

## Estabilidad de la hemaglutinina H5N1 del virus de la Influenza Aviar en semillas de tabaco

Yanaysi Ceballo\*, Alina López, Kenia Tiel, Osmany Ramos, Yamilka Rosabal, Carlos, E. González, Abel Hernández

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba, Apartado Postal: 11600.

yanaysi.ceballo@cigb.edu.cu

### Resumen

El almacenamiento de proteínas endógenas en semillas es importante para el éxito de la germinación y el crecimiento de las plantas. Esta propiedad ha sido adaptada y utilizada para producir proteínas heterólogas en este órgano teniendo en cuenta las ventajas que ofrece. En este estudio, se demostró la estabilidad de la hemaglutinina aviar H5N1 en semillas de *Nicotiana tabacum* L. almacenadas durante cinco años en diferentes condiciones de temperatura, sin afectarse los niveles de expresión y la germinación de las semillas transgénicas. Estos resultados muestran que las proteínas complejas se mantienen estables por largos períodos a temperaturas moderadas, constituyendo las semillas una fuente inmediata para la obtención de candidatos vacunales frente a diferentes enfermedades.

**Palabras clave:** Hemaglutinina, semillas, estabilidad, *Nicotiana tabacum*. L.

### Abstract

The storage of endogenous proteins in seeds is important for successful germination and plant growth. This property has been adapted and used to produce heterologous proteins in this organ considering the advantages it offers. In this study, the stability of avian hemagglutinin H5N1 was demonstrated in *Nicotiana tabacum* L. seeds stored for five years under different temperature conditions, without affecting the expression levels and germination of transgenic seeds. These results show that the complex proteins remain stable for long periods at moderate temperatures, making the seeds an immediate source for obtaining vaccine candidates against different diseases.

**Key words:** Hemagglutinin, seeds, stability, *Nicotiana tabacum*. L.

### Introducción

Las plantas son un sistema versátil para producir proteínas recombinantes. Entre las ventajas que ofrecen está el bajo costo de producción de la biomasa, la capacidad de acumular proteínas complejas con alto rendimiento y el bajo riesgo de contaminación con patógenos propios de animales y de humanos (Chan & Daniell, 2015; Marsian & Lomonossoff, 2016; Topp et al., 2016; Rage et al., 2020; Shanmugaraj et al., 2020). Las plantas de *Nicotiana tabacum* L. son ampliamente empleadas para la

producción de proteínas recombinantes (Conley et al., 2011; Khan et al., 2020; Mohammadi et al., 2020; Ruiz et al., 2020). Algunas de las ventajas que muestran son: la existencia de una metodología bien establecida de cultivo de tejidos y transformación genética, así como la posibilidad de cultivarlas en condiciones de contención (Tremblay et al., 2010; Varasteh-Shams et al., 2020). Otra ventaja importante de esta planta como biorreactor es que se trata de un cultivo no comestible que minimiza el riesgo del paso de las proteínas recombinantes a la cadena alimenticia (Matoba et al., 2011; Sedaghati et al., 2020).

Diferentes órganos de este cultivo como las hojas y las semillas son empleados con este fin (Shanmugaraj et al., 2020).

Las semillas, en particular, constituyen un sistema atractivo de expresión de proteínas debido a que almacenan estas moléculas en pequeños volúmenes y en ambientes estables (Stoger et al., 2002; Van Droogenbroeck et al., 2007; De Wilde et al., 2013; Murray-Hudson et al., 2014; Hernández et al., 2015; Vamvaka et al., 2016; Khan et al., 2020). Esta ventaja es posible por la existencia de un medio menos hidratado, que impide los procesos de hidrólisis y además la presencia de chaperonas e isomerasas que garantizan un plegamiento correcto de las proteínas (Müntz, 1998; Stoger et al., 2005; Urade, 2019; Balchin et al., 2020). Las semillas de *N. tabacum* cv BHmN son de pequeño tamaño, permitiendo que las proteínas alcancen altas concentraciones. El contenido de proteína es de aproximadamente 15-22% con respecto al peso fresco (Frega et al., 1991), lo cual justifica su empleo como fuente alternativa de proteína para la alimentación animal (Rossi et al., 2013). Se ha demostrado que los anticuerpos, antígenos vacunales y otras proteínas heterólogas pueden ser producidos en semillas, donde permanecen estables y funcionales durante varios años, incluso almacenados a temperatura ambiente (De Wilde et al., 2013; Vamvaka et al., 2016; Weichert et al., 2016; Dong et al., 2017). Específicamente, antígenos del virus de la influenza aviar (VIA), también se han producido en semillas (Nahampun et al., 2015; Ceballo et al., 2017), donde se confirmó que los animales inmunizados mostraron una respuesta protectora contra el VIA (Ceballo et al., 2018; Phan et al., 2020). Entre los principales antígenos del VIA, la hemaglutinina (HA) y la neuroaminidasa, constituyen los más inmunogénicos, aunque también se han expresados nucleoproteínas y proteína de la matriz, que confieren un efecto protector más amplio (Zheng et al., 2014; Kolpe et al., 2017; Yang & Liu, 2017; Kim et al., 2020).

La amenaza de una pandemia de gripe aviar ha enfatizado en la necesidad de medidas de prevención efectivas para combatir esta enfermedad. Una de las estrategias se basa en la vacunación, acompañada de medidas de bioseguridad

(Marangon et al., 2005; Ladman et al., 2019; Hautefeuille et al., 2020). Las vacunas comerciales existentes son predominantemente del tipo de virus completo inactivado y atenuado. Durante décadas, estas vacunas demostraron ser seguras y eficaces. Sin embargo, los procesos de producción, pueden ser inefectivos, cuando se requieren altas cantidades de dosis en el menor tiempo posible (Dai et al., 2019). Este aspecto se evidenció durante la pandemia de influenza H1N1 en el 2009.

En el presente estudio las semillas de tabaco que acumulan la HA del VIA, A/Vietnam/1203/04(H5N1), se almacenaron a diferentes temperaturas, demostrándose la estabilidad de la proteína almacenada durante cinco años en este órgano y sin afectar la germinación de dichas semillas. Estos resultados son de gran utilidad práctica, pues sugieren la posibilidad de disponer del antígeno de HA ante la aparición de una pandemia de gripe aviar.

## Materiales y métodos

### *Fuente y análisis de las semillas*

Los experimentos se realizaron con semillas transgénicas de *N. tabacum* cv. BHmN generación T1 de la línea I-13 (T1 I-13), productoras del dominio extracelular de la proteína HA del VIA referida por Ceballo et al. (2017). Las semillas cosechadas, treinta y cinco días después de la floración, en la parcela experimental del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), se almacenaron en diferentes condiciones de temperatura (T=4; T=28; T=37, T en °C) durante cinco años. Como control negativo (CN) se utilizaron semillas de igual variedad no transgénicas almacenadas bajo las mismas condiciones y por el mismo período de tiempo que las transgénicas. La cuantificación de la HA por ELISA y la visualización de las proteínas por SDS-PAGE y western blot se realizó según lo descrito por Ceballo et al. (2017).

### *Germinación de las semillas*

Las semillas CN y T1 I-13 almacenadas durante cinco años en diferentes condiciones se esterilizaron superficialmente con etanol al 70% durante

30 segundos. Posteriormente se incubaron en hipoclorito de sodio al 9% durante 10 minutos, para luego dar lavados sucesivos con agua destilada estéril (cinco veces). El experimento se diseñó con tres réplicas para cada combinación de almacenamiento. Cada réplica se conformó con 100 semillas cada una, sembradas en medio MS, Sigma, (Murashige & Skoog, 1962), suplementado con sacarosa 30 g/L, vitaminas MS 1 ml/L y agar 6,0 g/L en placas Petri. Las mismas fueron incubadas a 4 °C en la oscuridad durante tres días (estratificación) y seguidamente a 22 °C con un ciclo de 16 h de luz / 8 h de oscuridad. La germinación fue definida por la aparición de la radícula a través de la cubierta de la semilla y, posteriormente, de las primeras hojas verdaderas. El porcentaje de germinación se determinó a los doce días mediante el conteo de semillas germinadas con respecto al total de las semillas sembradas. Para la germinación de las semillas transgénicas cosechadas más recientemente (CNr) se siguió el mismo procedimiento.

## *Producción de semillas T4 de la línea*

### *I-13 en casas de cultivo protegido*

Las semillas T1 I-13 se sembraron en presencia de Kanamicina 30mg/L para obtener generaciones sucesivas hasta llegar a la T4, seleccionando en cada etapa las líneas con mayores niveles de acumulación de HA. Las plántulas resistentes al antibiótico, propiciando condiciones de crecimiento. Para evaluar la producción de

semillas, se trasplantaron 150 de estas plantas a parcelas de 5 m<sup>2</sup> se cultivaron en casas de invernadero su adaptación a las nuevas separadas por 1 m (marco de plantación de 5 plantas/m<sup>2</sup>) a la casa de cultivo protegido del CIGB de un área de 1320 m<sup>2</sup>, con luz natural y una temperatura promedio (28 ± 2 °C). La recolección de las semillas se llevó a cabo seis meses después de iniciado el semillero.

## *Análisis estadístico*

Las diferencias estadísticas en la cantidad de HA almacenada en diferentes temperaturas, cuantificada por ELISA, se determinó mediante el software estadístico GraphPad Prism v.6.0e (GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.). Se compararon los tratamientos mediante la prueba de Mann Whitney y se consideró significancia estadística para p < 0,05. La altura entre las plántulas transgénicas y las no transgénicas fueron analizadas mediante la prueba t de Student para p < 0,0001.

## **Resultados**

En el presente estudio se cuantificó la proteína HA de los extractos de semillas T1 I-13 almacenadas en diferentes condiciones de temperatura, demostrándose que no hubo diferencias significativas en la concentración del antígeno entre los distintos tratamientos, así como tampoco con relación a la HA\* (extracto de PTS de semillas transgénicas T1 I-13 conservado a -20 °C durante cinco años, referido por Ceballos et al. (2017) Figura 1.

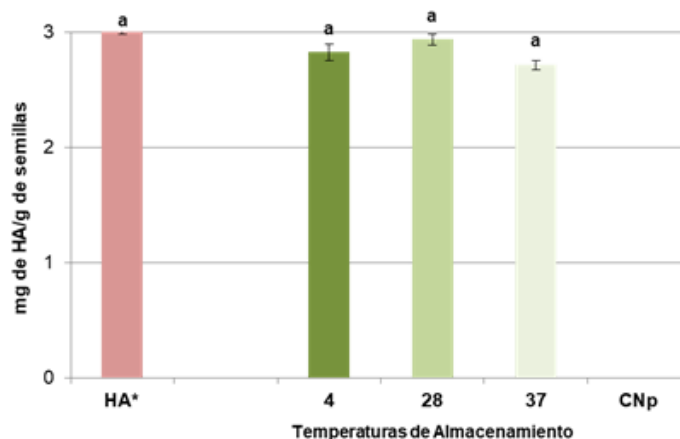


Figura 1. Análisis de la expresión de HA en semillas transgénicas de *N. tabacum* cv. BHMN, T1 I-13, almacenadas durante cinco años. En el ELISA se utilizó como anticuerpo primario un suero murino anti-HA1 y como anticuerpo secundario IgG anti ratón marcado con peroxidasa. HA\*: extracto de PTS de semillas transgénicas T1 I-13 conservado a -20 °C durante cinco años; 4, 28 y 37: extracto de PTS de T1 I-13 almacenado durante cinco años a diferentes temperaturas (T=4; T=28; T=37, respectivamente); CNp: mezcla de extractos de PTS de semillas no transgénicas almacenadas durante cinco años a T=4; T=28; T=37, usadas como control negativo. Las barras de error en el gráfico indican la desviación estándar. En el análisis de los datos con la prueba de Mann Whitney no se observaron diferencias estadísticamente significativas (misma letra) entre los tratamientos para p < 0.05.

La HA de T1 I13 se mantuvo estable en este órgano durante cinco años sin sufrir degradaciones detectables, como se evidencia mediante SDS-PAGE y western blot (Figura 2). La identidad de la proteína fue confirmada utilizando un anticuerpo monoclonal anti-HA1 (Figura 2b). Una banda de aproximadamente 65 kDa fue detectada, sugiriendo la presencia de la forma monomérica de HA en condiciones reductoras, al igual que en el extracto proteico de HA\*. En el caso de CNp (mezcla de extractos de PTS de semillas no transgénicas almacenadas durante cinco años a T=4; T=28; T=37) no se reconocieron proteínas en la inmunodetección.

Las semillas T1 I-13, almacenadas durante cinco años en diferentes temperaturas, mostraron al sexto día un retardo en el porcentaje de germinación con relación a las semillas CN, sin embargo a los doce días del ensayo, la germinación fue similar a éste. Entre los tratamientos se observó un mayor porcentaje germinativo a 28 °C durante el transcurso del experimento. Por otro lado, ocurrió un ligero retraso en la germinación de las semillas CN almacenadas

con respecto a las CNr (Tabla 1). No obstante, las plántulas transgénicas, independientemente de la temperatura de almacenamiento, no mostraron alteraciones morfológicas visibles entre ellas, pero se observó una marcada disminución en la talla de las mismas con relación a las de CN (Figura 3a y Tabla 2). Sin embargo, al cabo de tres meses ambos grupos de plantas alcanzaron un crecimiento semejante (Figura 3b).

Para evaluar la producción de semillas en la casa de cultivo protegido de la línea I-13 en la generación T4 se obtuvieron semillas de 140 plantas, lo que representa el 93.3 % del total sembrado. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3. El rendimiento de semillas por planta (g/planta) se situó en un rango de 2,5 a 23,6 g/planta, para un promedio de 6,25 g/planta y una producción total de 876 gramos. Es válido resaltar que el 54,2% de las plantas produjo más de 5 g/planta y 15 plantas produjeron más de 10 g/planta. La expresión de HA en esta generación T4 (datos no publicados) fue de aproximadamente 4 mg/g de semillas, lo que nos permitió acumular 3,4 g de HA para usos posteriores.

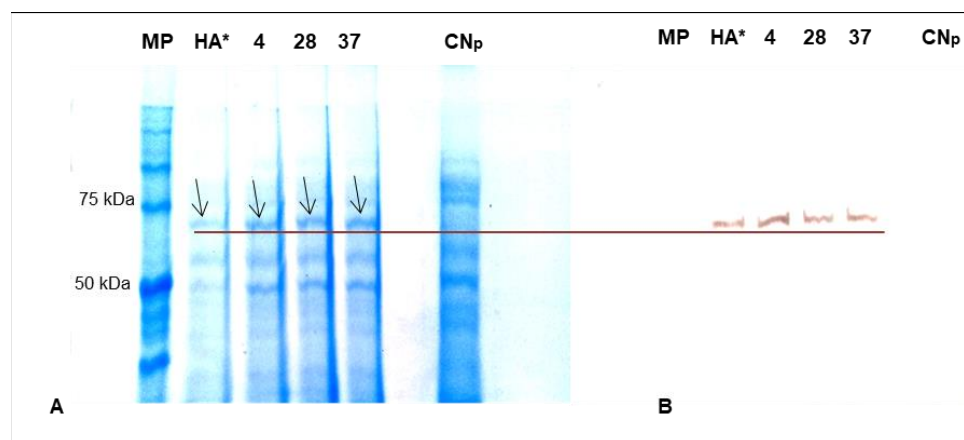


Figura 2. Caracterización de HA en semillas T1 I-13 de *N. tabacum* cv. BHMN, almacenadas durante cinco años en diferentes condiciones de temperatura. **A:** electroforesis SDS-PAGE al 9% con 15 µg de PTS de un extracto acuoso. **B:** detección por western blot de HA en presencia de un anticuerpo monoclonal contra HA1 conjugado con peroxidasa (CIGB Sancti-Spiritus). HA\*: extracto de PTS de semillas transgénicas T1 I-13 conservado a -20 °C durante cinco años; **4, 28 y 37:** semillas almacenadas durante cinco años a diferentes temperaturas (T=4; T=28; T=37); MP: Marcador de Peso Molecular Proteína de gama amplia (Promega, USA); CNp: mezcla de extractos de PTS de semillas no transgénicas almacenadas durante cinco años a T=4; T=28; T=37, usadas como control negativo. Las flechas indican una banda que se corresponde en talla con la proteína HA (aprox. 65kDa).

# Artículos

Tabla 1. Germinación de las semillas de *N. tabacum* cv. BHmN almacenadas durante cinco años en diferentes temperaturas.

Tratamientos	% Germinación (día 6)	% Germinación (día 12)
Semillas de plantas CNr	96	100
Semillas de planas CN (4°C)	90	95
Semillas de planas CN (28°C)	92	97
Semillas de planas CN (37°C)	90	93
Semillas transgénicas (4°C)	83	95
Semillas transgénicas (28°C)	89	100
Semillas transgénicas (37°C)	72	91

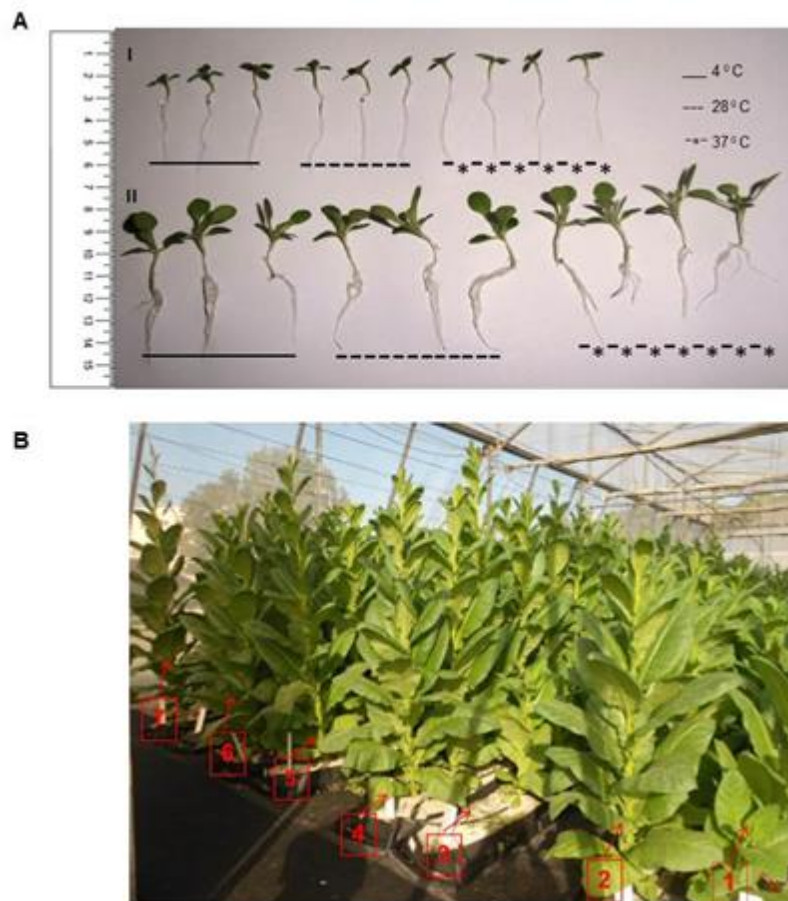


Figura 3. A: representación de germinados doce días post-siembra de las semillas de *N. tabacum* cv. BHmN almacenadas durante cinco años en diferentes temperaturas. I: obtención de plantas a partir de semillas transgénicas T1 1-13 almacenadas a T=4; T=28; T=37. II: obtención de plantas a partir de semillas no transgénicas almacenadas y germinadas bajo las mismas condiciones que las semillas transgénicas. B: plantas de *Nicotiana tabacum* cv. BHmN de tres meses de crecidas a partir de semillas almacenadas durante cinco años a diferentes temperaturas. 1, 2 y 3: plantas transgénicas obtenidas de semillas almacenadas que expresan la hemaglutinina aviar (de derecha a izquierda T=37, T=28 y T=4 respectivamente); 4, 5 y 6: plantas obtenidas a partir de semillas no transgénicas almacenadas (de derecha a izquierda T=37, T=28 y T=4 respectivamente); 7: plantas obtenidas a partir de semillas no transgénicas recién cosechadas. Las flechas indican el inicio de cada cantero.

# Artículos

Tabla 2. Comparación de la variable altura entre los grupos de plantas transgénicas y no transgénicas en cada temperatura (T) de almacenamiento. Se representa el promedio de la altura (h) medida en centímetros a los doce días post-germinado. Se seleccionaron 20 réplicas en cada temperatura para cada grupo de plantas. S.D: representa la desviación estándar de cada grupo. El análisis de los datos con la prueba t de Student mostró diferencias estadísticamente significativas (diferentes letras) entre los grupos de plantas para  $p < 0.0001$ .

Grupos de Plantas	h (T=4)	h (T=28)	h (T=37)	S.D
Transgénicas (T)	1.38 <sup>a</sup>	1.33 <sup>a</sup>	1.35 <sup>a</sup>	0.15927
No transgénicas	2.91 <sup>b</sup>	2.82 <sup>b</sup>	2.88 <sup>b</sup>	0.16223

Tabla 3. Producción de semillas de la línea I-13 generación T4 en casa de cultivos protegido.

Plantas sembradas	Plantas con semilla	Rendimiento promedio	Total semillas
150	140	6.25	876

## Discusión

Diversas especies de plantas se han utilizado para producir antígenos contra la influenza en semillas. Tal es el caso, de la nucleoproteína de la cepa H3N2 producida en semillas de maíz a niveles de 70 microgramos/gramo de semillas (Nahampun et al., 2015) y la HA producida en semillas de *N. tabacum* con niveles de acumulación superiores al 0.5% de PTS (Phan et al., 2014). En cambio, los 3 mg de HA por gramo de semillas de T1 I-13 obtenidos por Ceballos et al. (2017) continúa siendo el valor más alto informado para esta proteína producida en plantas. Este elevado nivel de expresión está en concordancia con los obtenidos para otras proteínas cuando utilizaron la combinación de promotor de  $\beta$ -faseolina, UTR y terminador de la proteína arcelina de frijol (Hernández et al., 2013; Hernández et al., 2015; Häkkinen et al., 2018).

Uno de los mayores beneficios de la producción de proteínas terapéuticas en semillas es la posibilidad de almacenarlas de forma activa durante largos períodos de tiempo (Fiedler & Conrad, 1995; da Cunha et al., 2019; Leite et al., 2019).

Nuestros resultados demostraron que las semillas T1 I-13 almacenadas durante cinco años mantuvieron niveles de HA semejantes a la HA\*, independientemente de las diferentes temperaturas de almacenamiento. Estos datos tienen gran importancia práctica, pues permiten acumular la biomasa para su uso posterior en caso de una emergencia relacionada con la gripe aviar. Estudios similares con relación a las proteínas recombinantes en semillas han demostrado que estas se mantienen estables durante años bajo diferentes condiciones de almacenamiento. Un ejemplo lo constituye la expresión de los multímeros de FLAG (proteína de la seda de la araña) acumulados en semillas de tabaco T1 durante un año, no afectando la concentración ni la estructura multimérica (Weichert et al., 2016). El fragmento de anticuerpo (scFv) en semillas de tabaco también se mantuvo estable durante un año (Fiedler & Conrad, 1995; Phillips et al., 1997). Asimismo, semillas de soya transgénica productoras del antígeno FanC y almacenadas por más de cuatro años a temperatura ambiente, no revelaron pérdidas detectables del antígeno (Oakes et al., 2009). La proteína endógena de semillas de

almendra, amandina, también se mantuvo estable durante diez años de almacenamiento aproximadamente (Su et al., 2017).

Por otra parte, la germinación de semillas no modificadas genéticamente almacenadas durante años ha sido ampliamente documentada en la literatura (Sano et al., 2020; Solberg et al., 2020). Se conoce, por ejemplo, que las especies de *Nicotiana* pueden mantener su capacidad de germinación durante diez años (Agacka et al., 2013). Según Lee et al. (2010), las semillas de tabaco mantienen su vigor y viabilidad mientras sus enzimas antioxidantes permanezcan activas. Sin embargo, semillas transgénicas de tabaco (F18 y VT2eB) mostraron retardo en la germinación con respecto a las semillas no transgénicas, justificándose por la interferencia del ADN exógeno en la germinación al modificar la maduración de la semilla (Onelli et al., 2017). Estos efectos también se apreciaron en las semillas T1 I-13 guardadas durante cinco años, las cuales mostraron, al inicio, un retraso en la germinación similar al informado por Depicker et al. (2005) para semillas transgénicas de *Arabidopsis*. Otro factor que puede incidir en la germinación es la temperatura de almacenamiento. En este sentido, la germinación de semillas T1 I-13 no se vio afectada en ninguna de las temperaturas probadas, siendo de 100 % en 28 °C a los doce días, superior con respecto a 4 y 37 °C (Tabla 1). En el caso de las semillas de *C. alata* almacenadas a bajas temperaturas (5 y 15 °C) también mantienen una germinación aproximadamente de 90% (Valverde-Rodríguez et al., 2019). Asimismo, semillas de *H. luteynii* tuvieron una alta germinación y viabilidad hasta los doce meses de almacenamiento a 10 °C (Uyaguari et al., 2019). Por tales razones pudiéramos deducir que la temperatura de almacenamiento de las semillas no tuvo relevancia en la germinación de estas especies. Un estudio de los patrones de expresión de proteínas de semillas de dos genotipos de trigo guardados durante diez años permitió concluir que la tolerancia de las semillas al almacenamiento se incrementa si éstas presentan una capacidad mayor para: (1) activar el sistema de defensa y prevenir el daño oxidativo;

(2) utilizar proteínas de almacenamiento para la germinación; (3) mantener el metabolismo energético para el suministro de energético (Chen et al., 2018).

Desde la década de los años 80, los sistemas de expresión basados en plantas han sido utilizados para el desarrollo de biofarmacéuticos, ya sea para humanos o para aplicaciones veterinarias, debido a las ventajas que ofrecen sobre los sistemas convencionales (Daniell et al., 2021). Las semillas específicamente, podrían ser una opción para la producción de vacunas o anticuerpos terapéuticos. Por tales razones, contar con un sistema de producción de plantas de tabaco bajo condiciones de cultivo confinado en el CIGB, permitiría sembrar tabaco durante todo el año (Mendoza et al., 2011) y obtener cantidades suficientes de biomasa de semillas productoras de HA. La densidad de siembra de 5 plantas/m<sup>2</sup>, en un sustrato inerte (zeolita), admitiría la siembra de 6600 plantas dos veces al año y una cosecha anual de aproximadamente 79 kg de semillas. En el caso específico de semillas productoras de HA, se pudieran almacenar en este órgano anualmente hasta 306,6 gramos de antígeno. Por otra parte, si las plantas además desarrollan hijos a partir de las yemas axilares que produzcan semillas, tendríamos mayores rendimientos. Tal como sucedió para las 15 plantas altas productoras de semillas (hasta 23 g) obtenidas en este estudio, una práctica agronómica que puede ser incorporada con vistas a incrementar la producción de semillas por planta. Además, la siembra debería realizarse en los meses más fríos en Cuba, puesto que los en los períodos más cálidos se exacerbaban los patógenos de plantas que inciden negativamente en los rendimientos de las cosechas.

Otra estrategia para aumentar los rendimientos sería el empleo de variedades de *N. tabacum* productoras de mayor número de semillas. La producción en cv. BHmN se estima aproximadamente en 0,6–1,1 t/ha (Patel et al., 1998; Usta, 2005), sin embargo, plantas de cv. Solari mostraron una productividad significativamente superior, de hasta 4,5 t/ha (Grisan et al., 2016).

## Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que el dominio extracelular de la proteína HA del VIA H5N1 se mantuvo estable en las semillas de *N. tabacum* cv. BHmN durante cinco años, independientemente de la temperatura de almacenamiento. Estos datos resaltan la posible utilidad de las semillas como fuente de reserva de hemaglutininas para su uso en candidatos vacunales y como parte de sistemas diagnósticos en la detección de animales enfermos ante una pandemia de Influenza aviar.

## Referencias

- Agacka M, Depta A, Börner M, Doroszewska T, Hay FR, Börner A (2013) Viability of *Nicotiana* spp. seeds stored under ambient temperature. *Seed Science and Technology* 41 (3):474-478.
- Balchin D, Hayer-Hartl M, Hartl FU (2020) Recent advances in understanding catalysis of protein folding by molecular chaperones. *FEBS Letters*.
- Ceballo Y, Lopez A, Tiel K, Hernandez A (2018) Plant-Produced Avian Influenza Antigens. In: *Prospects of Plant-Based Vaccines in Veterinary Medicine*. Springer, pp 189-208.
- Ceballo Y, Tiel K, López A, Cabrera G, Pérez M, Ramos O, Rosabal Y, Montero C, Menassa R, Depicker A (2017) High accumulation in tobacco seeds of hemagglutinin antigen from avian (H5N1) influenza. *Transgenic research* 26 (6):775-789.
- Conley AJ, Zhu H, Le LC, Jevnikar AM, Lee BH, Brandle JE, Menassa R (2011) Recombinant protein production in a variety of *Nicotiana* hosts: a comparative analysis. *Plant biotechnology journal* 9 (4):434-444.
- Chan HT, Daniell H (2015) Plant-made oral vaccines against human infectious diseases—are we there yet? *Plant biotechnology journal* 13 (8):1056-1070.
- Chen P, Shen Z, Ming L, Li Y, Dan W, Lou G, Peng B, Wu B, Li Y, Zhao D (2018) Genetic basis of variation in rice seed storage protein (Albumin, Globulin, Prolamin, and Glutelin) content revealed by genome-wide association analysis. *Frontiers in plant science* 9:612.
- da Cunha NB, Leite ML, Dias SC, Vianna GR, RECH FILHO E (2019) Plant genetic engineering: basic concepts and strategies for boosting the accumulation of recombinant proteins in crops. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- Dai X, Xiong Y, Li N, Jian C (2019) Vaccine Types. In: *Vaccines*. IntechOpen,
- Daniell H, Jin S, Zhu XG, Gitzendanner MA, Soltis DE, Soltis PS (2021) Green giant—a tiny chloroplast genome with mighty power to produce high-value proteins: history and phylogeny. *Plant biotechnology journal* 19 (3):430-447.
- De Wilde K, De Buck S, Vanneste K, Depicker A (2013) Recombinant antibody production in *Arabidopsis* seeds triggers an unfolded protein response. *Plant physiology* 161 (2):1021-1033.
- Depicker A, Sanders M, Meyer P (2005) *Transgene silencing. Plant epigenetics* OxfordAmeslowa: Blackwell Pub:1-32.
- Dong Y, Li J, Yao N, Wang D, Liu X, Wang N, Li X, Wang F, Li H, Jiang C (2017) Seed-specific expression and analysis of recombinant anti-HER2 single-chain variable fragment (scFv-Fc) in *Arabidopsis thaliana*. *Protein Expression and Purification* 133:187-192.
- Fiedler U, Conrad U (1995) High-level production and long-term storage of engineered antibodies in transgenic tobacco seeds. *Bio/technology* 13 (10):1090-1093.
- Frega N, Bocci F, Conte L, Testa F (1991) Chemical composition of tobacco seeds (*Nicotiana tabacum* L.). *Journal of the American Oil Chemists Society* 68 (1):29-33.

- Grisan S, Polizzotto R, Raiola P, Cristiani S, Ventura F, Di Lucia F, Zuin M, Tommasini S, Morbidelli R, Damiani F (2016) Alternative use of tobacco as a sustainable crop for seed oil, biofuel, and biomass. *Agronomy for sustainable development* 36 (4):55.
- Häkkinen S, Nuutila A, Ritala A (2018) Modifying seeds to produce proteins. In: *Proteins in Food Processing*. Elsevier, pp 413-441.
- Hautefeuille C, Azzouguen B, Mouchel S, Dauphin G, Peyre M (2020) Evaluation of vaccination strategies to control an avian influenza outbreak in French poultry production networks using EVACS tool. *Preventive Veterinary Medicine* 184:105129.
- Hernández A, López-Quesada A, Ceballo-Cámara Y, Cabrera-Herrera G, Tiel-González K, Mirabal-Ortega L, Pérez-Martínez M, Pérez-Castillo R, Rosabal-Ayán Y, Ramos-González O (2015) Tobacco seeds as efficient production platform for a biologically active anti-HBsAg monoclonal antibody. *Transgenic research* 24 (5):897-909.
- Hernández A, López A, Ceballo Y, Rosabal L, Rosabal Y, Tiel K, Pérez M, González EM, Ramos O, Enríquez G (2013) High-level production and aggregation of hepatitis B surface antigen in transgenic tobacco seeds. *Biotechnol Appl* 30:97-100.
- Khan MS, Joyia FA, Mustafa G (2020) Seeds as Economical Production Platform for Recombinant Proteins. *Protein and Peptide Letters* 27 (2):89-104.
- Kim K-H, Jung Y-J, Lee Y, Park BR, Oh J, Lee Y-N, Kim M-C, Jeeva S, Kang S-M (2020) Cross protection by inactivated recombinant influenza viruses containing chimeric hemagglutinin conjugates with a conserved neuraminidase or M2 ectodomain epitope. *Virology* 550:51-60.
- Kolpe A, Schepens B, Fiers W, Saelens X (2017) M2-based influenza vaccines: recent advances and clinical potential. *Expert review of vaccines* 16 (2):123-136.
- Ladman BS, Gelb Jr J, Sauble LA, Murphy MV, Spackman E (2019) Protection afforded by avian influenza vaccination programmes consisting of a novel RNA particle and an inactivated avian influenza vaccine against a highly pathogenic avian influenza virus challenge in layer chickens up to 18 weeks post-vaccination. *Avian Pathology* 48 (4):371-381.
- Lee YP, Baek K-H, Lee H-S, Kwak S-S, Bang J-W, Kwon S-Y (2010) Tobacco seeds simultaneously over-expressing Cu/Zn-superoxide dismutase and ascorbate peroxidase display enhanced seed longevity and germination rates under stress conditions. *Journal of Experimental Botany* 61 (9):2499-2506.
- Leite ML, Sampaio KB, Costa FF, Franco OL, Dias SC, Cunha NB (2019) Molecular farming of antimicrobial peptides: available platforms and strategies for improving protein biosynthesis using modified virus vectors. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 91.
- Marangon S, Capua I, Rossi E, Ferre N, Dalla Pozza M, Bonfanti L, Mannelli A (2005) The control of avian influenza in areas at risk: the Italian experience 1997–2003. *Avian influenza prevention and control Wageningen, The Netherlands: Springer*:33-39.
- Marsian J, Lomonosoff GP (2016) Molecular pharming—VLPs made in plants. *Current opinion in biotechnology* 37:201-206.
- Matoba N, Davis KR, Palmer KE (2011) Recombinant protein expression in Nicotiana. In: *Plant Chromosome Engineering*. Springer, pp 199-219.
- Mendoza O, Valdes R, Padilla S, Issac Y, Gavilan D, Lescaille Y, Avila Y, Mustelier Y, Rodriguez R, Gonzalez O (2011) Assessment of a *N. tabacum* L., variety using natural zeolite as substrate and confined conditions for consistent biomass, protein and plantibody production. *Journal of Agronomy* 10 (3):74-83.

- Mohammadi A, Niazi A, Aram F, Hassani F, Ghasemi Y (2020) Transformation of the L-Asparaginase II Gene to Potato Hairy Roots for Production of Recombinant Protein. *Journal of Crop Science and Biotechnology* 23 (1):81-88.
- Müntz K (1998) Deposition of storage proteins. *Plant molecular biology* 38 (1-2):77-99.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15 (3):473-497.
- Murray-Hudson M, Wolski P, Murray-Hudson F, Brown MT, Kashe K (2014) Disaggregating hydroperiod: components of the seasonal flood pulse as drivers of plant species distribution in floodplains of a tropical wetland. *Wetlands* 34 (5):927-942.
- Nahampun HN, Bosworth B, Cunnick J, Mogler M, Wang K (2015) Expression of H3N2 nucleoprotein in maize seeds and immunogenicity in mice. *Plant cell reports* 34 (6):969-980.
- Oakes JL, Bost KL, Piller KJ (2009) Stability of a soybean seed-derived vaccine antigen following long-term storage, processing and transport in the absence of a cold chain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89 (13):2191-2199.
- Onelli E, Moscatelli A, Gagliardi A, Zaninelli M, Bini L, Baldi A, Caccianiga M, Reggi S, Rossi L (2017) Retarded germination of *Nicotiana tabacum* seeds following insertion of exogenous DNA mimics the seed persistent behavior. *PLoS one* 12 (12).
- Patel J, Patel B, Chakraborty M (1998) Production potential and quality aspects of tobacco seed oil. *Tobacco Res* 24:44-49.
- Phan HT, Hause B, Hause G, Arcalis E, Stoger E, Maresch D, Altmann F, Joensuu J, Conrad U (2014) Influence of elastin-like polypeptide and hydrophobin on recombinant hemagglutinin accumulations in transgenic tobacco plants. *PLoS One* 9 (6).
- Phan HT, Pham VT, Ho TT, Pham NB, Chu HH, Vu TH, Abdelwhab EM, Scheibner D, Mettenleiter TC, Hanh TX (2020) Immunization with Plant-Derived Multimeric H5 Hemagglutinins Protect Chicken against Highly Pathogenic Avian Influenza Virus H5N1. *Vaccines* 8 (4):593.
- Phillips J, Artsaenko O, Fiedler U, Horstmann C, Mock HP, Müntz K, Conrad U (1997) Seed-specific immunomodulation of abscisic acid activity induces a developmental switch. *The EMBO Journal* 16 (15):4489-4496.
- Rage E, Marusic C, Lico C, Baschieri S, Donini M (2020) Current state-of-the-art in the use of plants for the production of recombinant vaccines against infectious bursal disease virus. *Applied Microbiology and Biotechnology*:1-10.
- Rossi L, Fusi E, Baldi G, Fogher C, Cheli F, Baldi A, Dell'Orto V (2013) Tobacco seeds by-product as protein source for piglets.
- Ruiz Y, Ramos PL, Soto J, Rodríguez M, Carlos N, Reyes A, Callard D, Sánchez Y, Pujol M, Fuentes A (2020) The M4 insulator, the TM2 matrix attachment region, and the double copy of the heavy chain gene contribute to the enhanced accumulation of the PHB-01 antibody in tobacco plants. *Transgenic Research*:1-16.
- Sano N, Rajjou L, North HM (2020) Lost in translation: Physiological roles of stored mrnas in seed germination. *Plants* 9 (3):347.
- Sedaghati B, Haddad R, Bandehpour M (2020) Transient expression of human serum albumin (HSA) in tobacco leaves. *Molecular biology reports* 47 (9):7169-7177.
- Shanmugaraj B, I Bulaon CJ, Phoolcharoen W (2020) Plant molecular farming: a viable platform for recombinant biopharmaceutical production. *Plants* 9 (7):842.
- Solberg SO, Yndgaard F, Andreasen C, Von Bothmer R, Loskutov IG, Asdal A (2020) Long-term storage and longevity of orthodox seeds: a systematic review. *Frontiers in Plant Science* 11:1007.

- Stoger E, Ma JK, Fischer R, Christou P (2005) Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants. *Current opinion in biotechnology* 16 (2):167-173.
- Stoger E, Sack M, Fischer R, Christou P (2002) Plantibodies: applications, advantages and bottlenecks. *Current Opinion in Biotechnology* 13 (2):161-166.
- Su M, Liu C, Roux KH, Gradziel TM, Sathe SK (2017) Effects of processing and storage on almond (*Prunus dulcis* L.) amandin immunoreactivity. *Food Research International* 100:87-95.
- Topp E, Irwin R, McAllister T, Lessard M, Joensuu JJ, Kolotilin I, Conrad U, Stöger E, Mor T, Warzecha H (2016) The case for plant-made veterinary immunotherapeutics. *Biotechnology advances* 34 (5):597-604.
- Tremblay R, Wang D, Jevnikar AM, Ma S (2010) Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. *Biotechnology Advances* 28 (2):214-221.
- Urade R (2019) Oxidative protein folding in the plant endoplasmic reticulum. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 83 (5):781-793.
- Usta N (2005) Use of tobacco seed oil methyl ester in a turbocharged indirect injection diesel engine. *Biomass and bioenergy* 28 (1):77-86.
- Uyaguari CP, Jiménez J, Marín F, Palomeque X (2019) Respuesta de semillas de tres especies nativas altoandinas a diferentes condiciones de almacenamiento. *Maskana* 10 (2):64-75.
- Valverde-Rodríguez K, Morales C-O, García E-G (2019) Germinación de semillas de *Crescentia alata* (Bignoniaceae) en distintas condiciones de temperatura, luminosidad y almacenamiento. *Revista de Biología Tropical* 67 (2 SUPL):S120-S131.
- Vamvaka E, Twyman RM, Murad AM, Melnik S, Teh AYH, Arcalis E, Altmann F, Stoger E, Rech E, Ma JK (2016) Rice endosperm produces an underglycosylated and potent form of the HIV-neutralizing monoclonal antibody 2G12. *Plant biotechnology journal* 14 (1):97-108.
- Van Droogenbroeck B, Cao J, Stadlmann J, Altmann F, Colanesi S, Hillmer S, Robinson DG, Van Lerberge E, Terry N, Van Montagu M (2007) Aberrant localization and underglycosylation of highly accumulating single-chain Fv-Fc antibodies in transgenic *Arabidopsis* seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (4):1430-1435.
- Varasteh-Shams M, Nazarian-Firouzabadi F, Ismaili A (2020) The direct and indirect transformation methods on expressing a recombinant Dermaseptin peptide in tobacco transgenic hairy root clones. *Current Plant Biology*:100177.
- Weichert N, Hauptmann V, Helmold C, Conrad U (2016) Seed-specific expression of spider silk protein multimers causes long-term stability. *Frontiers in plant science* 7:6.
- Yang J-R, Liu M-T (2017) Human infection caused by an avian influenza A (H7N9) virus with a polybasic cleavage site in Taiwan, 2017. *J Formos Med Assoc* 116 (3):210-212.
- Zheng M, Luo J, Chen Z (2014) Development of universal influenza vaccines based on influenza virus M and NP genes. *Infection* 42 (2):251-262.