFosC-67 en protoplastos y el análisis de transferencia Northern reveló la replicación del virus (Fig. 17B). Sin embargo, la acumulación del ARNm de p23 se redujo mucho. CTV33- $\Delta$ 13-BYbJunN-23-GbFosC-67 se agro-inoculó en *N. benthamiana*. La infiltración en las hojas indicó fluorescencia nuclear de las células infectadas (Fig. 17C) que eran mucho menores en número comparadas con las construcciones CTV33- $\Delta$ 13-BYbJunN-GbFosC-76 y CTV33-23-BYbJunN-GbFosC-59. El aislamiento de viriones de hojas y la transfección de protoplastos se llevó a cabo produciendo fluorescencia nuclear de protoplastos infectados indicando la formación con éxito de viriones biológicamente activos. Sin embargo, no se logró la infección sistémica en *N. benthamiana* indicado por la falta de fluorescencia nuclear en el tallo y hojas superiores no inoculadas de *N. benthamiana* y confirmado por ELISA.

Para estudiar adicionalmente la expresión simultanea de múltiples genes de diferentes localizaciones como antes, se manipuló CTV33- $\Delta$ 13-BYGUS-23-GGFP-71 de modo que el ORF de GUS bajo el control del CP-CE de BYSV sustituyó el gen p13 (nts 17292-17582) y el ORF de GFP bajo el control del CP-CE de GLRaV-2 se insertó entre p23 y 3'NTR (nts



19020 y 19021) (Fig. 18A). Se transfectaron transcritos de ARN de CTV33- $\Delta$ 13-BYGUS-23-GGFP-71 en protoplastos de *N. benthamiana* y el análisis por hibridación Northern indicó replicación eficaz de la construcción en protoplastos (Fig. 18B). La infiltración de plantas de *N. benthamiana* con la construcción CTV33- $\Delta$ 13-BYGUS-23-GGFP-71 produjo replicación del virus indicado por fluorescencia visible con una luz UV y por actividad GUS (datos no presentados). Las plantas agro-inoculadas empezaron a mostrar actividad GUS y fluorescencia en las hojas superiores no inoculadas 6 semanas después de la infiltración (Fig. 18C). La infección sistémica de las hojas superiores fue ligeramente más lenta que con construcciones con solo GFP sola. Además, el fenotipo de nervadura aclarándose seguido por necrosis asociada con infección de CTV del tejido vascular de *N. benthamiana* se produjo después que la de vectores de genes únicos. El nivel de fluorescencia cuando se observó con luz UV parecía ser ligeramente menor que el de construcciones de genes únicos. Sin embargo, la fluorescencia de GFP era más en plantas infectadas con la construcción CTV33- $\Delta$ 13-BYGUS-23-GGFP-71, que estaba controlada por su propio CE, comparado con la de la fusión en construcciones (CTV33-23-BY-GFP-HC-GUS-51, CTV33-23-BY-GFP-NIa-GUS-52, CTV33-23-G-GFP-HC-GUS-53, CTV33-23-G-GFP-NIa-GUS-54, CTV33- $\Delta$ 13-BYGFP-HC-GUS-77 y CTV33- $\Delta$ 13-BYGFP-NIa-GUS-78). La actividad de ambos genes siguió hasta la muerte de las plantas de *N. benthamiana*. Similarmente, en cítricos la expresión de ambos genes fue mejor que los mismos genes en las construcciones CTV33- $\Delta$ 13-BYGFP-NIa-GUS-78 y CTV33-23-BY-GFP-HC-GUS-51.

### **Ejemplo 7: Nivel de expresión de genes exógenos de las diferentes construcciones en cítricos**

Es difícil comparar directamente la expresión de genes exógenos de diferentes vectores en cítricos debido a las diferencias en los tiempos de infección, las edades de los tejidos y los efectos del casete de gen exógeno insertado en la replicación de virus. Con todo, la presencia de proteína en cítricos es la mejor medida del nivel de expresión. Por tanto, se usó análisis de inmunotransferencia para comparar el nivel relativo de expresión de las diferentes construcciones de GFP y GUS en cítricos respecto a la de la proteína CP, un gen de expresión constitutiva para determinar los niveles de replicación. Las inmunotransferencias usando anticuerpo de GFP y el anticuerpo de CP revelaron una tendencia que confirma los niveles de expresión relativos mayores cerca del extremo 3' del genoma y un nivel de expresión menor cuando el gen insertado se mueve más lejos del extremo 3' con la excepción para la inserción entre p13 y p20 (Fig. 19A). Al contrario, la

expresión de GUS en cítricos reveló un nivel de expresión relativo mayor como sustitución de p13 más que inserción detrás de p23 (Fig. 19B).

### **Ejemplo 8: Vectores de genes múltiples**

5

#### ***Construcción de plásmidos***

Se desarrollaron vectores de tres y cuatro genes introduciendo diferentes combinaciones de casetes génicos en el genoma de CTV en diferentes localizaciones. Tres de los vectores se desarrollaron en CTV9R $\Delta$ p33 en el fondo pCAMBIA 1380 (CTV33-BGFP-BYGUS-GTMVCP-79 (Fig. 26B), CTV33-BGFP-GbFosC-BYbJunN-81 (Fig. 27B) y CTV33- $\Delta$ 13-BGFP-BYbJunN-GbFosC-82 (Fig. 28B)). Los otros cuatro vectores de tres genes (CTV-BASL-BYPTA-CP7-119 (Fig. 23B), CTV-BASL-BYP10-CP7-131 (Fig. 25B), CTV-BASL-BYPTA-CP10-120 (Fig. 24B) y CTV-BRFP-BYGFP-CTMVCP-117 (Fig. 22B)) y un vector de cuatro genes (CTV $\Delta$ 13-BRFP-GbFosC-BYbJunN-CTMVCP-118 (Fig. 20B)) se desarrollaron modificando CTV9R en el fondo de pCAMBIA1380 alterado sustituyendo el ORF de higromicina con el ORF de p22 del virus de la clorosis del tomate. La mayoría de los casetes génicos se introdujeron en sus localizaciones por PCR de extensión solapada usando los cebadores enumerados en la tabla 1. La única excepción fue la inserción de la proteína fluorescente verde ciclo 3 entre el gen CPm y CP.

20

#### ***Expresión de tres y cuatro genes simultáneamente***

Después de expresar con éxito dos genes en *N. benthamiana* y cítricos con uno y dos elementos controladores diferentes, se están construyendo vectores para expresar tres y cuatro genes exógenos de tres y cuatro elementos controladores diferentes, respectivamente. Los genes indicadores usados en diferentes combinaciones fueron la proteína fluorescente verde (GFP ciclo 3, GFPC3), la proteína fluorescente roja (proteína fluorescente roja con etiqueta, RFP), complementación de fluorescencia bimolecular usando los factores de transcripción de mamíferos bFos y bJun (Hu et al., 2002), el gen de  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) de *Escherichia coli* y el gen de la proteína de cubierta (CP) del virus del mosaico del tabaco (TMV). Similarmente, se construyeron vectores de tres genes en diferentes combinaciones para expresar dos péptidos antimicrobianos (AMP) de *Tachypleus tridentatus* y *Sus scrofa*, lectina de *Allium sativum* (ASL) y aglutinina de *Pinellia ternata* (PTA). Los vectores de tres genes se expresaron de dos o tres localizaciones dentro del genoma del CTV.

35

**Expresión de tres genes exógenos de tres localizaciones diferentes simultáneamente**

Se construyeron seis vectores para expresar tres genes exógenos de tres localizaciones diferentes. Los vectores se construyeron para expresar genes de CTV9R $\Delta$ p33 o CTV9R de longitud completa.

**Vectores construidos para expresar tres genes de tres localizaciones diferentes en CTV9R $\Delta$ p33**

Se construyeron dos vectores insertando los tres casetes génicos extra en CTV9R $\Delta$ p33 creando los vectores de expresión CTV33-BGFP-BYGUS-GTMVCP-79 (Fig. 26B) y CTV33- $\Delta$ 13-BGFP-BYbJunN-GbFosC-82 (Fig. 28B). CTV33-BGFP-BYGUS-GTMVCP-79 expresa los tres ORF de GFP (inserción entre CPm y CP), GUS (inserción entre p13 y p20) y la proteína de cubierta de TMV (inserción entre p23 y 3'UTR) bajo el CP-CE de BYV, BYSV y GLRaV-2, respectivamente. CTV33- $\Delta$ 13-BGFP-BYbJunN-GbFosC-82 expresa los ORF de GFP (inserción entre CPm y CP), ORF de bJunN (sustitución de p13) y bFosC (inserción entre p23 y 3'UTR) bajo el CP-CE de BYV, BYSV y GLRaV-2, respectivamente. Los dos vectores se infiltraron en hojas de *N. benthamiana* en combinación con supresores de silenciamiento y se inocularon en cítricos usando el procedimiento de Gowda et al., 2005. Según se cortaron las hojas y se molieron para aislar viriones en un gradiente en colchón de sacarosa al 70% solo 5 días después de la infiltración en las hojas de *N. benthamiana* no era probable que estas plantas se infecten sistémicamente, por tanto, se desecharon. La fluorescencia de las hojas infiltradas bajo UV de mano indicó la expresión de la proteína GFP tanto en CTV33-BGFP-BYGUS-GTMVCP-79 como CTV33- $\Delta$ 13-BGFP-BYbJunN-GbFosC-82 indicando la capacidad del vector creado para replicarse en las hojas de *N. benthamiana*. Rejillas de microscopía electrónica preparadas de baños de hojas de *N. benthamiana* infiltradas para la construcción CTV33-BGFP-BYGUS-GTMVCP-79 y CTV33- $\Delta$ 13-BGFP-BYbJunN-GbFosC-82 indicaron que la formación de viriones es un prerrequisito para la inoculación mecánica con éxito de plántulas de cítricos con CTV. Además, en el caso de CTV33-BGFP-BYGUS-GTMVCP-79 y no en el de CTV33- $\Delta$ 13-BGFP-BYbJunN-GbFosC-82 hubo la formación de estructuras en forma de varilla denominadas pseudoviriones de TMV una característica de la expresión de la proteína de cubierta de TMV.

**Vectores construidos para expresar tres genes de tres localizaciones diferentes en CTV9R**

Se construyeron cuatro vectores para expresar tres genes exógenos de las mismas tres localizaciones diferentes en el genoma de CTV. Las tres localizaciones seleccionadas fueron inserción entre CPm y CP, p13 y p20 y p23 y 3'UTR. Para facilidad de clonación en el clon infeccioso de CTV de longitud completa el sitio PstI en el ORF de p33 se eliminó introduciendo una mutación puntual silenciosa por PCR de extensión solapada. Tres de los cuatro vectores se crearon usando diferentes combinaciones de los dos AMP, ASL y PTA produciendo los vectores de expresión CTV-BASL-BYPTA-CP7-119 (Fig. 23B), CTV-BASL-BYP10-CP7-131 (Fig. 25B) y CTV-BASL-BYPTA-CP10-120 (Fig. 24B). El cuarto vector llamado CTV-BRFP-BYGFP-CTMVCP-117 (Fig. 22B) se creó insertando los ORF de GFP, RFP y CP de TMV bajo el control de BYV, BYSV y CP-CE duplicado de CTV. Todos los vectores se infiltraron en *N. benthamiana* para seguir el desarrollo de infección sistémica. CTV-BASL-BYPTA-CP7-119 desarrolló infección sistémica eficaz en 1 planta de *N. benthamiana*. Las plantas infiltradas con el vector CTV-BRFP-BYGFP-CTMVCP-117 revelaron fluorescencia en hojas sistémicas bajo UV de mano. Tras el desarrollo de infección sistémica pronunciada, viriones de CTV-BRFP-BYGFP-CTMVCP-117 se concentrarán sobre un gradiente escalonado de sacarosa y un colchón de sacarosa para inocular plantas de cítricos similar al procedimiento recientemente seguido para el vector CTV-BASL-BYPTA-CP7-119.

20

### ***Expresión de tres genes exógenos de dos localizaciones diferentes simultáneamente***

Se crearon dos vectores para la expresión simultánea de tres genes de dos localizaciones diferentes en el genoma de CTV. Un vector se construyó en CTV9R $\Delta$ p33 creando el vector de expresión CTV33-BGFP-GbFosC-BYbJunN-81 (Fig. 27B) mientras que el otro vector se construyó en CTV9R de longitud completa llamado CTV $\Delta$ 13-GbFosC-BYbJunN-CTMVCP-129.

### ***Vector construido para expresar tres genes de dos localizaciones diferentes en CTV9R $\Delta$ p33***

CTV33-BGFP-GbFosC-BYbJunN-81 (Fig. 27B) se creó mediante modificación de CTV9R $\Delta$ p33 insertando un casete génico individual entre CPm y CP (ORF de GFP bajo el control de CP-CE de BYV) y un casete génico doble (ORF de bFosC seguido por ORF de bJunN bajo el control de CP-CE de GLRaV-2 y BYSV, respectivamente) como una inserción entre p23 y 3'UTR. Una mezcla 1:1 de 4 supresores de silenciamiento diferentes y CTV33-

BGFP-GbFosC-BYbJunN-81 se infiltraron en hojas de *N. benthamiana*. La microscopía electrónica de rejillas de baños de hoja reveló la formación de viriones similares a las construcciones CTV33-BGFP-BYGUS-GTMVCP-79 y CTV33- $\Delta$ 13-BGFP-BYbJunN-GbFosC-82. Además, las hojas infiltradas revelaron fluorescencia fuerte bajo UV de mano.

5 Las hojas infiltradas se usaron para concentrar viriones en un colchón de sacarosa al 70% en un intento de infectar plántulas de cítricos.

***Vector construido para expresar tres genes de dos localizaciones diferentes en CTV9R***

10

CTV9R se modificó insertando un casete génico doble (ORF de bFosC seguido por ORF de bJunN bajo el control de CP-CE de BYSV y GLRaV-2, respectivamente) como sustitución de p13 y un casete génico (ORF de CP de TMV bajo el control del CP-CE duplicado) como una inserción entre p23 y 3'UTR creando el vector de expresión CTV $\Delta$ 13-GbFosC-BYbJunN-CTMVCP-129 (Fig. 21B). Este vector se infiltró recientemente en hojas de *N. benthamiana*. Después de la infección sistémica de *N. benthamiana* los viriones se concentrarán para permitir la inoculación de plantas de cítricos.

15

***Expresión de cuatro genes exógenos de tres localizaciones diferentes simultáneamente***

20

Para construir el vector de cuatro genes se usaron cuatro casetes génicos localizados en tres localizaciones diferentes en el genoma de CTV. Se introdujo el ORF de RFP en el vector CTV9R (FIG. 20A) entre CPm y CP bajo el control del CP-CE de BYV, los dos componentes de BiFC bFosC y bJunN bajo el control de GLRaV-2 y BYSV respectivamente se introdujeron como sustitución del gen p13 y el ORF de TMV bajo el control del CP-CE duplicado de CTV se introdujo detrás de p23. El vector de cuatro genes llamado CTV $\Delta$ 13-BRFP-GbFosC-BYbJunN-CTMVCP-118 (Fig. 20B) se infiltró en hojas de *N. benthamiana* para el desarrollo de infección sistémica. Tras la infección sistémica se llevará a cabo la concentración de viriones sobre un gradiente escalonado y colchón de sacarosa para la infección de árboles de cítricos.

25

30

**Discusión relacionada con los ejemplos 1-8**

35 En este trabajo, se divulgan construcciones de CTV que son extraordinariamente permisivas en permitir la inserción de secuencias exógenas en diferentes sitios en la porción 3' del

genoma. Se crearon y examinaron numerosas construcciones de vectores potenciales diferentes para expresar genes exógenos a través de ARN subgenómicos adicionales, ARNm dicistrónicos o procesamiento de proteasas de proteínas de fusión. Notablemente, la mayoría de estas construcciones funcionaron como vectores. Además, las construcciones de CTV divulgadas en el presente documento son capaces de producir simultáneamente grandes cantidades de múltiples proteínas o péptidos exógenos.

El fin último era desarrollar vectores de alta expresión y estables para el huésped natural de CTV, cítricos. Por tanto, los viriones se concentraron de plantas de *N. benthamiana* infectadas con 12 construcciones diferentes que se propagaron y expresaron niveles de moderados a altos de la(s) proteína(s) exógena(s) y se usaron para inocular cítricos. Plantas de *C. macrophylla* fueron positivas para infección entre 6-60 semanas después de la inoculación dependiendo de la longitud del inserto en el virus y la cantidad de viriones concentrados de las hojas de *N. benthamiana* que se usaron para la inoculación. La mayoría de las construcciones que infectaron cítricos produjeron niveles moderados del/los gen/es indicador/es.

Se examinaron varios enfoques para la expresión de genes exógenos de CTV. El primer enfoque fue la estrategia de “añadir un gen” que implicaba la adición o duplicación de un elemento controlador y un ORF adicional, que produjo un ARN subgenómico adicional. El enfoque de “añadir un gen” se desarrolló inicialmente en TMV mediante la duplicación del promotor subgenómico de CP que controla un gen exógeno (Dawson et al., 1989; Donson et al., 1991; Shivprasad et al., 1999). Una ventaja de esta estrategia es que expresa la proteína exacta sin aminoácidos añadidos adicionales en el extremo N-terminal y/o C-terminal que podría afectar su actividad biológica, a niveles relativamente altos. Sin embargo, hay limitaciones de esta estrategia que se deben considerar. La duplicación del elemento controlador puede producir recombinación homóloga que produce la pérdida del gen de interés (Chapman et al., 1992; Dawson et al., 1989). Aunque esto hizo el inserto de TMV inestable, parece tener poco efecto en la estabilidad en CTV (Folimonov et al., 2007). El uso de un elemento controlador heterólogo de virus relacionados estabilizaba las inserciones de TMV. Sin embargo, los elementos controladores heterólogos habitualmente son diferencialmente reconocidos por el complejo de replicasa del virus (Folimonov et al., 2007; Shivprasad et al., 1999). Esta observación se puede utilizar para regular los niveles de expresión génica deseada (Shivprasad et al., 1999). Una consideración importante es que puede haber competición entre los diferentes ARN subgenómicos de un virus. Con TMV, el gen extra competía con el gen de la proteína de cubierta y el gen de movimiento. Parecía

haber una máxima capacidad para la producción de ARN subgenómicos que se dividía entre los tres ARN. Las manipulaciones que producían aumentos en uno producían disminuciones en los otros. Una solución era reducir la producción de la proteína de cubierta para permitir la expresión óptima del gen exógeno y del gen de movimiento (Shivprasad et al., 1999; Girdishivelli et al., 2000). Con todo, los ARNm subgenómicos de CTV parecían ser mucho menos competitivos (Folimonov et al., 2007; Ayllón et al., 2003).

En trabajos previos, se creó un vector de CTV que expresaba un gen extra entre los genes de CP y CPm que era un vector eficaz y estable en árboles de cítricos. El gen exógeno estaba en la posición 6 desde el extremo 3' (Folimonov et al., 2007). La posición del gen extra se eligió arbitrariamente. Aquí los inventores siguieron el diseño del vector en un intento de definir los límites de manipulación del genoma de CTV en producir proteínas o péptidos extra. El virus expresa sus diez genes 3' a través de ARNm sg (Hilf et al., 1995). Una regla de la expresión génica en CTV es que los genes más próximos al extremo 3' se transcriben más que los genes internos. Por ejemplo, la transcripción del gen p33, que está en la posición 10 desde el extremo 3', es muy baja en su posición nativa, pero la transcripción se volvió muy alta cuando el gen p33 se movió cerca del extremo 3' (Satyanarayana et al., 1999). Por tanto, la expresión de genes exógenos de posiciones más cercanas al extremo 3' podría producir niveles más altos que de la posición 6 arbitrariamente elegida en el primer vector (Folimonov et al., 2007). Con todo, basado en resultados de otros virus, solo ciertas posiciones en el genoma vírico es probable que toleren inserciones de genes extra. Por ejemplo, con TMV o el virus del mosaico de la alfalfa la localización entre CP y 3'NTR no acomodaba un inserto (Dawson et al., 1989; Lehto y Dawson, 1990; Sanchez-Navarro et al., 2001). Notablemente, casi todas las construcciones con inserciones en CTV en la delección p13, entre p13 y p20, y entre p23 y 3'NTR eran viables. En contraste, se encontró que la única posición que el virus no toleraba era entre los genes p20 y p23. Es posible que estas inserciones interfirieran con la transcripción de cualquiera de los genes adyacentes.

Otra estrategia para expresar genes exógenos en un vector vírico consiste en fusión en el mismo marco de lectura de un ORF de interés a un ORF vírico en el extremo N-terminal o C-terminal. Las dos proteínas se pueden liberar introduciendo una proteasa y sitios de procesamiento entre las dos proteínas (Dolja et al., 1997; Gopinath et al., 2000). Se adaptó primero en el potviridae, virus del grabado del tabaco (Dolja et al., 1992). La principal ventaja de la estrategia de fusión de poliproteínas es que la proteína exógena se expresa en una proporción 1:1 con la proteína vírica. Una limitación principal es que este proceso añade

aminoácidos extra en el extremo N-terminal y/o C-terminal de ambas proteínas, que puede afectar sus actividades biológicas.

5 Se crearon una serie de construcciones que utilizan las proteasas HC-Pro o NIa de potyvirus para permitir procesamiento postraduccional de la poliproteína manipulada para liberar GFP libre, proteasa, y la proteína p23. Estos vectores fueron capaces de infectar sistémicamente *N. benthamiana*. El movimiento sistémico de estas construcciones era más lento que las construcciones de vectores de expresión que contenían solo el ORF de GFP como un gen extra. El movimiento sistémico más lento y los menores niveles de expresión de GFP en 10 hojas sistémicas se podrían atribuir parcialmente a los aminoácidos C-terminales extra de p23 que reducían su actividad en supresión o amplificación de silenciamiento de ARN de ARN víricos o que el procesamiento de la proteasa retrasaba esta actividad. Aunque estas construcciones no produjeron los niveles máximos de proteína exógena, fueron vectores viables que expresaban cantidades sustanciales de GFP.

15

Tras identificar las localizaciones en el genoma de CTV que podrían acomodar insertos de genes exógenos, se diseñaron estrategias para construir vectores víricos que expresan múltiples genes. La primera estrategia dependía del uso de un único elemento controlador que dirigía la transcripción de un gen de polipéptido. El gen de fusión que consistía en 20 GFP/Pro/GUS, variaba en tamaño de 3127 nts a 3480 nts. Otras estrategias utilizaban dos CE extra para producir dos ARN sg extra simultáneamente. Esta estrategia dio la flexibilidad para insertar dos genes en tándem en la misma localización o en dos localizaciones diferentes. Ambas estrategias funcionaron.

25 La expresión de proteína heteróloga en planta entera habitualmente se logra por desarrollo de plantas transgénicas por inserción de ADN exógeno en el genoma de plastos o nuclear. La transformación de plastos ha tenido éxito para solo unos pocos cultivos anuales. El tiempo y éxito de la transformación nuclear varía entre diferentes cultivos. Ciertas plantas son más recalcitrantes a transformación y posterior regeneración que otras. Hay otras 30 desventajas, particularmente en cultivos perennes. Por ejemplo, el cítrico tiene una fase juvenil larga después de la regeneración que prolonga el tiempo necesario para evaluar las características hortícolas y retrasa el tiempo hasta el uso comercial. Otra desventaja principal es que la transformación está limitada a la siguiente generación de plantas.

35 Los inventores han desarrollado ahora una serie de diferentes vectores de CTV, cada uno con diferentes características que son más eficaces en condiciones específicas. Por



ejemplo, con los vectores de “añadir un gen”, los inventores aconsejarían la expresión de un gen pequeño en 3’ del gen p23 en CTV para expresión máxima. Un gen mediano se podría expresar más eficazmente desde dentro del área de p13. Un gen grande probablemente se acomodaría mejor como una inserción entre CP y CPM donde interrumpiría menos los ARN subgenómicos víricos y produciría mejor invasión sistémica de la planta. Para la expresión de proteínas menores, péptidos o ARN que se dirigen al silenciamiento de ARN, es posible que el virus pudiera acomodar 3 o 4 genes diferentes. Se pueden elegir diferentes combinaciones de ARN sg extra y procesamiento de proteasas. Aunque se han producido dos proteínas exógenas de otros virus, CTV es único en utilidad debido a su estabilidad. El vector original ha estado produciendo continuamente GFP durante 8 años.

Los usos del vector de expresión basado en CTV han evolucionado desde su origen. Inicialmente se desarrolló como una herramienta de laboratorio para mejora de cítricos. El vector se diseñó para expresar potenciales genes para la transformación de cítricos. Los resultados del efecto del gen heterólogo en cítricos, particularmente si se esperaba el efecto en tejido o fruto maduro, se podrían obtener mediante el virus años antes de que los resultados llegaran de la transformación directa. Sin embargo, las condiciones y necesidades de la industria de cítricos han cambiado debido a la invasión de una nueva enfermedad bacteriana denominada Huanglongbing (HLB). Esta enfermedad se ha propagado tan rápidamente y es tan dañina que la supervivencia de la industria de cítricos está amenazada. Inicialmente, el vector CTV se usó para identificar péptidos antimicrobianos con actividad contra la bacteria de HLB para transformación en cítricos. Sin embargo, la enfermedad se está propagando tan rápidamente que las plantas transgénicas pueden no estar disponibles a tiempo para salvar la industria. Debido a la notable estabilidad, el vector de CTV se está considerando ahora para uso en el campo para proteger árboles de cítricos y para tratar árboles infectados hasta que estén disponibles plantas transgénicas resistentes. El vector de CTV como una herramienta en el campo para luchar una enfermedad invasora de cítricos es solo un ejemplo de lo que los vectores víricos pueden hacer por la agricultura. Las posibilidades son muchas para vectores muy estables como los de CTV y cultivos perennes, particularmente árboles. Muchos árboles son productivos durante 100 años o más. Durante la vida de los árboles las tecnologías cambian y las presiones de enfermedades y plagas cambian. Mejorar árboles por métodos de transformación tradicionales requiere eliminar todos los árboles presentes del campo y replantar. El uso de un vector vírico podría añadir nuevos genes a los árboles existentes.

35

### **Lista de referencias**

- Ahlquist, P., French, R., Janda, M., Loesch-Fries, L.S., 1984. Multi component RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8, 7066-7070.
- Akbergenov, R., Zhanybekova, S., Kryldakov, R.V., Zhigailov, A., Polimbetova, N.S., Hohn, T., Iskakov, B.K., 2004. ARC-1, a sequence element complementary to an internal 18S rRNA segment, enhances translation efficiency in plants when present in the leader or intercistronic region of mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 32, 239–247.
- Allison, R.F., Dougherty, W.G., Parks, T.D., Willis, L., Johnston, R.E., Kelly, M., Armstrong, F.B., 1985. Biochemical analysis of the capsid protein gene and capsid protein of tobacco etch virus: N-terminal amino acids are located on the virion's surface. *J. Virol.* 147, 309-316.
- Andrade, M., Sato, M., Uyeda, I., 2007. Two resistance modes to *Clover yellow vein virus* in pea characterized by a green fluorescent protein-tagged virus. *Phytopathology* 97, 544–550.
- Ayllón, M.A., Gowda, S., Satyanarayana, T., Karasev, A.V., Adkins, S., Mawassi, M., Guerri, J., Moreno, P., Dawson, W.O., 2003. Effects of modification of the transcription initiation site context on citrus tristeza virus subgenomic RNA synthesis. *J. Virol.* 77, 9232–9243.
- Balvay, L., Soto Rifo, R., Ricci, E. P., Decimo, D., Ohlmann, T., 2009. Structural and functional diversity of viral IREs. *Biochim. Biophys. Acta* 1789, 542–557.
- Baulcombe, D.C., Chapman, S., Santa Cruz, S., 1995. Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant J.* 7, 1045–1053.
- Beauchemin, C., Bougie, V., Laliberté, J. F., 2005. Simultaneous production of two foreign proteins from a potyvirus-based vector. *Virus Res.* 112, 1–8.
- Brisson, N., Paszkowski, J., Penswick, J.R., Gronenborn, B., Potrykus, I., Hohn, T., 1984. Expression of a bacterial gene in plants by using a viral vector. *Nature* 310, 511–514.
- Cañizares, C.M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., 2008. Multiple suppressors of RNA silencing encoded by both genomic RNAs of the crinivirus, *Tomato chlorosis virus*. *Virology* 379, 168-174.
- Canizares, M.C., Nicholson, L., Lomonossoff, G.P., 2005 Use of viral vectors for vaccine production in plants. *Immunol. Cell Biol.* 83, 263–270.
- Canto, T., Prior, D. A. M., Hellwald, K.-H., Oparka, K. J., Palukaitis, P., 1997. Characterization of cucumber mosaic virus IV. Movement protein and coat protein are both essential for cell-to-cell movement of cucumber mosaic virus. *Virology* 237, 237-248.
- Carrasco, P., Daros, J.A., Agudelo-Romero, P., Elena, S.F., 2007. A real-time RT-PCR assay for quantifying the fitness of tobacco etch virus in competition experiments. *J. Virol. Methods* 139, 181-188.
- Carrington, J.C., Cary, S.M., Parks, T.D. y Dougherty, W.G., 1989. A second proteinase encoded by a plant potyviral genome. *EMBO J.* 8, 365–370.

- Carrington, J.C., Dougherty, W.G., 1988. A viral cleavage site cassette: Identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3391-3395.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C., 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802–805.
- Chapman, S., Kavanagh, T., Baulcombe, D., 1992. Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant J.* 2, 549–557.
- Chiba, M., Reed, J.C., Prokhnovsky, A.I., Chapman, E.J., Mawassi, M., Koonin, E.V., Carrington, J.C., Dolja, V.V., 2006. Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replicon. *Virology* 346, 7–14.
- Crameri, A., Whitehorn, E.A., Tate, E., Stemmer, W.P., 1996. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat. BioTechniques* 14, 315–319.
- Dawson, W. O., Bubrick, P., Grantham, G. L. 1988. Modifications of the tobacco mosaic virus coat protein gene affect replication, movement, and symptomatology. *Phytopathology* 78, 783-789.
- Dawson, W.O., Lewandowski, D.J., Hilf, M.E., Bubrick, P., Raffo, A.J., Shaw, J.J., Grantham, G.L., Desjardins, P.R., 1989. A tobacco mosaic virus-hybrid expresses and loses an added gene. *Virology* 172, 285-292.
- Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., Voinnet, O., 2006. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313, 68–71.
- Dietrich, C., Maiss, E., 2003. Fluorescent labeling reveals spatial separation of potyvirus populations in mixed infected *Nicotiana benthamiana* plants. *J. Gen. Virol.* 84, 2871–2876.
- Dolja, V.V., Hong, J., Keller, K.E., Martin, R.R., Peremyslov, V.V., 1997. Suppression of potyvirus infection by co-expressed closterovirus protein. *Virology* 234, 243–252.
- Dolja, V.V., McBride, H.J., Carrington, J.C., 1992. Tagging of plant potyvirus replication and movement by insertion of beta-glucuronidase into the viral polyprotein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89, 10208–10212.
- Donson, J., Kearney, C.M., Hilf, M.E., Dawson, W.O. 1991. Systemic expression of a bacterial gene by a tobacco mosaic virus-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 7204-7208.
- Dorokhov, Y.L., Skulachev, M.V., Ivanov, P.A., Zvereva, S.D., Tjulkina, L.G., Merits, A., Gleba, Y.Y., Hohn, T., Atabekov, J.G., 2002. Polypurine (A)-rich sequences promote cross-kingdom conservation of internal ribosome entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 5301-5306.
- Edelstein, M. L., Abedi, M. R. Wixon, J., 2007. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007—an update. *J. Gene Med.* 9, 833–842.

- Fernandez-Miragall, O., Lopez de Quinto, S., Martinez-Salas, E., 2009. Relevance of RNA structure for the activity of picornavirus IRES elements. *Virus Res.* 139, 172–182.
- Fitzgerald, K.D., Semler, B.L., 2009. Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* 1789, 518–528.
- 5 Folimonov, A.S., Folimonova, S.Y., Bar-Joseph, M., Dawson, W.O., 2007. A stable RNA virus-based vector for citrus trees. *Virology* 368, 205–216.
- Folimonova, S.Y., Folimonov, A.S., Tatineni, S., Dawson, W.O., 2008. *Citrus tristeza virus*: survival at the edge of the movement continuum. *J. Virol.* 82, 6546–6556.
- Folimonova, S.Y., Robertson, C.J., Shilts, T., Folimonov, A.S., Hilf, M.E., Garnsey, S.M.
- 10 Dawson, W.O., 2010. Infection with strains of *Citrus tristeza virus* does not exclude super infection by other strains of the virus. *J. Virol.* 84, 1314–1325.
- French, R., Janda, M., Ahlquist, P., 1986. Bacterial gene inserted in an engineered RNA virus: efficient expression in monocotyledonous plant cells. *Science* 231, 1294–97
- Fütterer, J., Bonneville, J.M., Hohn, T., 1990. Cauliflower mosaic virus as a gene expression
- 15 vector for plants. *Physiol. Plant.* 79, 154-157.
- Gallie, D.R., 2001. Cap-independent translation conferred by the 5' leader of tobacco etch virus is eukaryotic initiation factor 4G dependent. *J. Virol.* 75, 12141–12152.
- Gallie, D.R., Tanguay, R.L., Leathers, V., 1995. The tobacco etch viral 5' leader and poly(A) tail are functionally synergistic regulators of translation. *Gene* 165, 233–238.
- 20 Garnsey, S. M., Gonsalves, D., Purcifull, D. E., 1977. Mechanical transmission of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 67, 965-968.
- Garnsey, S.M., Cambra, M., 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for citrus pathogens. En: Roistacher, C.N. (Ed.), *Graft-Transmissible Diseases of Citrus, Handbook for Detection and Diagnosis*. FAO, Roma, pp. 193–216.
- 25 Garnsey, S.M., Henderson C.T., 1982. Extraction, centrifugation, and assay techniques for purification of intact citrus tristeza virus. *Workshop on Plant Virus Detection, Agric. Exp. Stn., University of Puerto Rico, Rio Piedras, 29Marzo-2 Abril, 1982*, 106-112.
- Giritch, A., Marillonnet, S., Engler, C., van Eldik, G., Botterman, J., Klimyuk, V., Gleba, Y., 2006. Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with
- 30 noncompeting viral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 14701–14706.
- Gleba, Y., Klimyuk, V., Marillonnet, S., 2007. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 134–141.
- Gopinath, K., Wellink, J., Porta, C., Taylor, K.M., Lomonossoff, G.P., van Kammen, A., 2000. Engineering cowpea mosaic virus RNA-2 into a vector to express heterologous proteins in
- 35 plants. *Virology* 267, 159–173.

- Gowda, S., Satyanarayana, T., Ayllon, M.A., Albiach-Marti, M.R., Mawassi, M., Rabindran, S., Garnsey, S.M., Dawson, W.O., 2001. Characterization of the cis-acting elements controlling subgenomic mRNAs of citrus tristeza virus: production of positive- and negative-stranded 3'-terminal and positive-stranded 5'-terminal RNAs. *Virology* 286 1, 134–151.
- 5 Gowda, S., Satyanarayana, T., Davis, C. L., Navas-Castillo, J., Albiach-Marti, M. R., Mawassi, M., Valkov, N., Bar-Joseph, M., Moreno, P., Dawson, W. O., 2000. The p20 gene product of Citrus tristeza virus accumulates in the amorphous inclusion bodies. *Virology* 274, 246-254.
- Gowda, S., Satyanarayana, T., Robertson, C.J., Garnsey, S.M., Dawson, W.O., 2005.
- 10 Infection of citrus plants with virions generated in *Nicotiana benthamiana* plants agroinfiltrated with a binary vector based *Citrus tristeza virus*, p. 23-33. *En M. E. Hilf, N. Duran-Vila, y M. A. Rocha-Peña (eds.), Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. IOCV, Riverside, CA, 728 EE UU.*
- Grdzlishvili, V.Z., Chapman, S.N., Dawson, W.O., Lewandowski, D.J., 2000. Mapping of the
- 15 Tobacco mosaic virus movement protein and coat protein subgenomic RNA promoters in vivo. *Virology* 275, 177–192.
- Gronenborn, B., Gardner, R.C., Schaefer, S., Shepherd, R.J., 1981. Propagation of foreign DNA in plants using cauliflower mosaic virus as vector. *Nature* 294, 773–76.
- Hagiwara, Y., Peremyslov, V.V., Dolja, V.V., 1999. Regulation of closterovirus gene
- 20 expression examined by insertion of a self-processing reporter and by northern hybridization. *J. Virol.* 73, 7988–7993.
- Hilf, M. E., Karasev, A. V., Pappu, H. R., Gumpf, D. J., Niblett, C. L., Garnsey, S. M., 1995. Characterization of citrus tristeza virus subgenomic RNAs in infected tissue. *Virology* 208, 576-582.
- 25 Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.R., Pease, L.B., 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 77, 61-68.
- Hu, C.D., Chinenov, Y., Kerppola, T.K., 2002. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular*
- 30 *Cell* 9, 789-798.
- Ion-Nagy, L., Lansac, M., Eyquard, J.P., Salvador, B., Garcia, J.A., Le Gall, O., Hernould, M., Schurdi-Levraud, V., Decroocq, V., 2006. PPV long-distance movement is occasionally permitted in resistant apricot hosts. *Virus Res.* 120, 70–78.
- Ivanov, P.A., Karpova, O.V., Skulachev, M.V., Tomashevskaya, O.L., Rodionova, N.P.,
- 35 Dorokhov, Y. L., Atabekov, J.G., 1997. A tobamovirus genome that contains an internal ribosome entry site functional in vitro. *Virology* 232, 32–43.

- Karasev, A.V., 2000. Genetic diversity and evolution of closteroviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38, 293–324.
- Karasev, A.V., Boyko, V.P., Gowda, S., Nikolaeva, O.V., Hilf, M.E., Koonin, E.V., Niblett, C.L., Cline, K., Gumpf, D.J., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Lewandowski, D.J., Dawson, W.O.,  
5 1995. Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. *Virology* 208, 511–520.
- Karasev, A.V., Nikolaeva, O.V., Mushegian, A.R., Lee, R.F., Dawson, W.O., 1996. Organization of the 3'-terminal half of beet yellow stunt virus genome and implications for the evolution of closteroviruses. *J. Virol.* 221, 199-207.
- Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J., Krizan, K.A., and Carrington, J.C.,  
10 2003. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev. Cell* 4, 205–217.
- Kawakami, S., Watanabe, Y., Beachy, R. N., 2004. Tobacco mosaic virus infection spreads cell to cell as intact replication complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 6291–6296.
- Kelloniemi, J., Mäkinen, K., Valkonen, J.P.T., 2008. Three heterologous proteins  
15 simultaneously expressed from a chimeric potyvirus: infectivity, stability and the correlation of genome and virion lengths. *Virus Res.* 135, 282-291.
- Kneller, E.L., Rakotondrafara, A.M., Miller, W.A., 2006. Cap independent translation of plant viral RNAs. *Virus Res.* 119, 63–75.
- Koh, D.C., Wong, S.M., Liu, D.X., 2003. Synergism of the 3'-untranslated region and an  
20 internal ribosome entry site differentially enhances the translation of a plant virus coat protein. *J. Biol. Chem.* 278, 20565–20573.
- Lehto, K., y Dawson, W.O., 1990. Replication, stability, and gene expression of tobacco mosaic virus mutants with a second 30K ORF. *Virology* 175, 30-40.
- Lewandowski, D. J. y Dawson, W. O., 1998. Deletion of internal sequences results in  
25 Tobacco mosaic virus defective RNAs that accumulate to high levels without interfering with replication of the helper virus. *Virology* 251, 427-437.
- Lico, C., Chen, Q., Santi, L., 2008. Viral vectors for production of recombinant proteins in plants. *J. Cell Physiol.* 216, 366–377.
- Liu, Y.P., Peremyslov, V.V., Medina, V., Dolja, V.V. 2009. Tandem leader proteases of  
30 Grapevine leafroll-associated virus 2: host-specific functions in the infection cycle. *Virology* 383, 291-299.
- López, C., Navas-Castillo, J., Gowda, S., Moreno, P., Flores R., 2000. The 23-kDa protein coded by the 3'-terminal gene of citrus tristeza virus is an RNA-binding protein. *Virology* 269, 462–470.

- Lu, R., Folimonov, A., Shintaku, M., Li, W. X., Falk, B. W., Dawson, W. O., Ding, S. W., 2004. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 15742–15747.
- Lucy, A. P., Guo, H. S., Li, W. X., Ding, S. W., 2000. Suppression of post-transcriptional  
5 gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J.* 19, 1672-1680.
- Marton, I., Zuker, A., Shklarman, E., Zeevi, V., Tovkach, A., Roffe, S., Ovadis, M., Tzfira, T., Vainstein, A., 2010. Nontransgenic genome modification in plant cells. *Plant Physiol.* 154, 1079-1087.
- Masoumi, A., Hanzlik, T. N., Christian, P. D., 2003. Functionality of the 59- and intergenic  
10 IRES elements of cricket paralysis virus in a range of insect cell lines, and its relationship with viral activities. *Virus Res.* 94, 113–120.
- Masuta, C., Yamana, T., Tacahashi, Y., Uyeda, I., Sato, M., Ueda, S., Matsumura, T., 2000. Development of clover yellow vein virus as an efficient, stable gene-expression system for legume species. *Plant J.* 23,539–546.
- 15 Navas-Castillo, J., Albiach-Martó, M. R., Gowda, S., Hilf, M. E., Garnsey, S. M., Dawson, W. O., 1997. Kinetics of accumulation of citrus tristeza virus RNAs. *Virology* 228, 92-97.
- Niepel, M., Gallie, D.R., 1999. Identification and characterization of the functional elements within the tobacco etch virus 5' leader required for cap-independent translation. *J. Virol.* 73, 9080–9088.
- 20 Padgett, H.S., Epel, B.L., Heinlein, M.H., Watanabe, Y., Beachy, R.N. 1996. Distribution of tobamovirus movement protein in infected cells and implications for cell-to-cell spread of infection. *Plant J.* 10, 1079–1099.
- Pappu, H.R., Karasev, A.V., Anderson, E.J., Pappu, S.S., Hilf, M.E., Febres, V.J., Eckloff, R.M.G., McCaffery, M., Boyko, V., Gowda, S., Dolia, V.V., Koonin, E.V., Gumpf, D.J., Cline,  
25 K.C., Garnsey, S.M., Dawson, W.O., Lee, R.F., Niblett, C.L., 1994. Nucleotide sequence and organization of eight 3' open reading frames of the Citrus tristeza closterovirus genome. *Virology* 199, 35–46.
- Peremyslov, V.V., Hagiwara, Y., Dolja, V.V., 1999. HSP70 homolog functions in cell-to-cell movement of a plant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 14771-14776.
- 30 Prokhnevsky, A. I., V. V. Peremyslov, V.V., Napuli, A. J., Dolja, V. V., 2002. Interaction between long-distance transport factor and Hsp70-related movement protein of beet yellows virus. *J. Virol.* 76, 11003–11011.
- Ratcliff, F., MacFarlane, S., Baulcombe, D.C., 1999. Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross protection between viruses. *Plant Cell*, 11, 1207-1215.

- Roberts, A.G., Santa Cruz, S., Roberts, I.M., Prior, D.A.M., Turgeon, R., Oparka, K.J., 1997. Phloem unloading in sink leaves of *Nicotiana benthamiana*: comparison of a fluorescent solute with a fluorescent virus. *Plant Cell* 9, 1381–1396.
- Roberts, L.O., Groppelli, E., 2009. An atypical IRES within the 50 UTR of a dicistrovirus genome. *Virus Res.* 139, 157–165.
- 5 Robertson, C.J., Garnsey, S.M., Satyanarayana, T., Folimonova, S., Dawson, W.O., 2005. Efficient infection of citrus plants with different cloned constructs of *Citrus tristeza virus* amplified in *Nicotiana benthamiana* protoplasts. Proc. 16th Conf. IOCV. IOCV, Riverside, CA, pp. 187–195.
- 10 Roy, G., Weisburg, S., Rabindran, S., Yusibov, V., 2010. A novel two-component Tobacco mosaic virus-based vector system for high-level expression of multiple therapeutic proteins including a human monoclonal antibody in plants. *Virology* 405, 93-99.
- Sánchez-Navarro, J. A., Miglino, R., Ragozzino, A., and Bol, J. F., 2001. Engineering of *Alfalfa mosaic virus* RNA 3 into an expression vector. *Arch. Virol.* 146, 923-939.
- 15 Sato, M., Masuta, C., Uyeda, I., 2003. Natural resistance to *Clover yellow vein virus* in beans controlled by a single recessive locus. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16, 994–1002.
- Satyanarayana, T., Bar-Joseph, M., Mawassi, M., Albiach-Martí, M.R., Ayllón, M.A., Gowda, S., Hilf, M.E., Moreno, P., Garnsey, S.M., Dawson, W.O., 2001. Amplification of *Citrus tristeza virus* from a cDNA clone and infection of citrus trees. *Virology* 280, 87–96.
- 20 Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllón, M.A., Albiach-Martí, M.R., Dawson, W.O., 2002a. Mutational analysis of the replication signals in the 3'-non translated region of *Citrus tristeza virus*. *Virology* 300, 140–152.
- Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllón, M.A., Albiach-Martí, M.R., Rabindram, R., Dawson, W.O. 2002b. The p23 protein of *Citrus tristeza virus* controls asymmetrical RNA accumulation. *J. Virol.* 76, 473–483.
- 25 Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllón, M.A., Dawson, W.O., 2003. Frame shift mutations in infectious cDNA clones of *Citrus tristeza virus*: a strategy to minimize the toxicity of viral sequences to *Escherichia coli*. *Virology* 313, 481–491.
- Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllón, M.A., Dawson, W.O., 2004. Closterovirus bipolar virion: evidence for initiation of assembly by minor coat protein and its restriction to the genomic RNA 5' region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 799–804.
- 30 Satyanarayana, T., Gowda, S., Boyko, V. P., Albiach-Marti, M. R., Mawassi, M., Navas-Castillo, J., Karasev, A. V., Dolja, V., Hilf, M. E., Lewandowski, D. J., Moreno, P., Bar-Joseph, M., Garnsey, S. M., Dawson, W. O., 1999. An engineered closterovirus RNA replicon and analysis of heterologous terminal sequences for replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 7433-7438.
- 35



- Satyanarayana, T., Gowda, S., Mawassi, M., Albiach-Marti, M. R., Ayllón, M. A., Robertson, C., Garnsey, S. M., Dawson, W. O., 2000. Closterovirus encoded HSP70 homolog and p61 in addition to both coat proteins function in efficient virion assembly. *Virology* 278, 253-265.
- Shivprasad, S., Pogue, G.P., Lewandowski, D.J., Hidalgo, J., Donson, J., Grill, L.K., Dawson, W.O., 1999. Heterologous sequences greatly affect foreign gene expression in tobacco mosaic virus-based vectors. *Virology* 255, 312–323.
- Siegel, A., 1983. RNA viruses as cloning vehicles. *Phytopathology* 73,775.
- Siegel, A., 1985. Plant-virus-based vectors for gene transfer may be of considerable use despite a presumed high error frequency during RNA synthesis. *Plant Mol. Biol.* 4, 327–29.
- 10 Takahashi, T., Sugawara, T., Yamatsuta, T., Isogai, M., Natsuaki, T., Yoshikawa, N., 2007. Analysis of the spatial distribution of identical and two distinct virus populations differently labeled with cyan and yellow fluorescent proteins in coinfecting plants. *Phytopathology* 97, 1200–1206
- Takamatsu, N., Ishikawa, M., Meshi, T., Okada, Y., 1987. Expression of bacterial chloramphenicol acetyl transferase gene in tobacco plants mediated by TMV-RNA . *EMBO J.* 6, 307-311.
- 15 Tatineni, S., Gowda, S., Dawson W.O., 2010. Heterologous minor coat proteins of *Citrus tristeza virus* strains affect encapsidation, but the coexpression of HSP70h and p61 restores encapsidation to wild-type levels. *Virology* 402, 262-270.
- 20 Tatineni, S., McMechan A.J., Hein G.L., French R., 2011. Efficient and stable expression of GFP through Wheat streak mosaic virus-based vectors in cereal hosts using a range of cleavage sites: Formation of dense fluorescent aggregates for sensitive virus tracking. *Virology* 410, 268-281.
- Tatineni, S., Robertson, C. J., Garnsey, S. M., Bar-Joseph, M., Gowda, S., Dawson, W. O., 25 2008. Three genes of *Citrus tristeza virus* are dispensable for infection and movement throughout some varieties of citrus trees. *Virology* 376, 297–307.
- Toth, R.L., Chapman, S., Carr, F., Santa Cruz, S., 2001. A novel strategy for the expression of foreign genes from plant virus vectors. *FEBS Lett.* 489, 215-219.
- Turpen, T.H., Turpen, A.M., Weinzettl, N., Kumagai, M.H., Dawson, W.O., 1993. Transfection 30 of whole plants from wounds inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* containing cDNA of tobacco mosaic virus. *J. Virol. Meth.* 42, 227-239.
- Van Vloten-Doting, L., 1983. Advantages of multiple partite genomes of single-stranded RNA plant viruses in nature, for research and genetic engineering. *Plant Mol. Biol.* 1, 55-60.
- Van Vloten-Doting, L., Bol, J.F., Cornelissen, B., 1985. Plant virus-based vectors for gene 35 transfer will be of limited use because of the high error frequency during viral RNA synthesis. *Plant Mol. Biol.* 4, 323–326.

Verch, T., Yusibov, V., Koprowski, H., 1998. Expression and assembly of a full-length monoclonal antibody in plants using a plant virus vector. *J. Immunol. Methods* 220, 69–75.

Verver, J., Wellink, J., Van Lent, J., Gopinath, K., y Van Kammen, A., 1998. Studies on the movement of cowpea mosaic virus using the jellyfish green fluorescent protein. *Virology* 242, 22–27.

Woolaway, K.E., Lazaridis, K., Belsham, G.J., Carter, M.J., Robert, L.O., 2001. The 5' untranslated region of rhopalosiphum padi virus contains an internal ribosome entry site which functions efficiently in mammalian, plant, and insect translation system. *J. Virol.* 75, 10244–10249.

10

Mientras que varias formas de realización divulgadas se han descrito anteriormente, se debe entender que se han presentado a modo de ejemplo solo, y no limitación. Se pueden hacer numerosos cambios al objeto divulgado en el presente documento según esta divulgación sin separarse del espíritu o ámbito de esta divulgación. Además, mientras se puede haber divulgado una característica particular con respecto a solo una de varias implementaciones, tal característica se puede combinar con otras características de las otras implementaciones según se desee y sea ventajoso para cualquier aplicación determinada o particular.

15

Por tanto, la amplitud y ámbito del objeto proporcionado en esta divulgación no debe estar limitado por ninguna de las formas de realización explícitamente descritas anteriormente. Más bien, el ámbito de esta divulgación se debe definir según las siguientes reivindicaciones y sus equivalentes.

20

La terminología usada en el presente documento es para los fines de describir formas de realización particulares solo y no se pretende que sea limitante. Como se usa en el presente documento, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” se pretende que incluyan formas plurales también, a menos que el contexto claramente indique otra cosa. Además, al nivel que los términos “incluir”, “incluye”, “tener”, “tiene”, “con” o variantes de los mismos se usan en la descripción detallada y/o las reivindicaciones, tales términos se pretende que sean inclusivos de una manera similar al término “comprender”.

30

A menos que se defina de otra manera, todos los términos (incluyendo términos técnicos y científicos) usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la materia a la que las formas de realización pertenecen. Se entenderá además que términos, tales como los definidos en diccionarios comúnmente usados, se deben interpretar como que tienen un significado consistente con su significado

35

en el contexto de la técnica relevante y no se interpretarán en un sentido idealizado o demasiado formal a menos que expresamente se defina así en el presente documento.

5 Las enseñanzas de cualquier patente, solicitud de patente, artículos técnicos o científicos u otras referencias se incorporan al presente documento en su totalidad al nivel no inconsistente con las enseñanzas en el presente documento.

El presente documento divulga además lo siguiente:

- 10 **1.** Un vector vírico del CTV modificado para comprender al menos un casete génico que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido heterólogo, el vector vírico del CTV modificado de modo que el casete génico esté posicionado en las regiones del genoma del CTV p13-p20, p20-p23 o p23-3'NTR.
- 15 **2.** El vector vírico del CTV del aspecto inventivo 1, en el que dicho al menos un casete génico está posicionado en la región del genoma del CTV p13-p20.
- 3.** El vector vírico del CTV del aspecto inventivo 1, en el que dicho al menos un casete génico está posicionado en la región del genoma del CTV p20-p23.
- 20 **4.** El vector vírico del CTV del aspecto inventivo 1, en el que dicho al menos un casete génico está posicionado en la región del genoma del CTV p23-3'NTR.
- 5.** El vector vírico del CTV del aspecto inventivo 1, en el que el al menos un casete génico  
25 comprende además un elemento controlador de ARNm subgenómico posicionado en dirección 5' de dicho polinucleótido que codifica un polipéptido heterólogo.
- 6.** Una planta que comprende al menos una célula transfectada con el vector vírico del CTV del aspecto inventivo 1.
- 30 **7.** La planta del aspecto inventivo 6, en la que dicha planta es un árbol.
- 8.** La planta del aspecto inventivo 6, en la que dicha planta es un árbol cítrico.
- 35 **9.** Un procedimiento de infección de un árbol para expresar un polipéptido heterólogo, comprendiendo dicho procedimiento transfectar al menos una célula de dicho árbol con un

vector vírico del CTV modificado para comprender al menos un casete génico que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido heterólogo, el vector vírico del CTV modificado de modo que el casete génico esté posicionado en las regiones del genoma del CTV p13-p20, p20-p23 o p23-3'NTR.

5

**10.** El procedimiento del aspecto inventivo 8, en el que dicho árbol es un árbol cítrico.

**11.** Un vector vírico del CTV modificado para comprender un casete génico que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido heterólogo, el vector vírico del CTV modificado de modo que el casete génico esté insertado en el lugar del gen p13 del CTV.

10

**12.** El vector vírico del CTV del aspecto inventivo 11, en el que el casete génico comprende además un elemento controlador de ARNm subgenómico posicionado en dirección 5' de dicho polinucleótido que codifica un polipéptido heterólogo.

15

**13.** Una planta que comprende al menos una célula transfectada con el vector vírico del CTV del aspecto inventivo 11.

**14.** La planta del aspecto inventivo 13, en la que dicha planta es un árbol.

20

**15.** La planta del aspecto inventivo 13, en la que dicha planta es un árbol cítrico.

**16.** Un procedimiento de infección de un árbol para expresar un polipéptido heterólogo, comprendiendo dicho procedimiento transfectar al menos una célula de dicho árbol con un vector vírico del CTV modificado para comprender un casete génico que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido heterólogo, el vector vírico del CTV modificado de modo que el casete génico esté insertado en el lugar del gen p13 del CTV.

25

**17.** Un vector vírico del CTV modificado para comprender un casete génico que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido heterólogo y una secuencia IRES conjugada al mismo.

30

**18.** El vector vírico del CTV del aspecto inventivo 17, en el que el casete génico está fusionado a los genes p13, p20 o p23.

35

**19.** Una planta que comprende al menos una célula transfectada con un vector vírico del CTV del aspecto inventivo 17.

5 **20.** Un procedimiento de infección de un árbol para expresar un polipéptido heterólogo, comprendiendo dicho procedimiento transfectar al menos una célula de dicho árbol con un vector vírico del CTV modificado para comprender un casete génico que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido heterólogo y una secuencia IRES conjugada al mismo.

10 **21.** Un vector vírico del CTV modificado para comprender un casete génico que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un primer polipéptido heterólogo, una proteasa con sitios de escisión insertados en cada extremo, y un segundo polipéptido heterólogo.

15 **22.** El vector vírico del CTV del aspecto inventivo 21, en el que dicha proteasa está posicionada entre dicho primer polipéptido heterólogo y segundo polipéptido heterólogo.

**23.** El vector vírico del CTV del aspecto inventivo 21, en el que el casete génico comprende además un elemento controlador de ARNm subgenómico posicionado en dirección 5' de dicho polinucleótido que codifica el primer polipéptido heterólogo.

20 **24.** El vector vírico del CTV del aspecto inventivo 21, en el que dicho polinucleótido comprende secuencias que codifican polipéptidos heterólogos.

25 **25.** El vector vírico del CTV del aspecto inventivo 21, en el que dicho polinucleótido codifica además una secuencia de proteína endógena y una proteasa y sitios de reconocimiento de proteasa entre dicha secuencia de primer y segundo polipéptidos heterólogos.

**26.** El vector vírico del CTV del aspecto inventivo 21, en el que dicho casete génico está insertado en el lugar de un gen endógeno.

30 **27.** El vector vírico del CTV del aspecto inventivo 26, en el que dicho gen endógeno es p13.

**28.** El vector vírico del CTV del aspecto inventivo 21, en el que dicho casete génico está posicionado en las regiones de genoma del CTV p13-p20, p20-p23 o p23-3'NTR.

35

- 29.** Una planta que comprende al menos una célula transfectada con un vector vírico del CTV del aspecto inventivo 21.
- 30.** Un vector vírico del CTV modificado para comprender un casete génico que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido heterólogo y una proteasa con sitios de escisión insertados en cada extremo fusionados en el mismo marco de lectura con una proteína vírica.
- 31.** El vector vírico del CTV del aspecto inventivo 30, en el que dicha proteasa está posicionada entre dicha proteína vírica y dicho polipéptido heterólogo.
- 32.** El vector vírico del CTV del aspecto inventivo 30, en el que dicho casete génico está fusionado a un gen del CTV endógeno de modo que la traducción del gen endógeno y dicha secuencia de polinucleótido se produzcan juntos.
- 33.** El vector vírico del CTV del aspecto inventivo 30, en el que dicho gen endógeno es p13, p20 o p23.
- 34.** Un procedimiento de infección de un árbol para expresar un polipéptido heterólogo, comprendiendo dicho procedimiento transfectar al menos una célula de dicho árbol con un vector vírico del CTV modificado para comprender un casete génico que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un primer polipéptido heterólogo y un segundo polipéptido heterólogo.
- 35.** Un vector vírico del CTV modificado para comprender un primer casete génico que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un primer polipéptido heterólogo y un primer elemento controlador en dirección 5' de dicha primera secuencia heteróloga; y un segundo casete génico que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un segundo polipéptido heterólogo y un segundo elemento de control en dirección 5' de dicha segunda secuencia heteróloga.
- 36.** El vector vírico del CTV del aspecto inventivo 35, en el que dichos primer y segundo casetes génicos están posicionados secuencialmente en la misma localización sobre dicho vector vírico del CTV.

37. El vector vírico del CTV del aspecto inventivo 35, en el que dichos primer y segundo casetes génicos están posicionados en dos localizaciones separadas sobre dicho vector vírico del CTV.
- 5 38. El vector vírico del CTV del aspecto inventivo 36, en el que dichos casetes génicos están posicionados en las regiones del genoma vírico del CTV p13-p20, p20-p23 o p23-3'NTR.
39. El vector vírico del CTV del aspecto inventivo 37, en el que dichos casetes génicos están posicionados en las regiones del genoma vírico del CTV p13-p20, p20-p23 o p23-3'NTR.
- 10 40. El vector vírico del CTV del aspecto inventivo 37, en el que dichos uno o ambos casetes génicos están insertados en el lugar de un gen endógeno, y dicho segundo casete génico está posicionado en una localización separada de dicho primer casete génico.
- 15 41. El vector vírico del CTV del aspecto inventivo 40, en el que dicho gen endógeno es p13.
42. Una planta que comprende al menos una célula transfectada con un vector vírico del CTV del aspecto inventivo 35.
- 20 43. Un procedimiento de infección de un árbol para expresar un polipéptido heterólogo, comprendiendo dicho procedimiento transfectar al menos una célula de dicho árbol con un vector vírico del CTV modificado para comprender un primer casete génico que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un primer polipéptido heterólogo y un primer elemento controlador en dirección 5' de dicha primera secuencia heteróloga; y un segundo casete génico que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un segundo polipéptido heterólogo y un segundo elemento de control en dirección 5' de dicha segunda secuencia heteróloga.
- 25 44. El vector del aspecto inventivo 1, en el que dicho vector vírico del CTV está modificado para comprender múltiples casetes génicos localizados en una o múltiples posiciones.
- 30 45. El vector del aspecto inventivo 44, en el que dicho vector vírico del CTV comprende al menos dos casetes génicos en una posición y al menos un casete génico en una localización diferente.

35

46. El procedimiento del aspecto inventivo 9, en el que dicho vector vírico del CTV está modificado para comprender múltiples casetes génicos localizados en una o múltiples posiciones.

5 47. El procedimiento del aspecto inventivo 44, en el que dicho vector vírico del CTV comprende al menos dos casetes génicos en una posición y al menos un casete génico en una posición diferente.

10 48. El vector del aspecto inventivo 35, que comprende además un tercer casete génico que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un tercer polipéptido heterólogo y un tercer elemento controlador en dirección 5' de dicha tercera secuencia heteróloga.

15 49. El vector del aspecto inventivo 48, que comprende además un cuarto casete génico que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un cuarto polipéptido heterólogo y un cuarto elemento controlador en dirección 5' de dicha cuarta secuencia heteróloga.

20 50. El vector del aspecto inventivo 48, en el que dicho tercer casete génico está posicionado en la misma localización o localización diferente en dicho vector del CTV con relación a dichos primer y segundo casetes génicos.

51. El vector del aspecto inventivo 49, en el que dichos tercer y cuarto casetes génicos están posicionados secuencialmente en la misma localización en dicho vector vírico del CTV.

25 52. El vector vírico del CTV del aspecto inventivo 49, en el que dichos tercer y cuarto casetes génicos están posicionados en dos localizaciones separadas sobre dicho vector vírico del CTV.

### TRADUCCIÓN DE TÉRMINOS EN INGLÉS

30 El término "Artificial Sequence" significa "Secuencia artificial". El término "Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide" significa "Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético". El término "Description of Artificial Sequence: Synthetic primer", significa "Descripción de secuencia artificial: cebador sintético". El término "DNA" significa  
35 "ADN". El término "Tobacco etch virus" significa "virus del grabado del tabaco".



## REIVINDICACIONES

1. Un vector vírico del CTV modificado para comprender al menos un casete génico que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido heterólogo, el vector vírico del CTV modificado de modo que el casete génico esté posicionado en el locus localizado entre el gen CTV p23 y la región 3'NTR (región no traducida).
2. El vector vírico del CTV de la reivindicación 1, en el que el al menos un casete génico comprende además un elemento controlador de ARNm subgenómico posicionado en dirección 5' de dicho polinucleótido que codifica un polipéptido heterólogo.
3. Un procedimiento de infección de un árbol para expresar un polipéptido heterólogo, comprendiendo dicho procedimiento transfectar al menos una célula de dicho árbol con un vector vírico del CTV modificado para comprender al menos un casete génico que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido heterólogo, el vector vírico del CTV modificado de modo que el casete génico esté posicionado en el locus localizado entre el gen CTV p23 y la región 3'NTR (región no traducida).
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicho árbol es un árbol cítrico.
5. Un vector vírico del CTV modificado para comprender un casete génico que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un primer polipéptido heterólogo, una proteasa, y un segundo polipéptido heterólogo, donde la secuencia de polinucleótido que codifica la proteasa está modificada en sus extremos para incluir sitios de escisión, el vector vírico del CTV modificado de modo que el casete génico esté posicionado en el locus localizado entre el gen CTV p23 y la región 3'NTR (región no traducida).
6. El vector vírico del CTV de la reivindicación 5, en el que dicha proteasa está posicionada entre dicho primer polipéptido heterólogo y segundo polipéptido heterólogo.
7. El vector vírico del CTV de la reivindicación 5, en el que el casete génico comprende además un elemento controlador de ARNm subgenómico posicionado en dirección 5' de dicho polinucleótido que codifica el primer polipéptido heterólogo.
8. Un vector vírico del CTV modificado para comprender un casete génico que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido heterólogo y una proteasa,

fusionados en el mismo marco de lectura con una proteína vírica, donde la secuencia de polinucleótido que codifica la proteasa está modificada en sus extremos para incluir sitios de escisión, el vector vírico del CTV modificado de modo que el casete génico esté posicionado en el locus localizado entre el gen CTV p23 y la región 3'NTR (región no traducida).

5

**9.** El vector vírico del CTV de la reivindicación 8, en el que dicha proteasa está posicionada entre dicha proteína vírica y dicho polipéptido heterólogo.

**10.** Un procedimiento de infección de un árbol para expresar un polipéptido heterólogo, comprendiendo dicho procedimiento transfectar al menos una célula de dicho árbol con un vector vírico del CTV modificado para comprender un casete génico que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un primer polipéptido heterólogo y un segundo polipéptido heterólogo, el vector vírico del CTV modificado de modo que el casete génico esté posicionado en el locus localizado entre el gen CTV p23 y la región 3'NTR (región no traducida).

15

**11.** Un vector vírico del CTV modificado para comprender un primer casete génico que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un primer polipéptido heterólogo y un primer elemento controlador en dirección 5' de dicha primera secuencia heteróloga; y un segundo casete génico que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un segundo polipéptido heterólogo y un segundo elemento de control en dirección 5' de dicha segunda secuencia heteróloga, el vector vírico del CTV modificado de modo que al menos un casete génico esté posicionado en el locus localizado entre el gen CTV p23 y la región 3'NTR (región no traducida).

25

**12.** El vector vírico del CTV de la reivindicación 11, en el que dichos primer y segundo casetes génicos están posicionados secuencialmente en la misma localización sobre dicho vector vírico del CTV.

**13.** El vector vírico del CTV de la reivindicación 11, en el que dichos primer y segundo casetes génicos están posicionados en dos localizaciones separadas sobre dicho vector vírico del CTV.

30

**14.** Un procedimiento de infección de un árbol para expresar un polipéptido heterólogo, comprendiendo dicho procedimiento transfectar al menos una célula de dicho árbol con un vector vírico del CTV modificado para comprender un primer casete génico que comprende

35

una secuencia de polinucleótido que codifica un primer polipéptido heterólogo y un primer elemento controlador en dirección 5' de dicha primera secuencia heteróloga; y un segundo casete génico que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un segundo polipéptido heterólogo y un segundo elemento de control en dirección 5' de dicha segunda secuencia heteróloga, el vector vírico del CTV modificado de modo que al menos un casete génico esté posicionado en el locus localizado entre el gen CTV p23 y la región 3'NTR (región no traducida).

5  
10 **15.** El vector de la reivindicación 1, en el que dicho vector vírico del CTV está modificado para comprender múltiples casetes génicos localizados en una o múltiples posiciones.

**16.** El vector de la reivindicación 15, en el que dicho vector vírico del CTV comprende al menos dos casetes génicos en una posición y al menos un casete génico en una localización diferente.

15  
**17.** El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicho vector vírico del CTV está modificado para comprender múltiples casetes génicos localizados en una o múltiples posiciones.

20 **18.** El procedimiento de la reivindicación 17, en el que dicho vector vírico del CTV comprende al menos dos casetes génicos en una posición y al menos un casete génico en una posición diferente.

**19.** El vector de la reivindicación 11, que comprende además un tercer casete génico que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un tercer polipéptido heterólogo y un tercer elemento controlador en dirección 5' de dicha tercera secuencia heteróloga.

**20.** El vector de la reivindicación 19, que comprende además un cuarto casete génico que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un cuarto polipéptido heterólogo y un cuarto elemento controlador en dirección 5' de dicha cuarta secuencia heteróloga.

30  
**21.** El vector de la reivindicación 19, en el que dicho tercer casete génico está posicionado en la misma localización o localización diferente en dicho vector del CTV con relación a dichos primer y segundo casetes génicos.

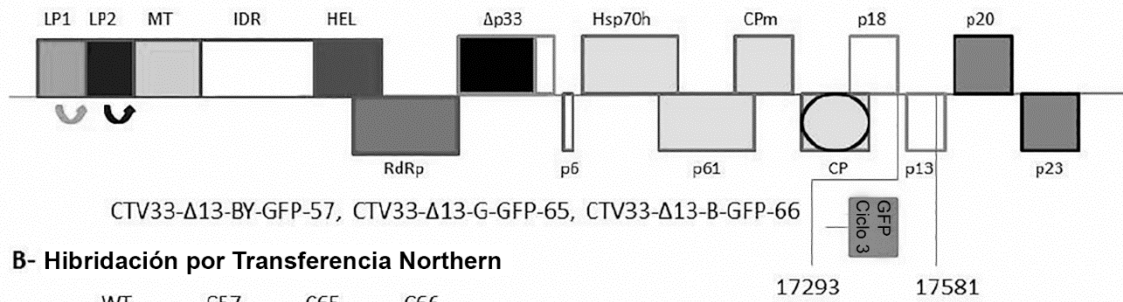
35

**22.** El vector de la reivindicación 20, en el que dichos tercer y cuarto casetes génicos están posicionados secuencialmente en la misma localización en dicho vector vírico del CTV.

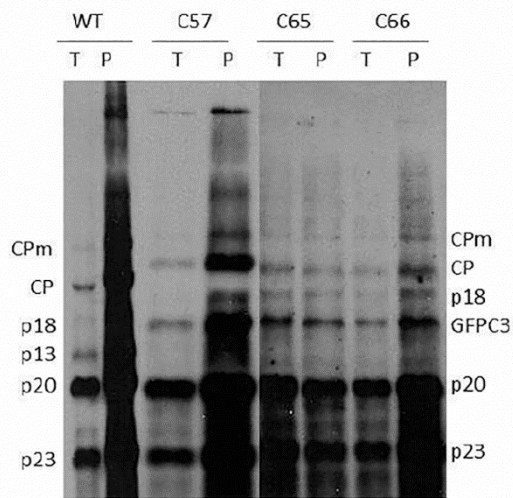
**23.** El vector vírico del CTV de la reivindicación 20, en el que dichos tercer y cuarto casetes génicos están posicionados en dos localizaciones separadas sobre dicho vector vírico del CTV.

5

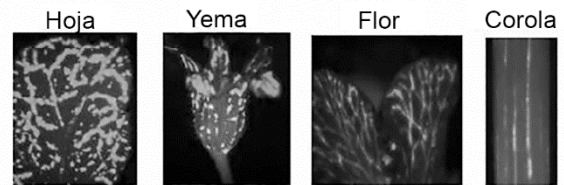
**A- CTV9RΔp33**



**B- Hibridación por Transferencia Northern**



**C- *N. benthamiana***



**D- *Citrus macrophylla***

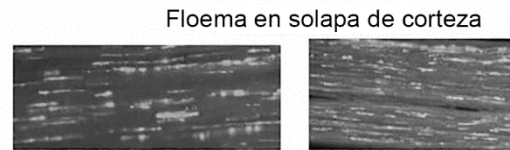


FIG. 1

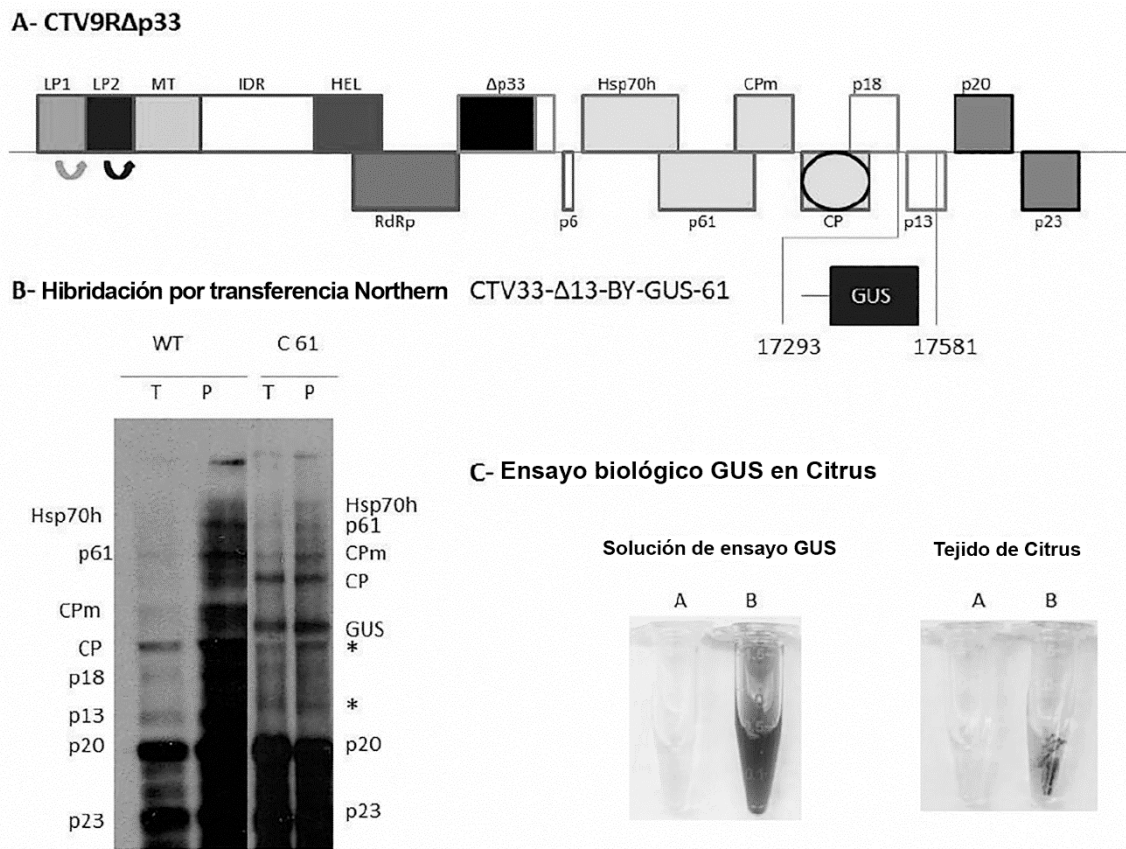


FIG. 2

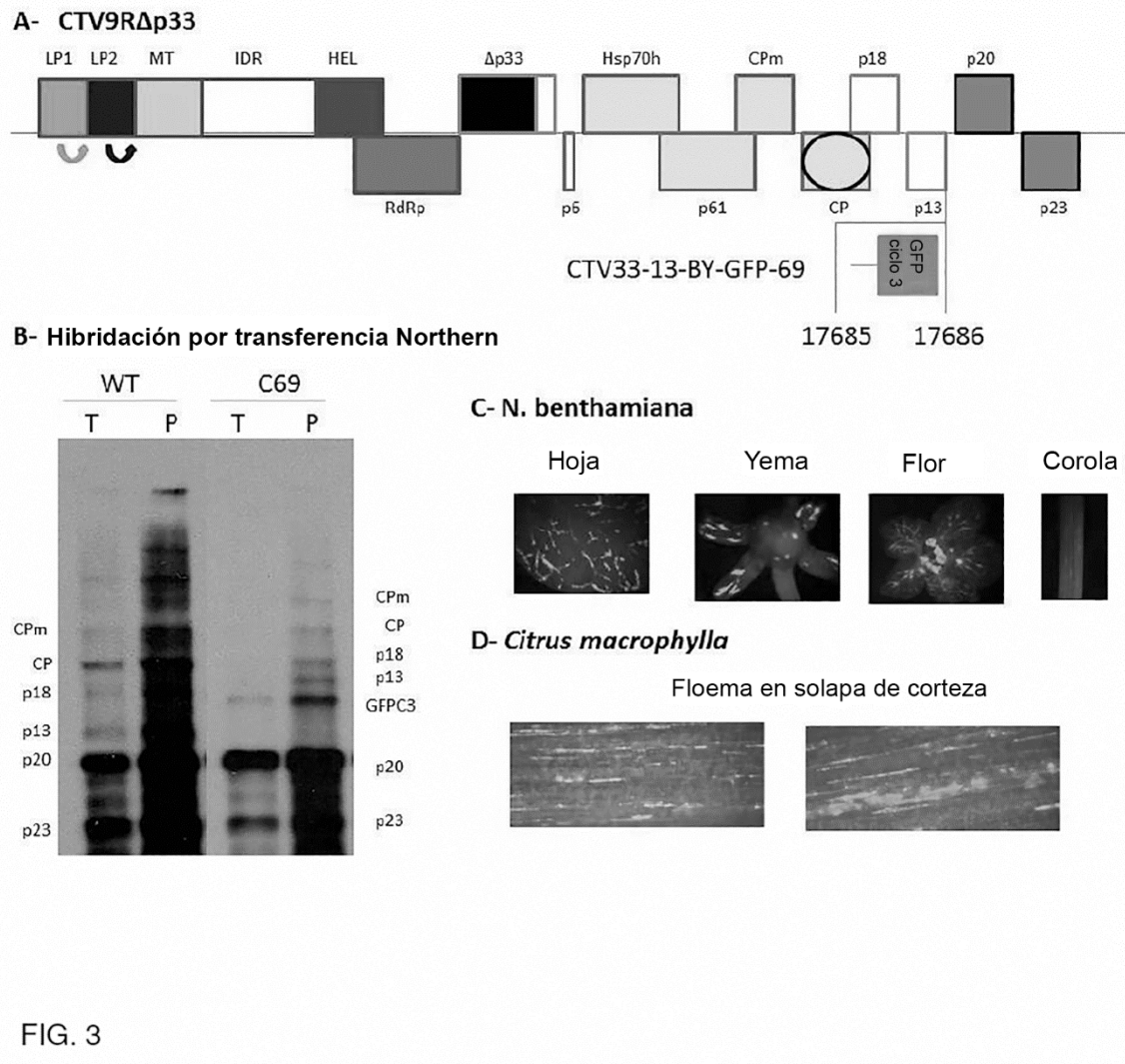


FIG. 3

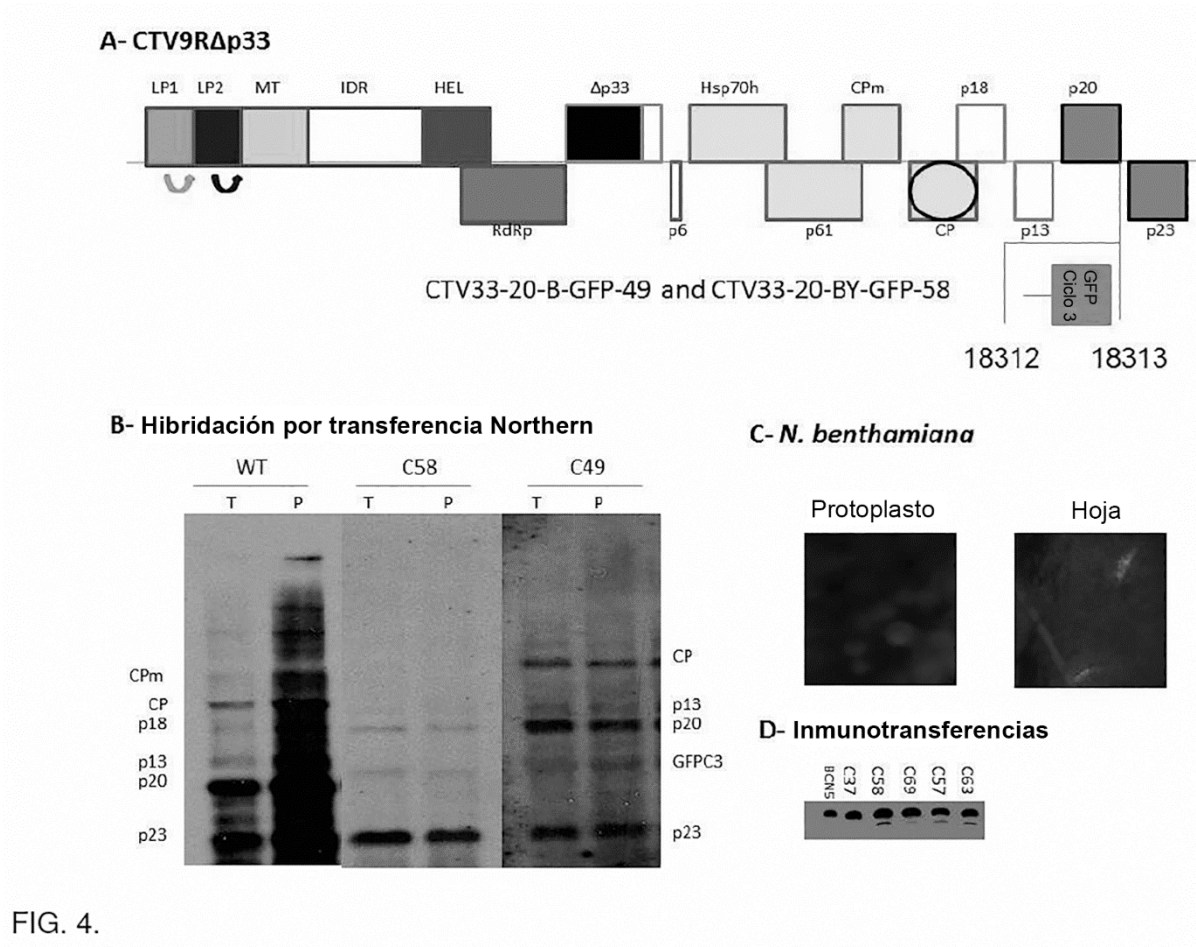


FIG. 4.



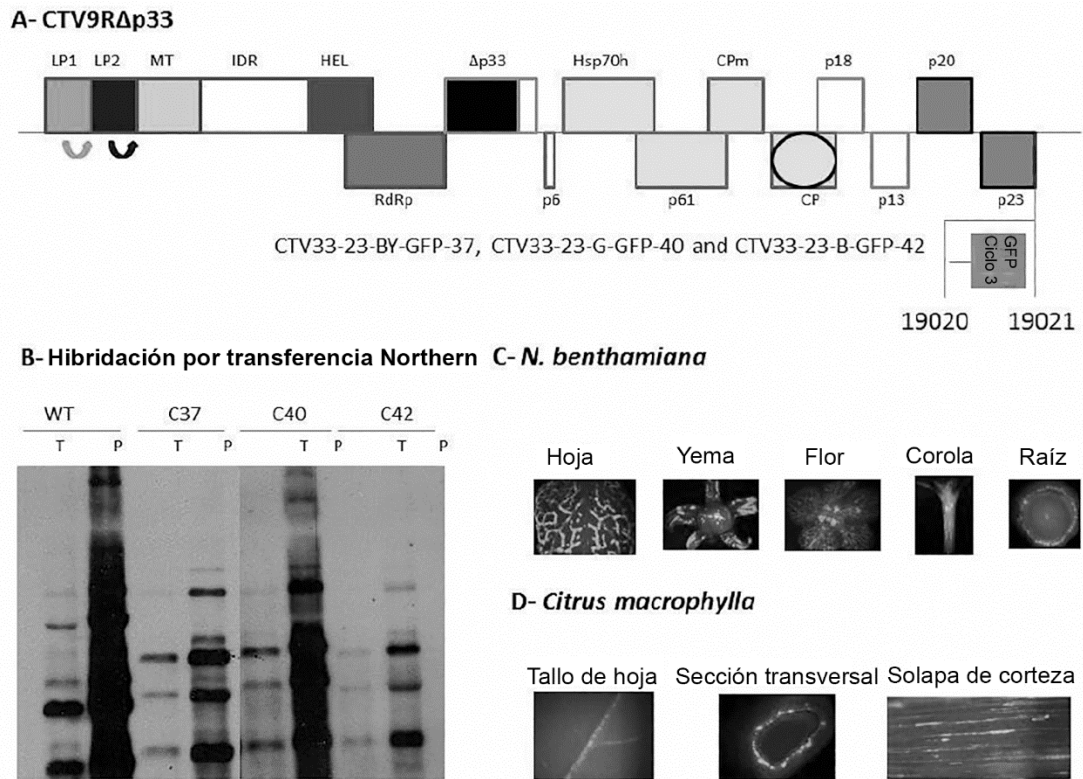
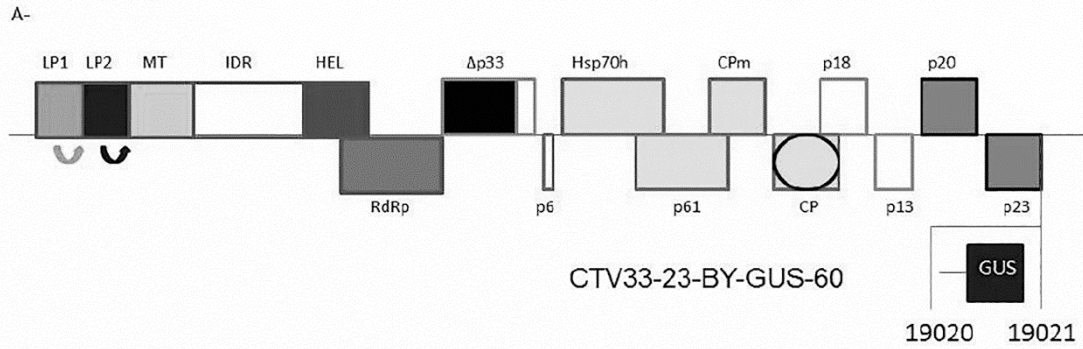
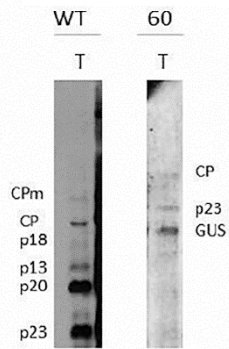


FIG. 5

**A- CTV9RΔp33**



**B- Hibridación por transferencia Northern**



**C- Actividad biológica GUS**

*N. benthamiana*



*Citrus macrophylla*

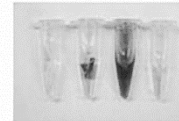
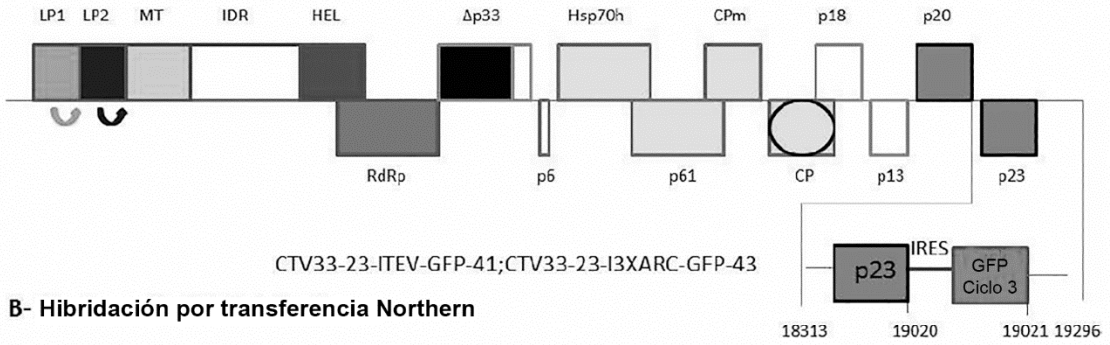


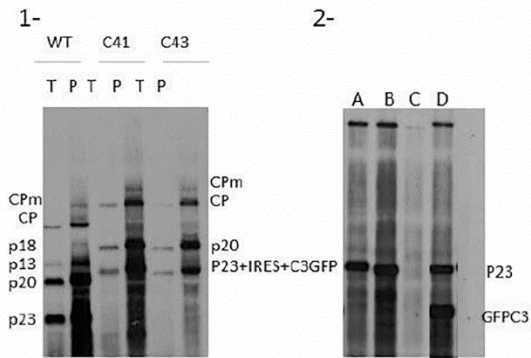
FIG. 6

**Estrategia de Sitio Interno de Entrada al Ribosoma (IRES)**

**A-CTV9RΔp33**



**B- Hibridación por transferencia Northern**



**CTV ΔCla 333R**

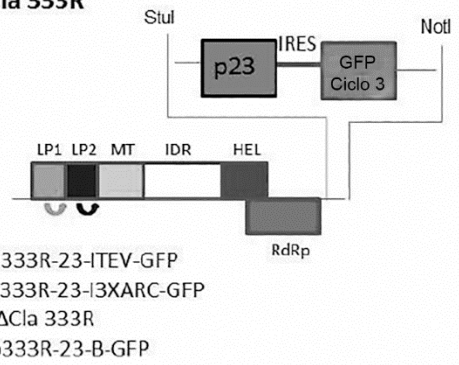
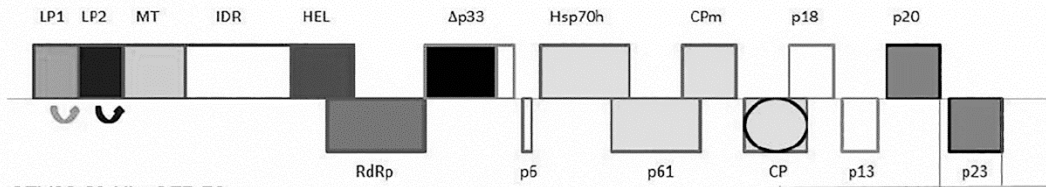


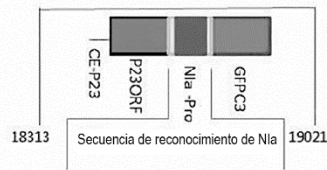
FIG. 7

**Fusión de Poli-Péptidos**

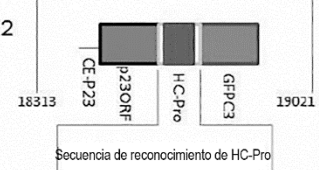
A- CTV9RΔp33



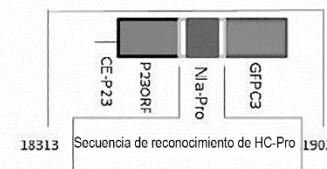
CTV33-23-NIa-GFP-73



CTV33-23-HC-GFP-72



CTV33-23-NIaØ-GFP-75



CTV33-23-HCØ-GFP-74

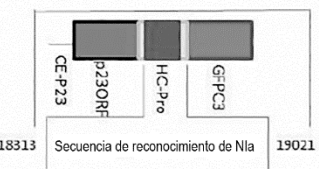


FIG. 8

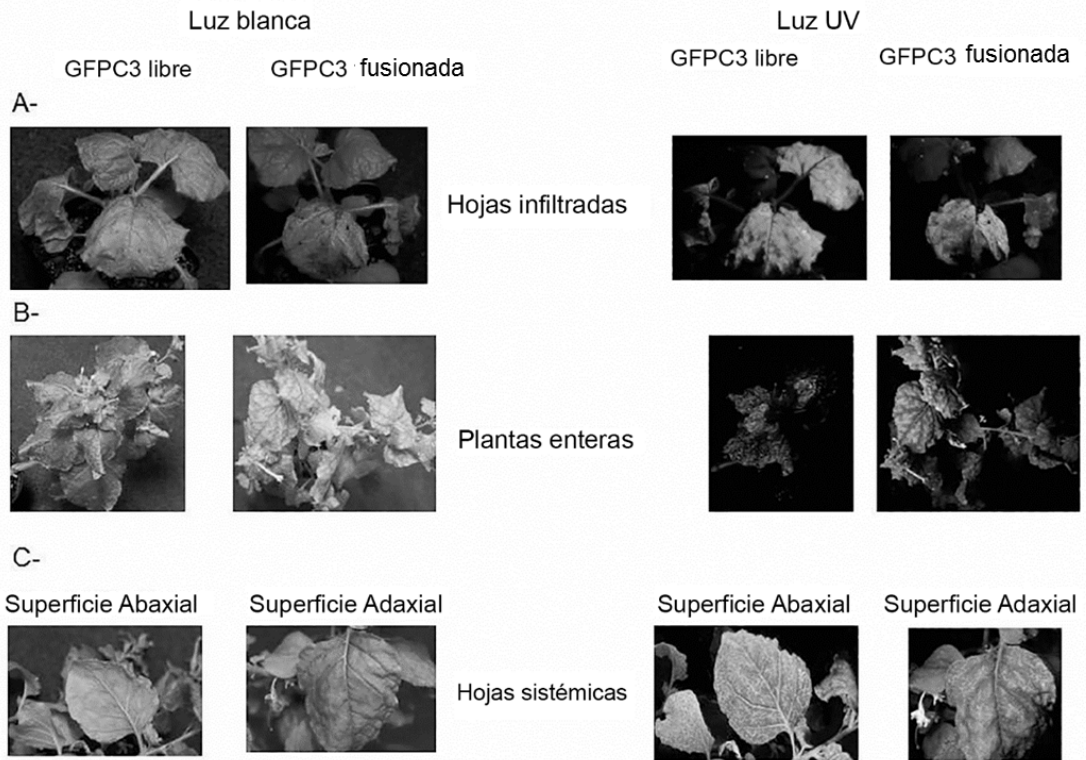


FIG. 9

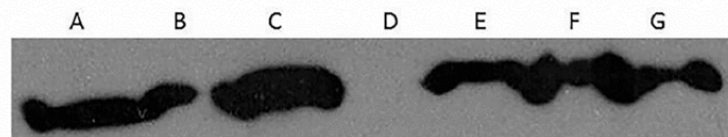
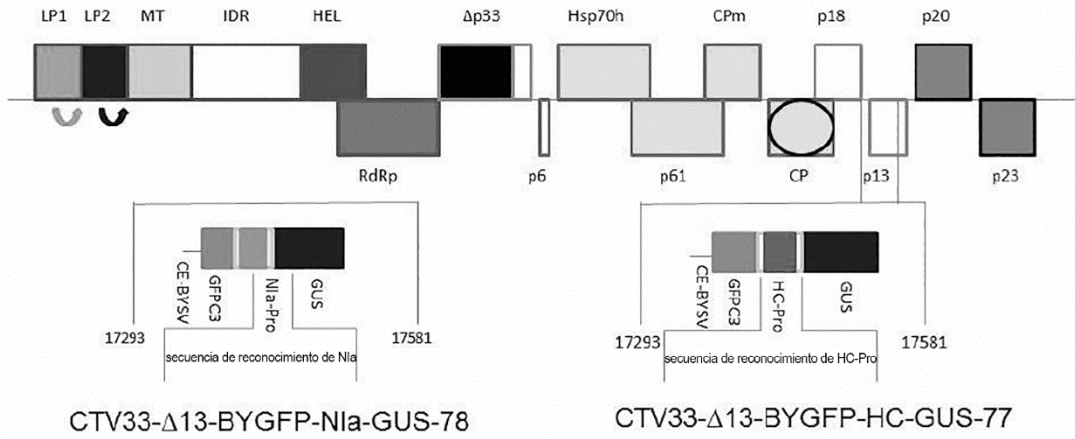


FIG. 10

**Sustitución del gen p13**

**A- CTV9RΔp33**



**B-Actividad de genes indicadores**

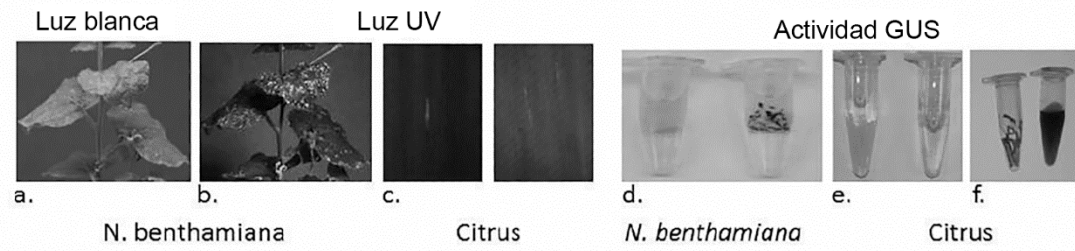


FIG. 11

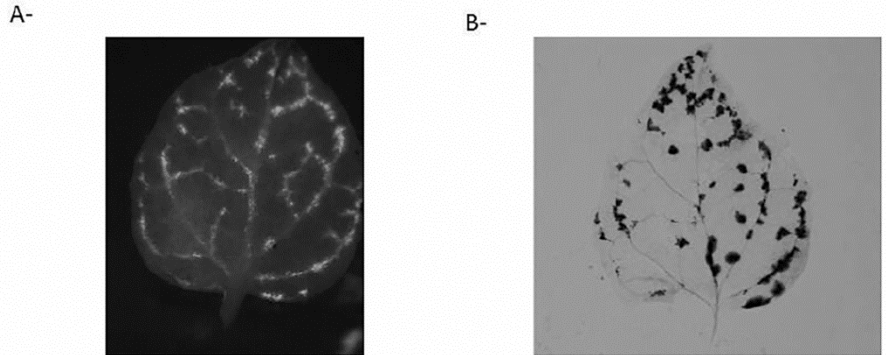


FIG. 12

**Inserción entre p23 y 3'NTR**

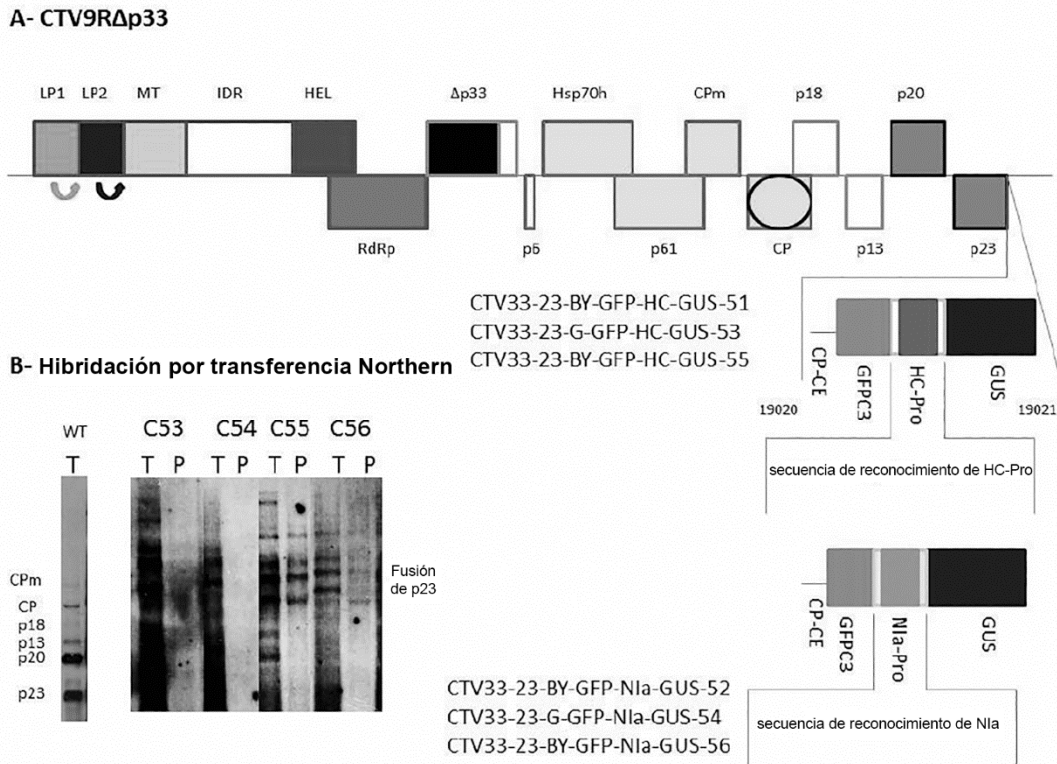


FIG. 13



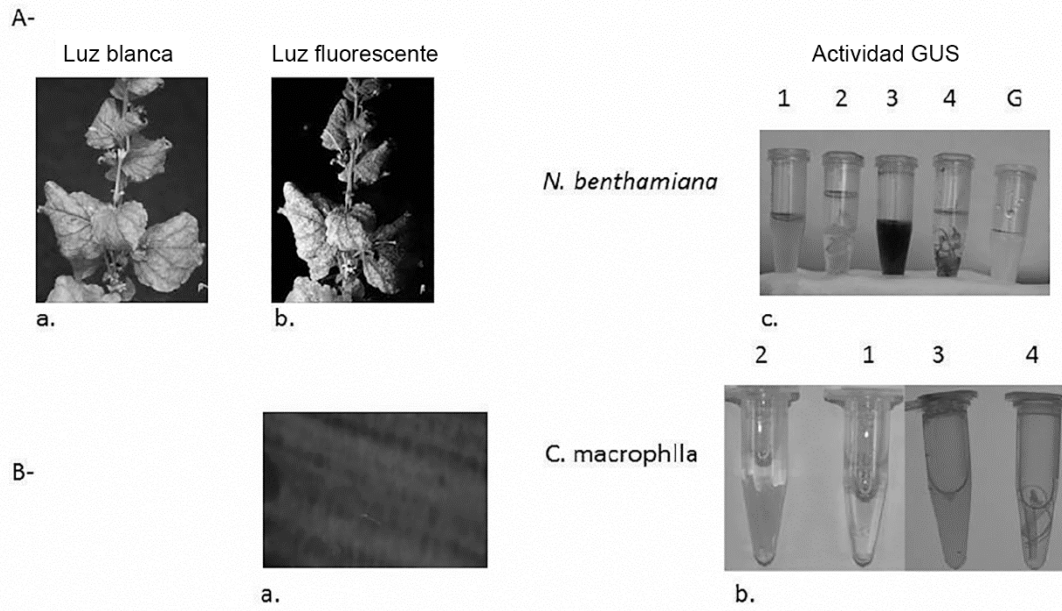


FIG. 14



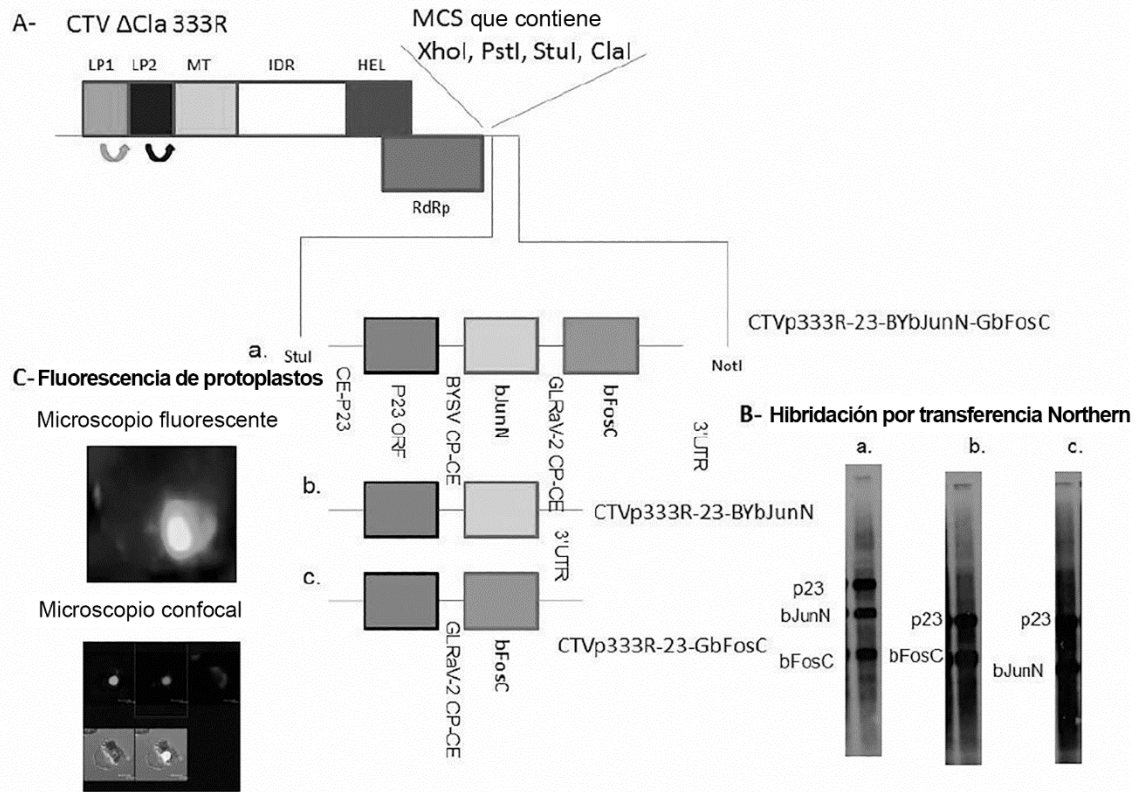


FIG. 15

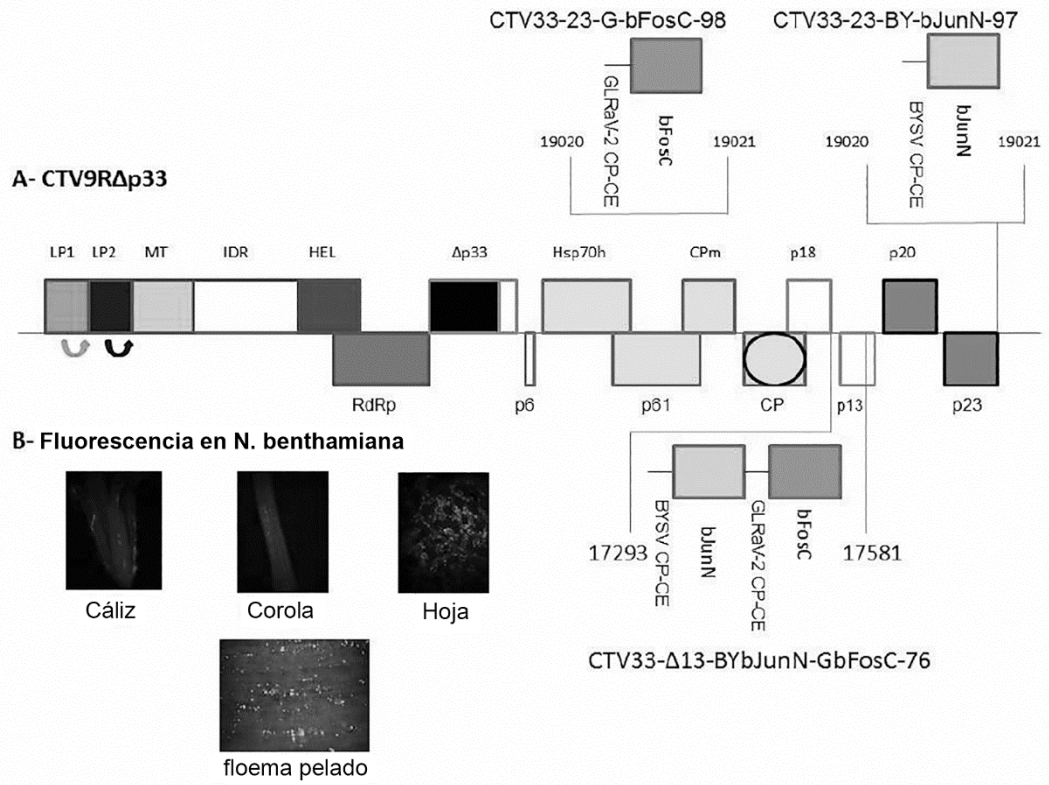


FIG. 16

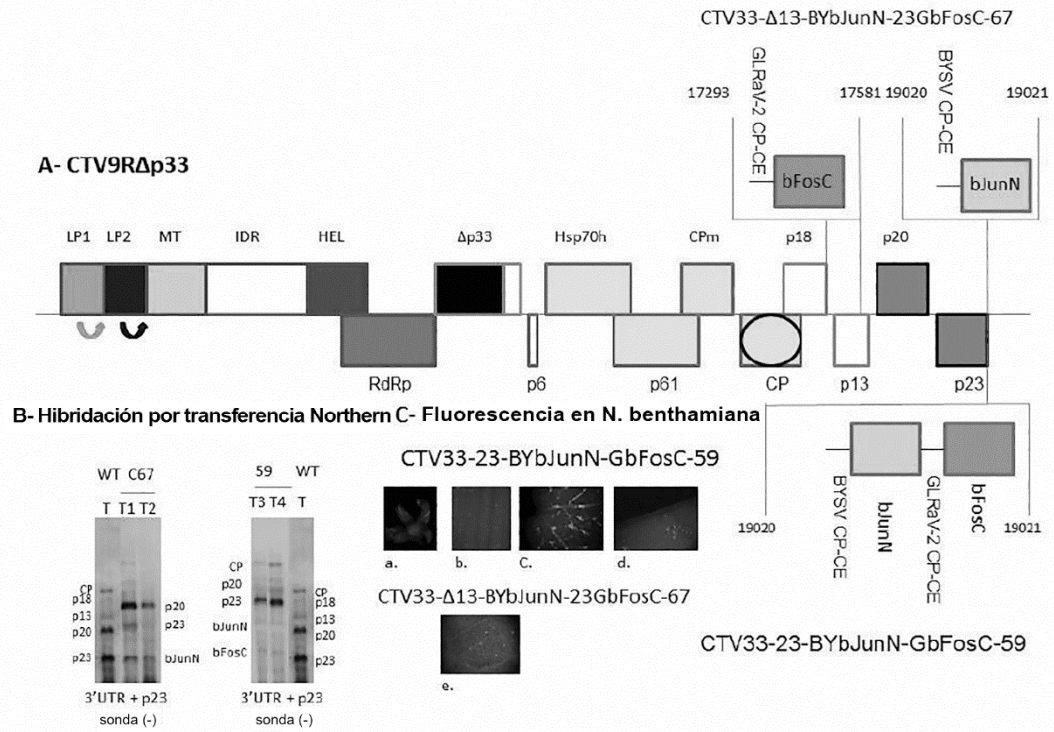


FIG. 17

**Ejemplo 6: Expresión de múltiples genes exógenos simultáneamente de diferentes localizaciones**

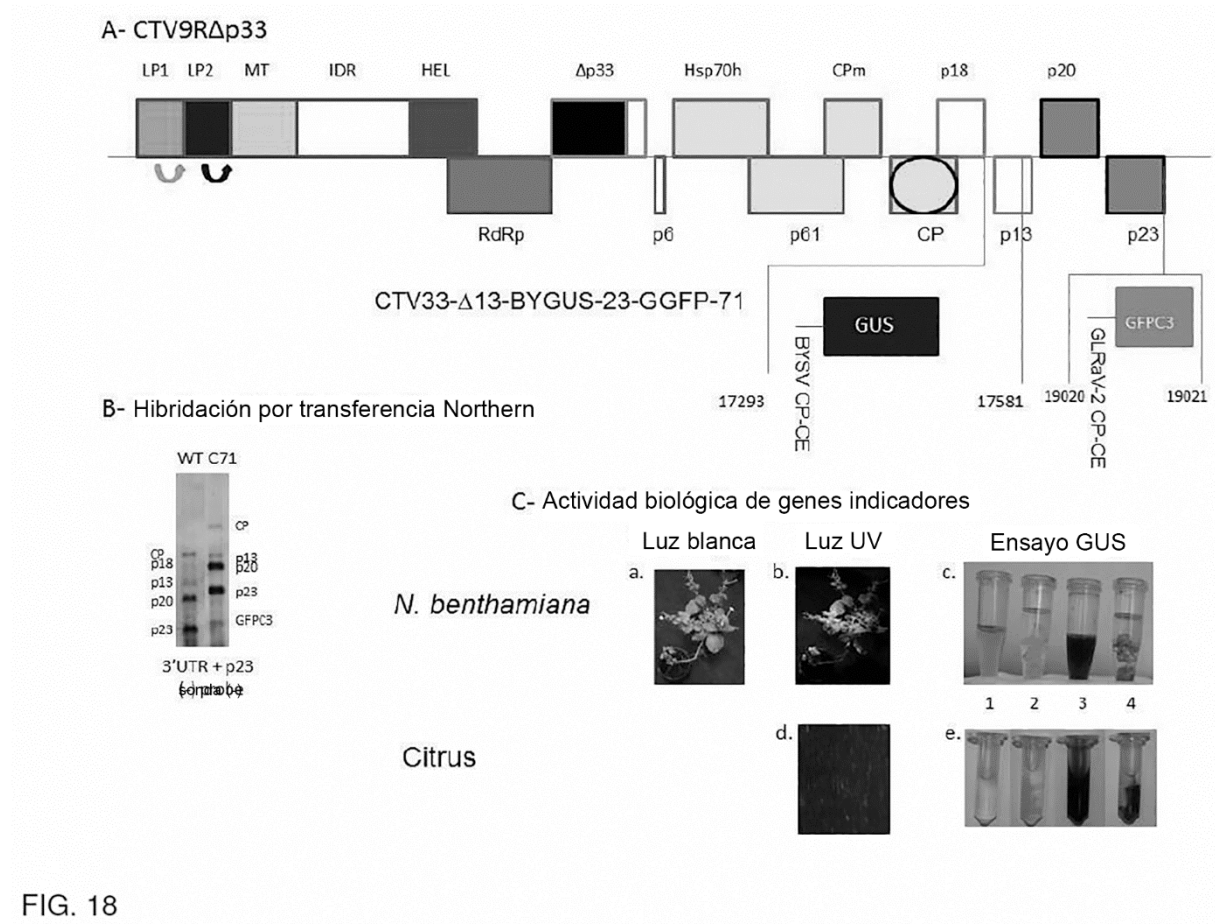


FIG. 18

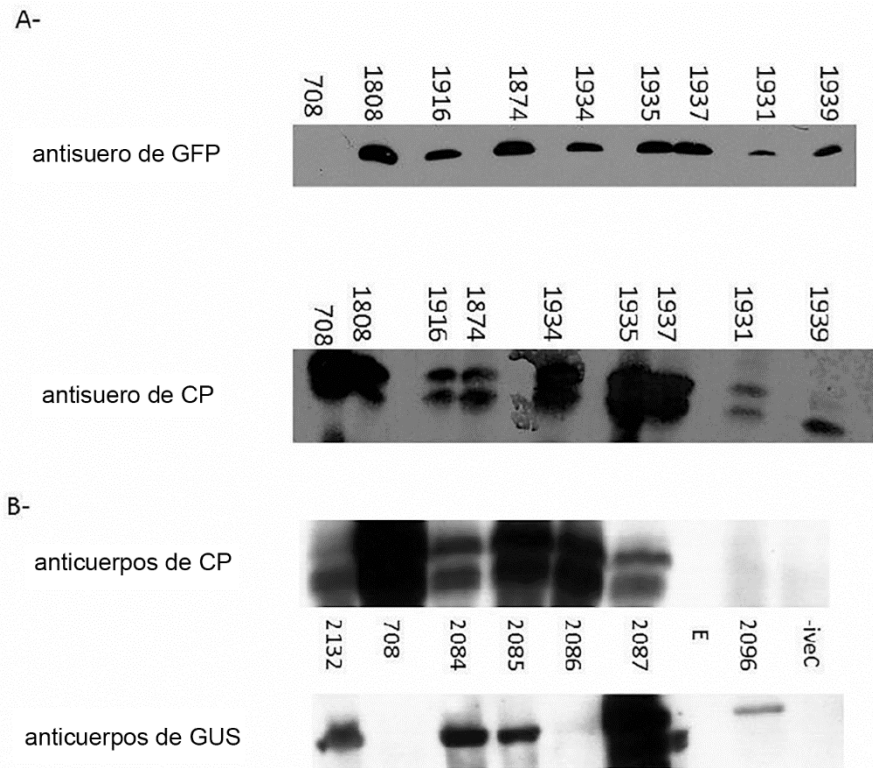
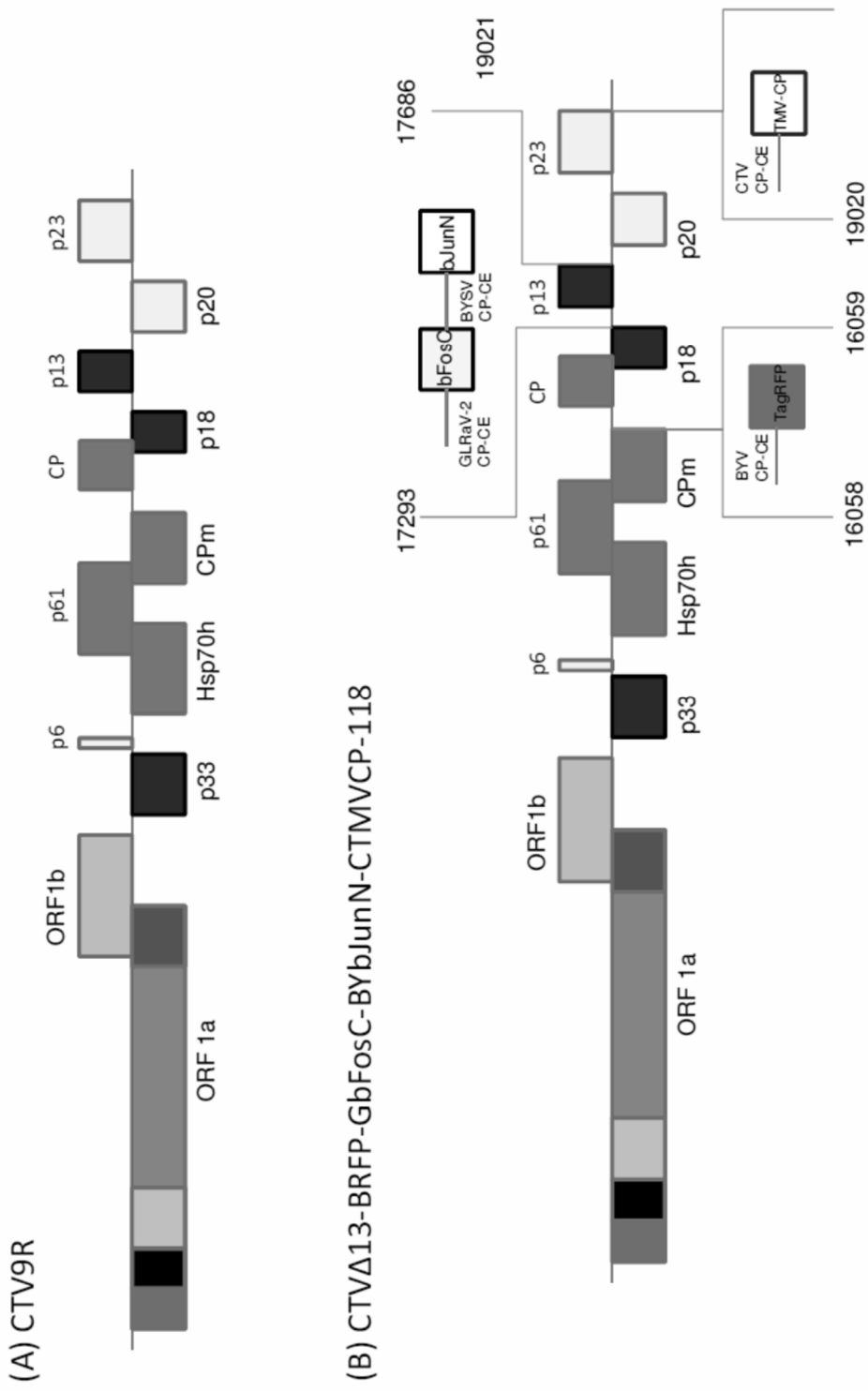


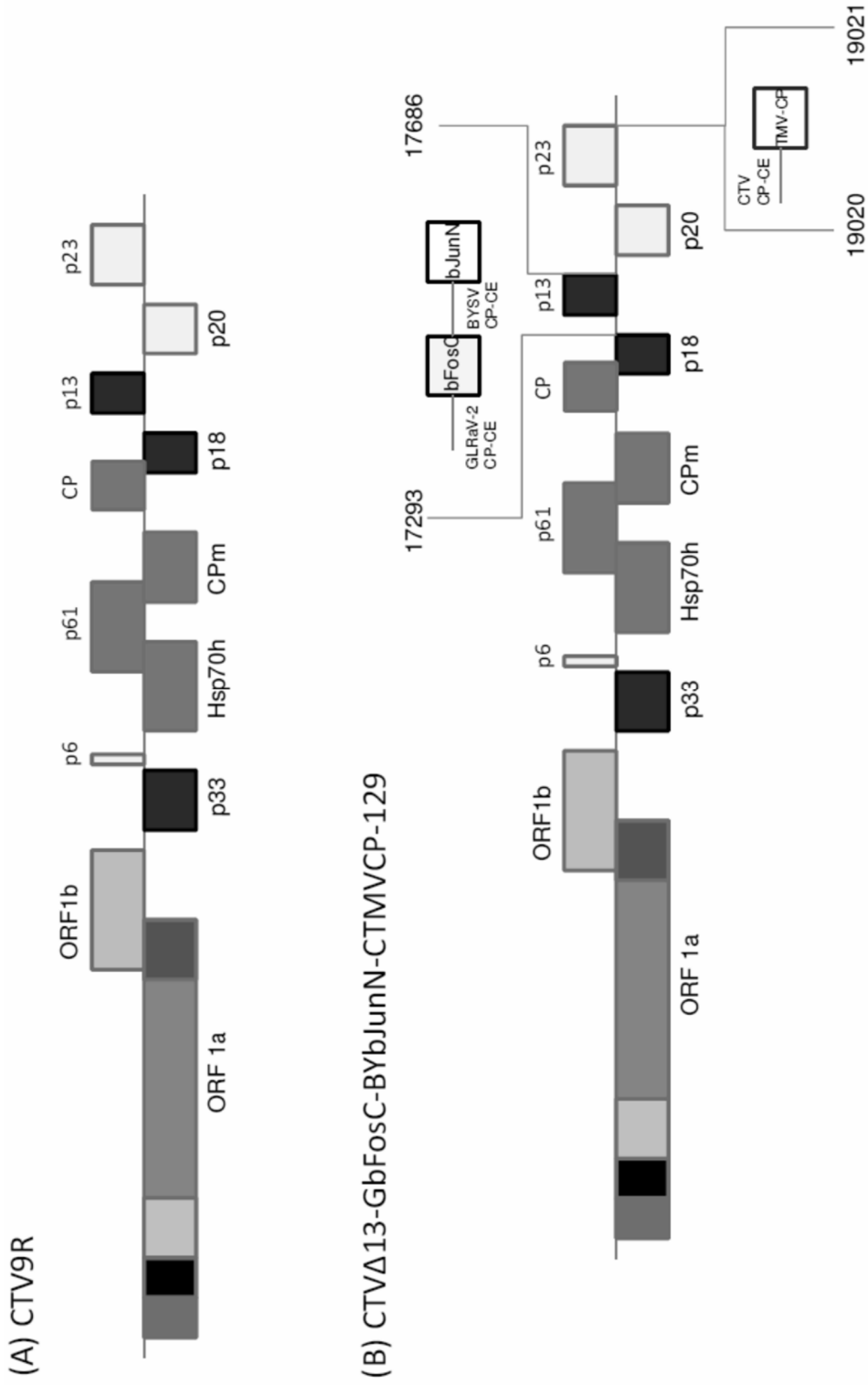
FIG. 19

Fig. 20 Vector de 4 genes



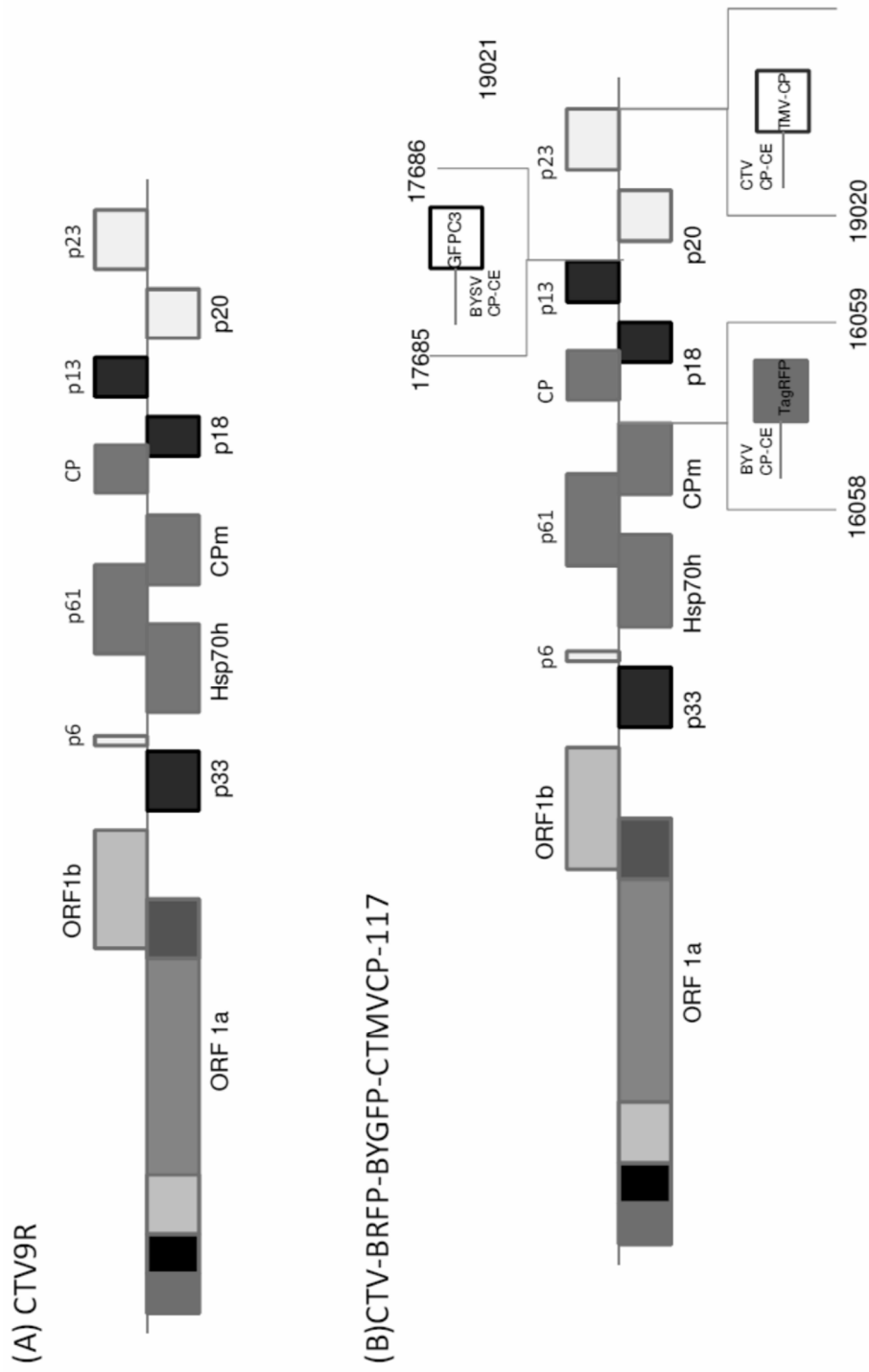
Infiltrado en *N. benthamiana* (resultado aún no disponible)

Fig. 21 Vector de 3 genes



Infiltrado recientemente en *N. benthamiana*

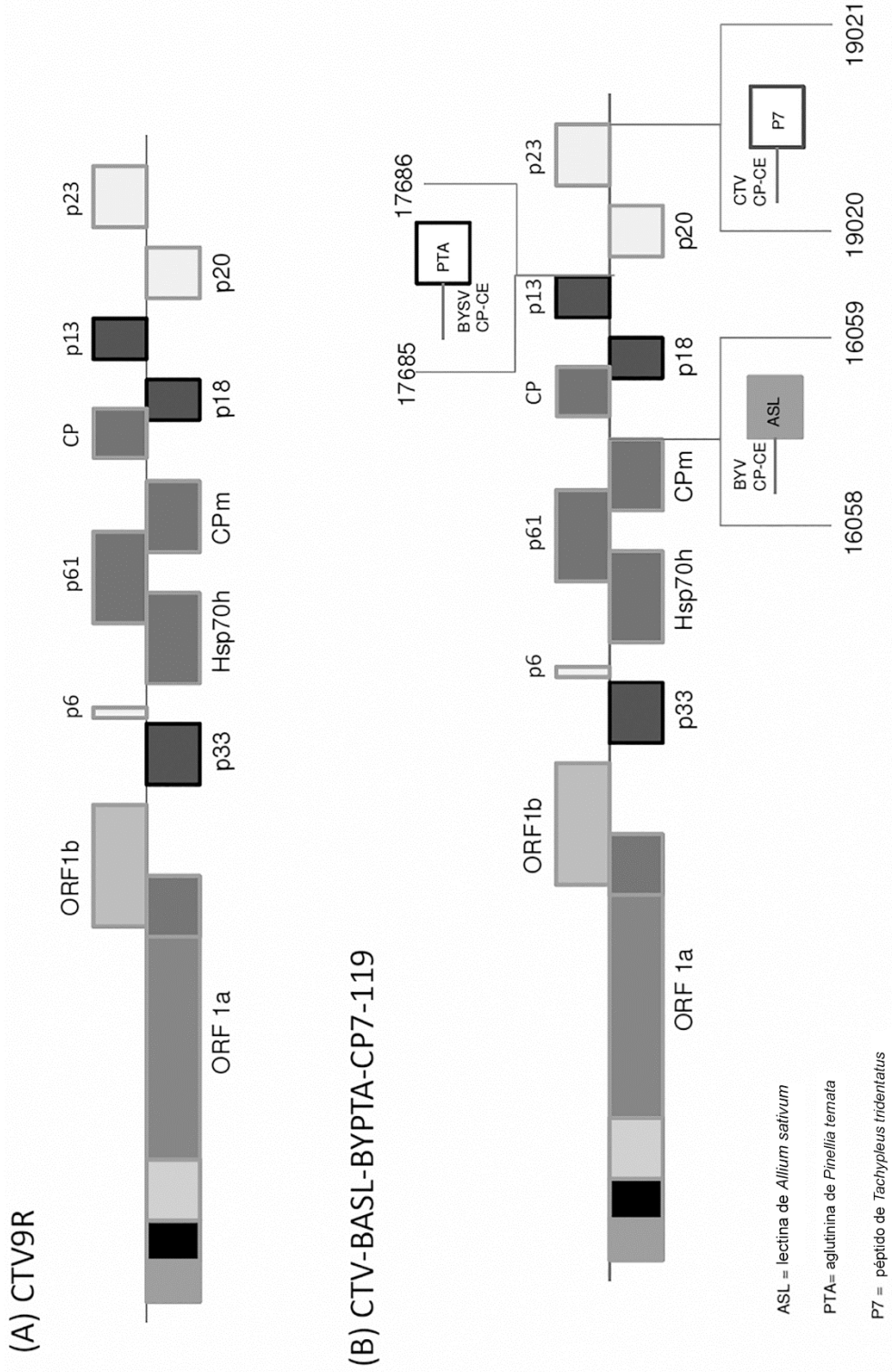
Fig. 22 Vector de 3 genes



Infiltrado en *N. benthamiana* (movimiento sistémico parcial visualizado a través de GFP)

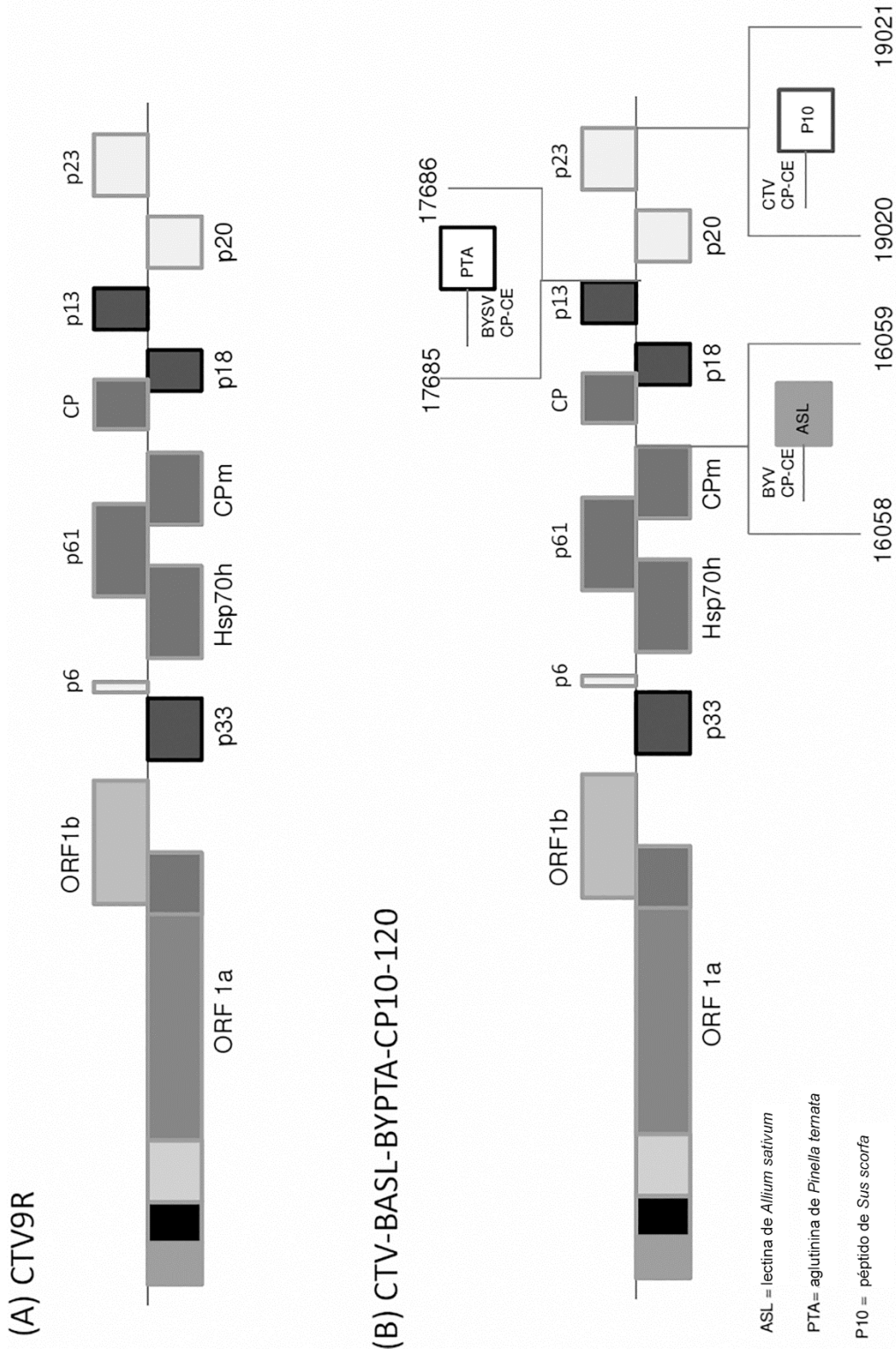


Fig. 23 Vector de 3 genes



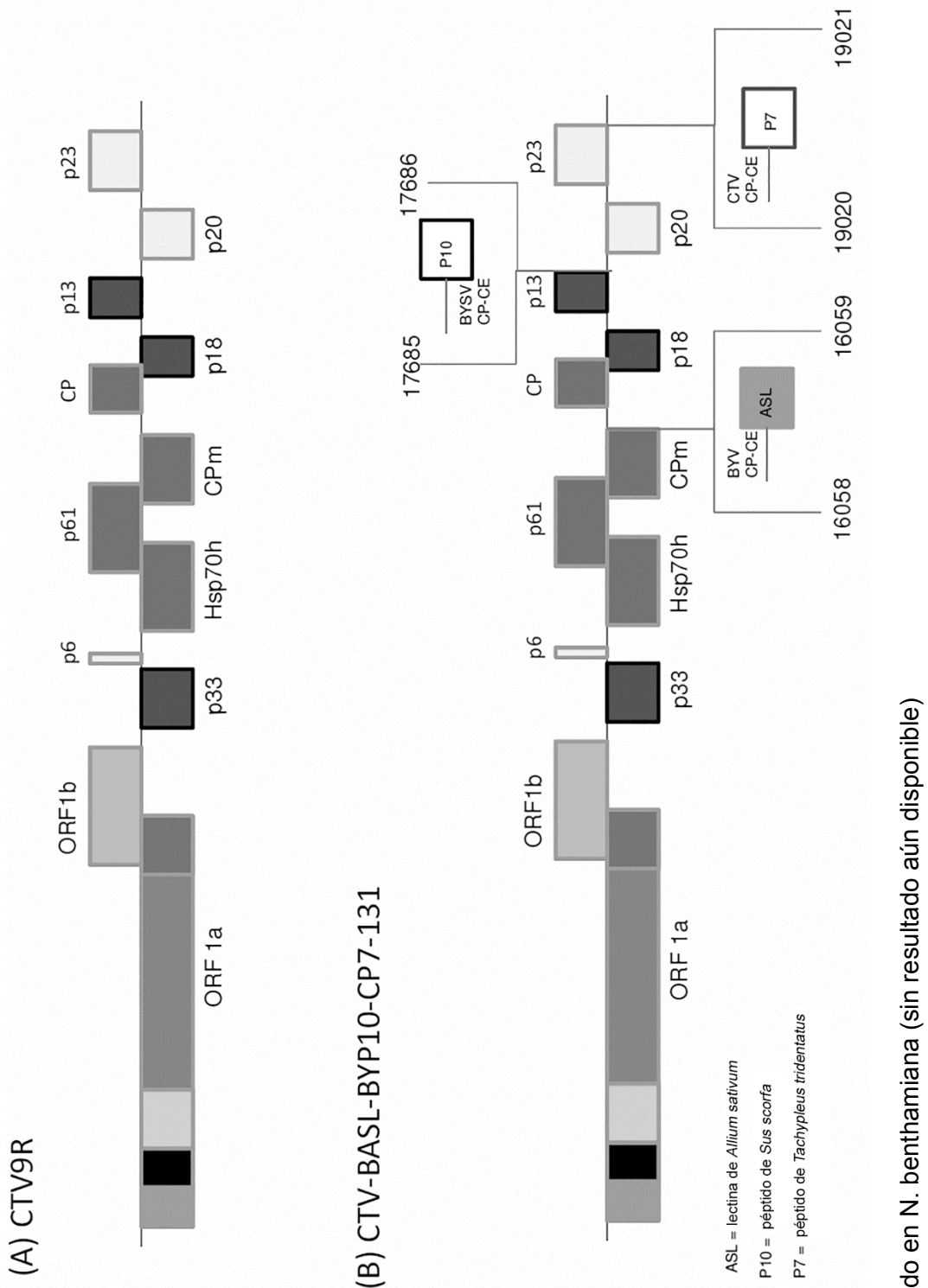
Infiltrado en *N. benthamiana* movimiento sistémico excelente en 1/14 plantas infiltradas

Fig. 24 Vector de 3 genes



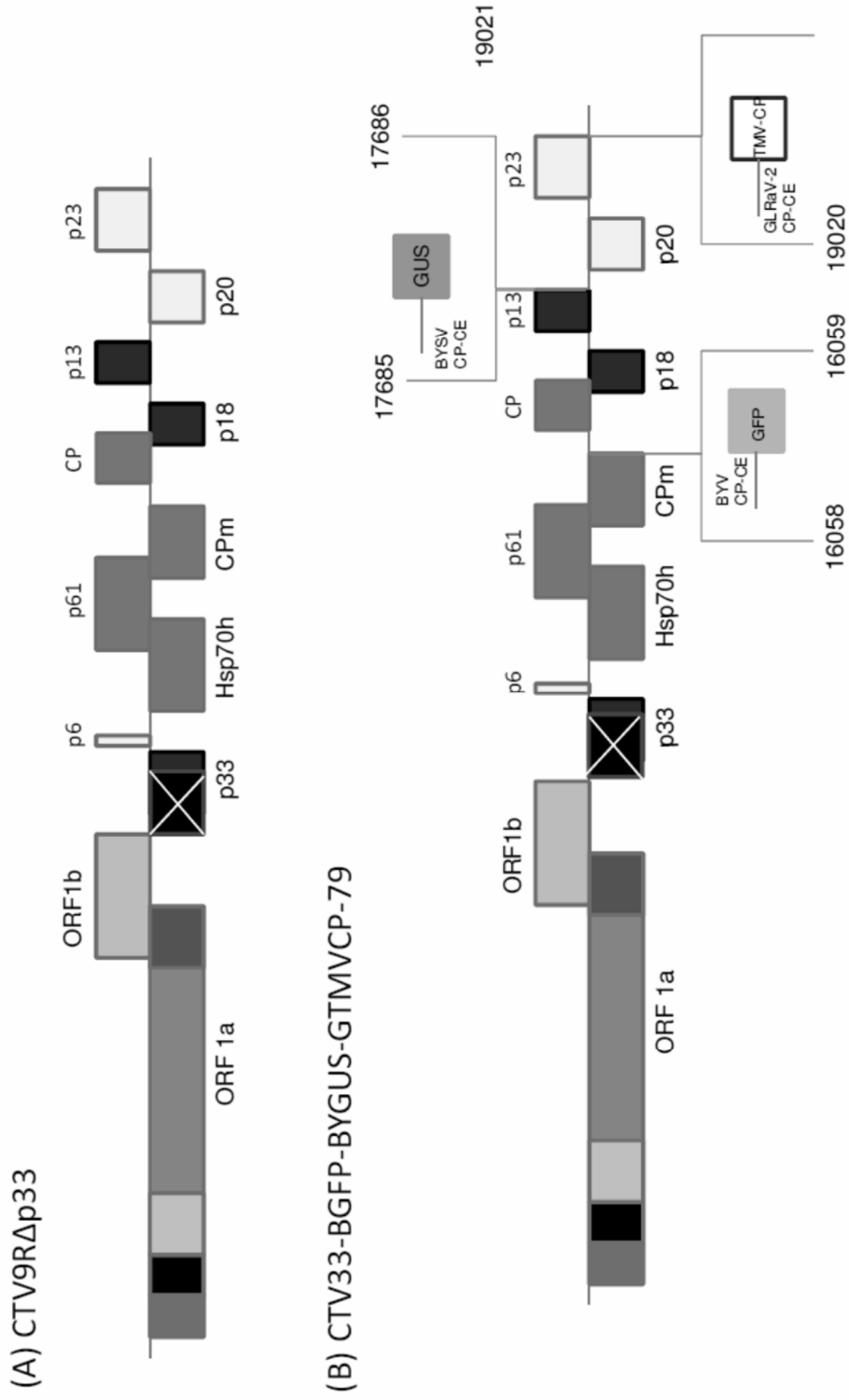
Infiltrado en *N. benthamiana*, pero sin movimiento sistémico visual observado en 24 plantas

Fig. 25 Vector de 3 genes



Infiltrado en *N. benthamiana* (sin resultado aún disponible)

Fig. 26 Vector de 3 genes



Infiltrado en hojas *N. benthamiana* e infección en cítricos intentada de hojas infiltradas. No se esperó a la infección sistémica en *N. benthamiana*

Fig. 27 Vector de 3 genes

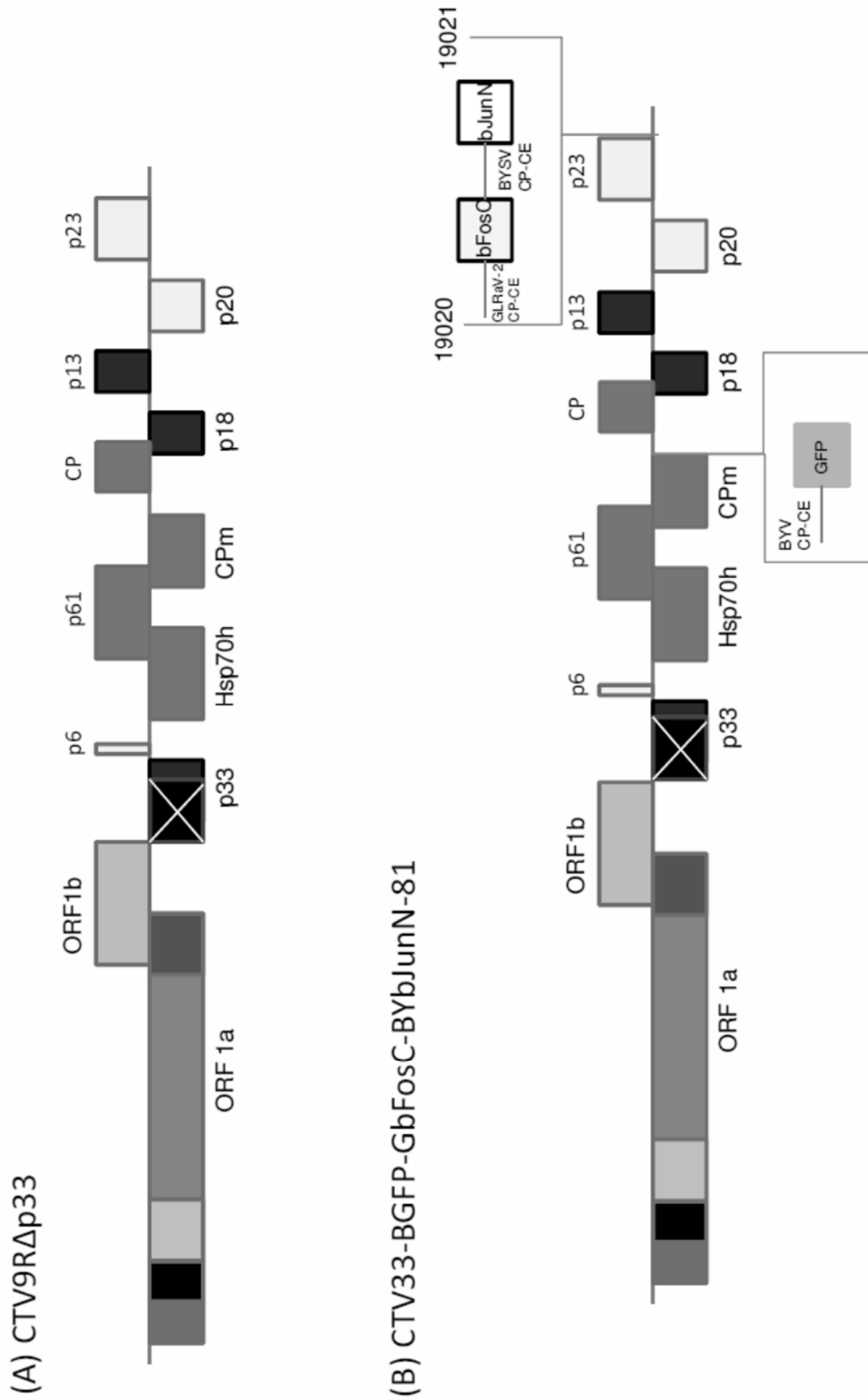
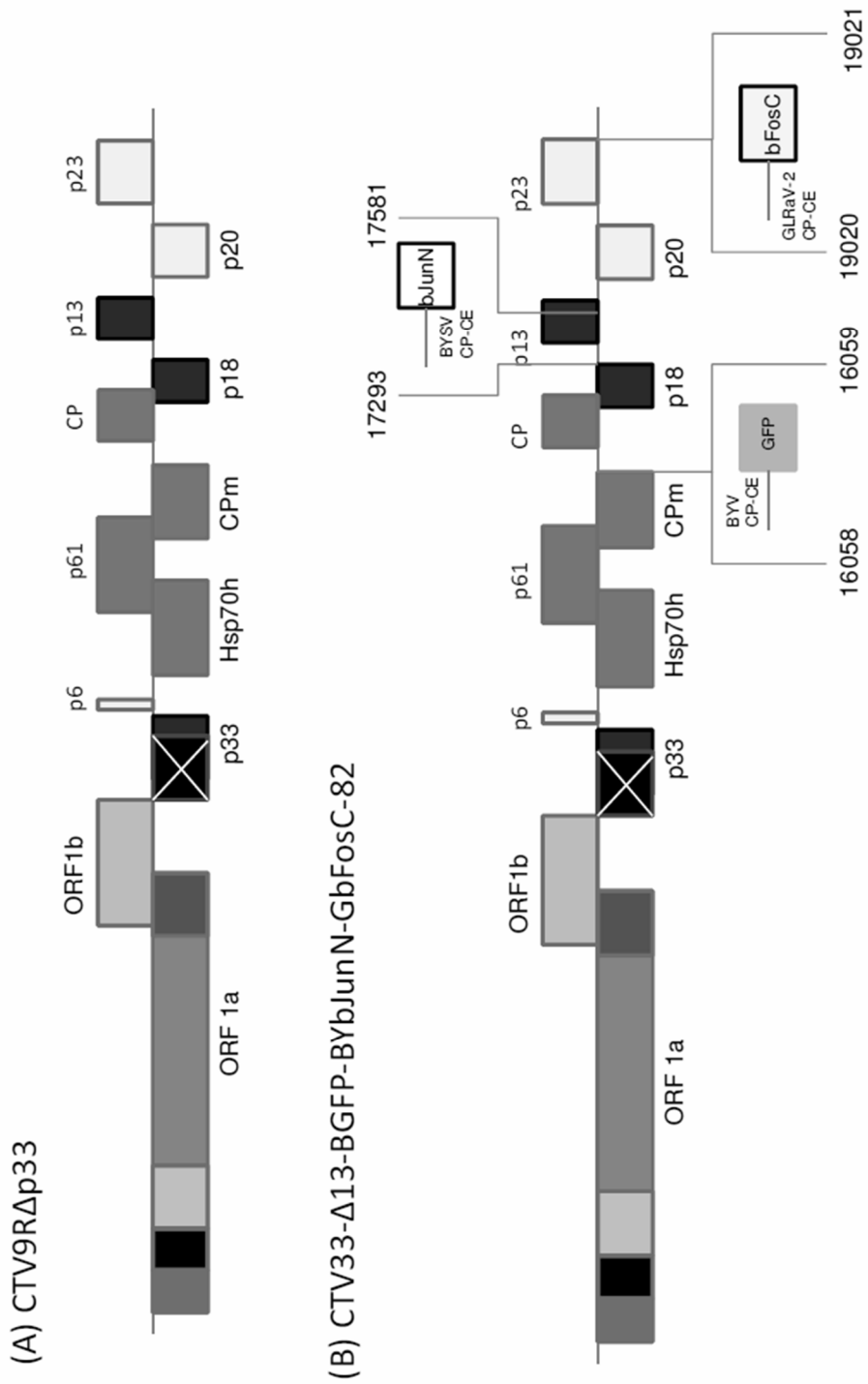


Fig. 28 Vector de 3 genes



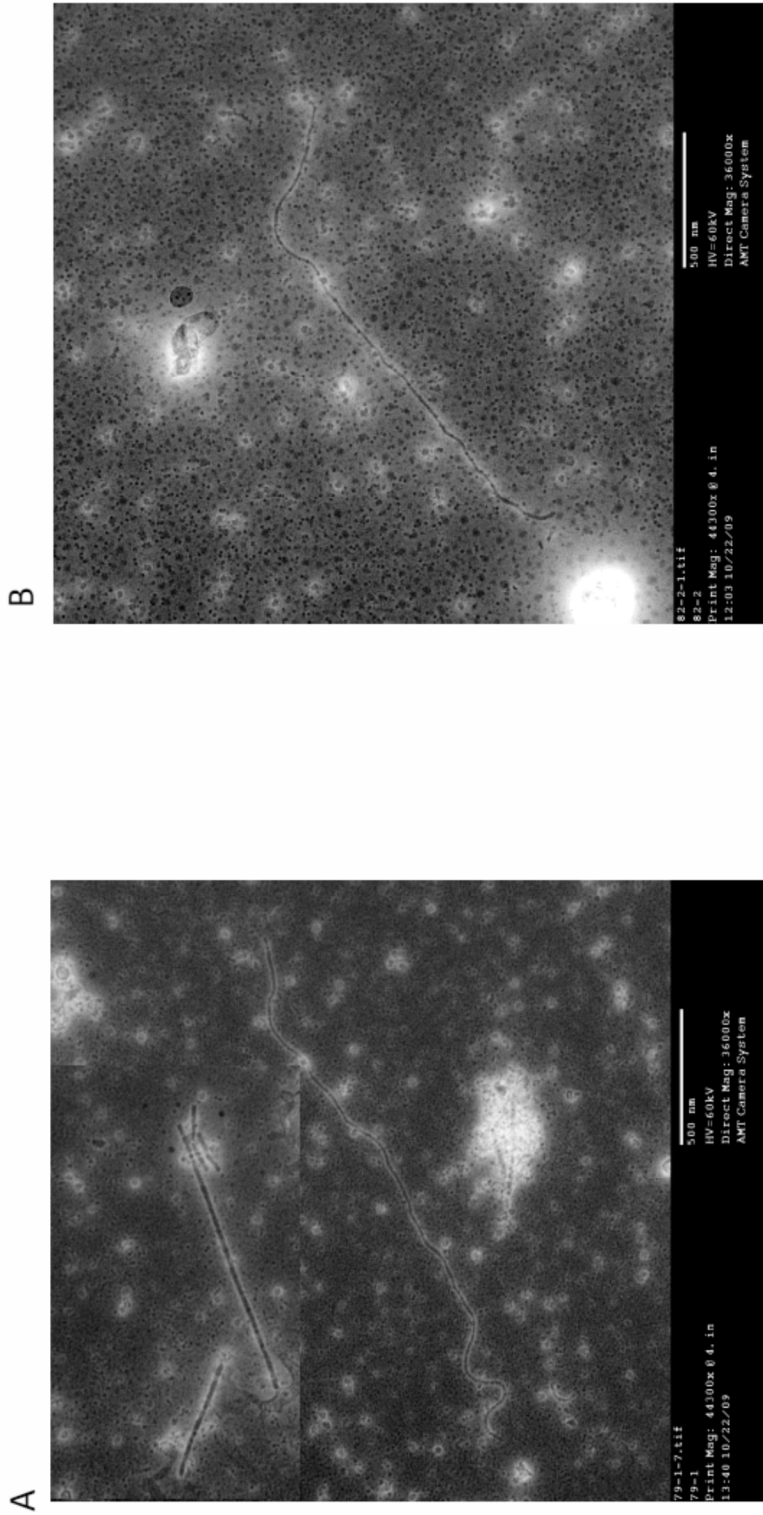


Fig. 29