

Bases moleculares de la interacción virus-planta: relación entre genes de defensa, ARNs pequeños y sintomatología

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,
Área Ciencias Agropecuarias*

Gabriela Conti

Lic. en Genética - Universidad Nacional de Misiones - 2005

Lugar de trabajo: Instituto de Biotecnología – INTA Castelar



FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis
Sebastián Asurmendi
Lic. en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Consejero de Estudios
Fernando Carrari
Ing. Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

JURADO DE TESIS

Director de tesis
Sebastián Asurmendi
Lic. en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

JURADO
Juan Carlos Díaz Ricci
Ingeniero Químico (Universidad Nacional de Tucumán)
Doctor en Ciencias (Universidad Nacional de Rosario)

JURADO
Luis Rogelio Conci
Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional de Córdoba)
Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Córdoba)

JURADO
Javier Palatnik
Lic. en Biotecnología (Universidad Nacional de Rosario)
Doctor (Universidad Nacional de Rosario)

Fecha de defensa de la tesis: 18 de Marzo de 2013

Agradecimientos

A la Escuela para Graduados Ing Agr Alberto Soriano, Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (EPG-FAUBA).

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICET) por las becas otorgadas.

Al Director del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias del INTA Castelar, Dr. Juan Carlos Salerno y a la Directora del Instituto de Biotecnología Dra. Elisa Carrillo.

Al Dr. Esteban Hopp, por su profunda influencia, constante apoyo y estímulo en el desarrollo de mi vocación científica y docente.

A mi Director de Tesis, Dr Sebastián Asurmendi, a quien debo gran parte de mi formación profesional, por su excelencia como orientador y consejero, por darme confianza, libertad para decidir y desarrollar ideas, que me permitieron adquirir un criterio científico del cual estoy muy conforme y sobre todo, por ser una excelentísima persona, que logró construir un día a día divertido y muy ameno.

A mi Consejero de Tesis, Dr Fernando Carrari, por su constante apoyo en el ámbito científico y docente.

A todos mis amigos y compañeros del Instituto, con quienes hemos logrado construir un espacio de trabajo muy agradable y estimulante, con un nivel de discusión científica de alta calidad y con quienes compartí cinco años de mi vida que quedarán colmados de buenos recuerdos

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

Publicaciones derivadas de la tesis:

Conti, G., Rodriguez, M.C., Manacorda, C.A. and Asurmendi, S. *Transgenic expression of TMV capsid and movement proteins modulate plant basal defense and biotic stress responses in Nicotiana tabacum*. **Molec Plant-Microbe Interact**, 2012, 25:10, 1370-1384.

Artículos publicados durante el transcurso de la tesis en conjunto con los miembros del grupo de investigación y colaboradores externos, en temas asociados a esta tesis:

Bazzini AA., Tohge T., Manacorda CA., **Conti G.**, Rodriguez MC., Villanueva S., Nunes-Nesi A., Fernie AR., Carrari F. and Asurmendi S. *Metabolic and miRNA profiling of Tobacco mosaic virus infected plants reveals biphasic temporal changes*. **PLoS One**. 2011, 6(12): e28466.

AA Bazzini, NI Almasia, CA Manacorda, VC Mongelli, **G Conti**, GA Maroniche, MC Rodriguez, AJ Distéfano, E Hopp, M del Vas and S Asurmendi. *Virus infection alters transcriptional activity of miR164a promoter in plants*. **BMC Plant Biology** 2009, 9:152.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. Enfermedades virales en plantas.....	2
1.2. Mecanismos de defensa en plantas.....	5
1.2.1. Inmunidad basal e innata.....	5
Inmunidad basal e innata en las infecciones virales.....	6
Especies reactivas de oxígeno (ERO), fitohormonas ácido salicílico (SA) y jasmónico (JA) en la defensa contra patógenos.....	7
ERO y SA en la defensa contra virus.....	8
Interacciones planta-virus compatibles.....	9
1.2.2. Silenciamiento génico post-transcripcional como mecanismo antiviral.....	9
Amplificación de la señal de silenciamiento génico.....	10
Supresión del silenciamiento génico.....	10
Relación entre ARNs pequeños endógenos e infecciones virales.....	17
1.3. Relación entre degradación de ARNs, silenciamiento antiviral y generación de síntomas.....	11
1.3.1. Deadenilación.....	12
1.3.2. Eliminación de la caperuza 5' (<i>decapping</i>).....	12
1.3.3. Degradación mediante exorribonucleasas 5'-3'.....	12
1.3.4. Degradación mediante exorribonucleasas 3'-5'.....	12
1.4. Expresión transgénica de proteínas virales en plantas.....	14
1.4.1. Resistencia derivada del patógeno.....	14
1.4.2. Expresión de proteínas de cápside viral (CP).....	15
1.4.3. Expresión de proteínas de movimiento (MP).....	16
1.4.4. Doble expresión de proteínas CP ^{T42W} y MP de TMV en <i>Nicotiana tabacum</i>	17
1.5. Objetivo general.....	19
1.5.1. Objetivos específicos.....	19
1.6. Hipótesis.....	20
1.7. Estructura de la Tesis.....	20
CAPÍTULO 2. Estudio de la expresión diferencial génica resultante de la co-expresión de CP ^{T42W} y MP en tabaco.....	22
2.1. Introducción.....	23
2.2. Material y métodos.....	23
2.2.1. Material vegetal utilizado.....	23
2.2.2. Extracción de ARN para análisis de microarreglos.....	23
2.2.3. Análisis de microarreglos.....	24
2.2.4. Extracción de ARN y confección de ADNc para RT-qPCR.....	24
2.2.5. Diseño de oligonucleótidos.....	24
2.2.6. Selección de genes de referencia para su utilización como control interno.....	26
2.2.7. Confección de RT-qPCRs, obtención y análisis de datos de expresión.....	26
2.3. Resultados.....	27

2.3.1 Perfil de expresión diferencial génica resultantes de la co-expresión de MP y CP ^{T42W}	27
2.3.2. Puesta a punto y estandarización de protocolo de RT-qPCR: Información mínima requerida para la publicación de experimentos de RT-qPCR (MIQE).....	30
2.3.3. Selección de genes de referencia para estudios de expresión génica mediante RT-qPCR.....	33
2.3.4. Validación de análisis de microarreglos mediante RT-qPCR.....	35
2.4. Discusión.....	37
2.5. Conclusiones.....	40
CAPÍTULO 3. Estudio del efecto de MP y CPT42W en la defensa basal e innata y en la respuesta a diferentes estreses bióticos.....	41
3.1. Introducción.....	42
3.2. Material y métodos.....	42
3.2.1. Tinciones histoquímicas para determinación de ERO y muerte celular en tejido foliar de tabaco.....	42
3.2.2. Determinación de ácido ascórbico total y ácido dehidroascórbico en tejido foliar de tabaco.....	43
3.2.3. Determinación de ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA).....	43
3.2.4. Procedimiento de infección con TMV.....	43
3.2.5. Transcripción <i>in vitro</i> de ARN de TMV.....	44
3.2.6. Procedimiento de inoculación con <i>Pseudomonas syringae</i>	44
3.2.7. Procedimiento de inoculación con <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	44
3.2.8. Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) para ensayos funcionales con el gen GMP1 en <i>N. benthamiana</i>	44
3.2.9. Análisis estadísticos.....	45
3.3. Resultados.....	45
3.3.1. Determinación de ERO y muerte celular.....	45
3.3.2. Determinación de ácido ascórbico total (ASC) y ascórbico reducido (DHA).....	46
3.3.3. Cuantificación relativa de genes implicados en balance redox y detoxificación de ERO.....	47
3.3.4. Determinación de ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA).....	49
3.3.5. Cuantificación relativa de genes implicados en respuesta a SA y JA.....	50
3.3.6. Evaluación de la respuesta de defensa desarrollada frente a infecciones con ARN desnudo de TMV.....	52
3.3.7. Evaluación de la respuesta de defensa desarrollada frente a infecciones con patógenos hemibiotróficos.....	54
3.3.8. Evaluación de la respuesta de defensa desarrollada frente a infecciones con patógenos necrotróficos.....	55
3.3.9. Evaluación del fenotipo desarrollado por el silenciamiento de GMP1 mediante la técnica de VIGS en <i>N. benthamiana</i>	56
3.3.10. Evaluación de la respuesta de defensa frente a TMV luego del silenciamiento de GMP1.....	58
3.4. Discusión.....	59
3.5. Conclusiones.....	63
CAPÍTULO 4. Estudio del efecto de MP y CPT42W sobre la vía de silenciamiento antiviral y mecanismos de degradación de ARN.....	65
4.1. Introducción.....	66

4.2.	Material y métodos.....	66
4.2.1.	RT-qPCR para detectar miARNs.....	66
4.2.2.	Agroinfiltración foliar de <i>Nicotiana benthamiana</i>	67
4.2.3.	Extracción de proteínas a partir de tejidos vegetales.....	67
4.2.4.	Detección fluorimétrica de GFP en tejidos vegetales.....	67
4.2.5.	Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) en <i>N. benthamiana</i>	106
4.2.6.	Extracción de ARN total, confección de ADNc y diseño de oligonucleótidos para RT-qPCR.....	68
4.2.7.	Análisis de expresión de ARNm por RT-qPCR.....	69
4.3.	Resultados.....	69
4.3.1.	Evaluación de los niveles relativos de acumulación de un set de miARNs.....	69
4.3.2.	Detección de alteraciones en el silenciamiento génico de ARN por la co-expresión de CP ^{T42W} y MP.....	71
4.3.3.	Determinación de niveles de expresión de genes involucrados en procesos de silenciamiento génico, degradación de ARNs y genes blanco de miARNs.....	73
4.3.4.	Estudio del impacto del silenciamiento de Rrp42 mediante la técnica de VIGS sobre el fenotipo de <i>N. benthamiana</i>	78
4.3.5.	Impacto del silenciamiento de Rrp42 en la acumulación de genes involucrados en silenciamiento y en un conjunto de miARNs de <i>N. benthamiana</i>	81
4.3.6.	Estudio del impacto del silenciamiento de Rrp41 y Rrp43 mediante la técnica de VIGS sobre el fenotipo de <i>N. benthamiana</i>	82
4.3.7.	Estudio del impacto del silenciamiento de Rrp41 y Rrp43 en la acumulación de miARNs en <i>N. benthamiana</i>	83
4.4.	Discusión.....	85
4.5.	Conclusiones.....	88
	CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES GENERALES.....	89
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 2

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos utilizados para la validación de los resultados obtenidos en el análisis de microarreglos.....24

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos diseñados para la selección de genes de referencia26

Tabla 3. Unigenes de tabaco diferencialmente expresados en MPxCP^{T42W}28

Tabla 4. Condiciones experimentales utilizadas para el análisis de expresión de genes mediante RT-qPCR.....31

CAPÍTULO 4

Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos diseñados para la confección de ADNc de miARNs y para la evaluación de su expresión por RT-qPCR.....67

Tabla 6. Secuencias de oligonucleótidos diseñados para el clonado de Rrp41, Rrp42 y Rrp43.....68

Tabla 7. Secuencias de oligonucleótidos diseñados para evaluación de expresión por RT-qPCR68

Tabla 8. Valores obtenidos luego de los análisis de datos de las RT-qPCRs de miARNs70

Tabla 9. Alineamiento de genes de la vía de ARN *decay*, PTGS y blancos de miARNs de *Nicotiana tabacum* y *Arabidopsis thaliana*.....74

Tabla 10. Valores obtenidos luego de los análisis de datos de las RT-qPCRs de genes implicados en ARN *decay* y PTGS.....76

Tabla 11. Valores obtenidos luego de los análisis de datos de las RT-qPCRs de genes blanco de miARNs.....77

Tabla 12. Valores obtenidos luego de los análisis de datos de las RT-qPCRs para confirmación del silenciamiento mediante VIGS.....80

Tabla 13. Valores obtenidos luego de los análisis de datos de las RT-qPCRs de genes implicados en ARN *decay*, PTGS y miARNs en plantas silenciadas Rrp42 y GMP1.....82

Tabla 14. Valores obtenidos luego de los análisis de datos de las RT-qPCRs para miARNs en plantas silenciadas para Rrp41 y Rrp43.....84

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1. Síntomas de la enfermedad del mosaico del tabaco en <i>Nicotiana tabacum</i>	3
Figura 1.2. Viriones de TMV.....	4
Figura 1.3. Esquema del ciclo viral del TMV en el citoplasma de una célula vegetal	5
Figura 1.4. Esquema en zig-zag, representativo de la amplitud de defensa.....	6
Figura 1.5. Papel de las hormonas en la respuesta de defensa.....	8
Figura 1.6. Fenotipos que presentan las plantas mutantes para componentes del ARN exosoma.....	13
Figura 1.7. Funciones de CP en la replicación viral y en la interacción planta-virus	15
Figura 1.8. Funciones de MP en la replicación viral y en la interacción planta-virus	16
Figura 1.9. Fenotipos asociados a la expresión de las proteínas virales MP y CP ^{T42W}	18
Figura 1.10. Análisis molecular de las líneas transgénicas de tabaco MP, CP ^{T42W} , MPxCP ^{T42W} , mp MCP ^{T42W} y controles SX.....	19

CAPÍTULO 2

Figura 2.1. Perfiles de expresión génica entre las tres réplicas biológicas de las líneas transgénicas MPxCP ^{T42W} y mp MCP ^{T42W*}	27
Figura 2.2. Perfiles estandarizados de expresión génica entre las tres réplicas biológicas de las líneas transgénicas MPxCP ^{T42W} y mp MCP ^{T42W*}	30
Figura 2.3. Evaluación de estabilidad de genes de referencia.....	35
Figura 2.4. Gráfico de análisis de expresión relativa obtenido mediante RT-qPCR	36

CAPÍTULO 3

Figura 3.1. Determinación de ERO mediante tinciones histoquímicas en tejido foliar de tabaco.....	46
Figura 3.2. Determinación de ácido ascórbico total y reducido (ASC y DHA).47	
Figura 3.3. Niveles de acumulación de CP de TMV en plantas de tabaco infectadas con TMV a 6 y 18 dpi	48
Figura 3.4. Niveles de expresión relativa de GMP1, cAPX1, CSD2 y AOX en tabacos de las líneas transgénicas.....	49
Figura 3.5. Niveles de acumulación de ácido salicílico y jasmónico en tejido foliar	50

Figura 3.6. Niveles de expresión relativa de genes involucrados en la respuesta a ácido salicílico	51
Figura 3.7. Efectos producidos por la infección con ARN desnudo de TMV...53	
Figura 3.8. Efectos de la infección con <i>Pseudomonas syringae pv tabaci</i>55	
Figura 3.9. Efectos causados por la infección con <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>56	
Figura 3.10. Efectos de la silenciamiento de GMP1 mediante VIGS sobre el desarrollo y la regulación redox de <i>Nicotiana benthamiana</i>57	
Figura 3.11. Efectos de la silenciamiento de GMP1 en la activación de respuestas de defensa contra tobamovirus (TMV y ORMV) en <i>N. benthamiana</i> y <i>A. haliana</i>59	
CAPÍTULO 4	
Figura 4.1. Gráfico representativo de los niveles relativos de acumulación de miARNs en plantas transgénicas	70
Figura 4.2. Niveles de expresión transitoria de GFP luego de agroinfiltraciones foliares en tabaco.....72	
Figura 4.3. Niveles de expresión transitoria de GFP luego de agroinfiltraciones foliares en tabaco ARN mensajero de GFP (mGFP) en las líneas transgénicas.....73	
Figura 4.4. Niveles de expresión relativa de genes implicados en la maquinaria de ARN <i>decay</i> y PTGS en las líneas transgénicas.....75	
Figura 4.5. Niveles de expresión relativa de genes blanco de miARNs en las líneas transgénicas.....78	
Figura 4.6. Efecto del silenciamiento de Rrp42 en el desarrollo y la morfogénesis de <i>N. benthamiana</i>80	
Figura 4.7. Niveles de expresión relativa de genes implicados en la maquinaria de PTGS y miARNs en las líneas de <i>N. benthamiana</i> silenciadas para Rrp42 y GMP1.....81	
Figura 4.8. Efecto del silenciamiento de Rrp41 y Rrp43 en el desarrollo y la morfogénesis de <i>N. benthamiana</i>83	
Figura 4.9. Niveles de expresión relativa de miARNs maduros en las líneas de <i>N. benthamiana</i> silenciadas para Rrp41 y Rrp43.....84	

ABREVIATURAS

Abs: absorbancia.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN desoxirribonucleico copia.

ARN: ácido ribonucleico.

At: *Arabidopsis thaliana*.

BrEt: bromuro de etidio.

CaMV: *Cauliflower mosaic virus*

CP: proteína de cápside viral (*coat protein*).

dpi.: días post inoculación

dpa.: días post agroinfiltración.

ELISA : del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*.

Fig.: figura.

GFP: proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*).

GUS: proteína β -glucuronidasa codificada por el gen reportero *uidA*

kDa: kilo Dalton.

mARN: ARN mensajero (*messenger RNA*).

miARN o miR: micro ácido ribonucleico (*micro RiboNucleic Acid*).

MP: proteína de movimiento viral.

MRCV: *Mal de Rio Cuarto Virus*

nm: nanómetros

nt: nucleótidos.

Nb : *Nicotiana benthamiana* de genotipo silvestre

ORF: marco abierto de lectura (del inglés: *open reading frame*).

Pb: pares de bases.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PLRV: *Potato leaf rolled virus*

PVY: virus Y de la papa; *Potato virus Y*.

PM: peso molecular.

PVX : virus X de la papa, *Potato virus X*.

p35S: promotor 35S del *Cauliflower mosaic virus*.

RDR: RNA polimerasa celular dependientes de ácido ribonucleico.

siARN: ácido ribonucleico de bajo peso molecular (18 a 24 nt).

ssARN: ARN de cadena simple (*single strand*).

TBSV: *Tomato bushy stunt virus*.

TCV: *Turnip crinkle virus*.

TEV: *Tobacco etch virus*.

TMV: *Tobacco mosaic virus*.

viARNs: siRNAs de origen viral.

RESUMEN

Los virus fitopatógenos producen alteraciones en el metabolismo y la fisiología de sus huéspedes provocadas principalmente por alteraciones en la expresión génica durante las infecciones. Numerosos cambios están asociados a respuestas de estrés y defensa y sus efectos secundarios son probablemente causantes de los síntomas. El uso de plantas transgénicas que expresan proteínas virales constituye un sistema útil para estudiar la complejidad de la interacción planta-virus. Con el fin de determinar patrones de expresión génica alterados, se emplearon líneas que expresan proteínas del TMV sin función supresora del silenciamiento: la proteína de cápsida mutada (CP^{T42W}), la proteína de movimiento (MP) y una línea co-expresante ($MP \times CP^{T42W}$) que mostró alteraciones morfológicas (semejantes a síntomas) y de acumulación de miARNs. Se realizó un microarreglo para detectar cambios transcripcionales asociados a la co-expresión de CP^{T42W} y MP, utilizando como control una línea isogénica con ambos transgenes silenciados y fenotipo normal ($mp \times cp^{T42W*}$). Se estudiaron procesos biológicos cuyos genes mostraron alteraciones por la co-expresión de CP^{T42W} y MP, focalizando en vías relacionadas a estrés oxidativo, inmunidad innata y vías degradación de ARN. Se demostró que CP^{T42W} y MP modularon la defensa innata de un modo complejo: MP parecería actuar como inductor de defensa, alterando los niveles de ERO y SA mientras que CP jugaría un rol antagónico, inhibiendo la expresión de PR-1 y RDR1. Por otro lado, estudios funcionales en vías de degradación de ARN, demostraron que genes componentes del ARN exosoma, inducidos por la expresión de MP y CP^{T42W} , estarían implicados en la alteración de miARNs y constituirían mecanismos alternativos subyacentes a la generación de síntomas en infecciones virales. Este trabajo constituye un importante aporte al entendimiento de los mecanismos de defensa antiviral y de producción de síntomas, proporcionando herramientas para diseñar nuevas estrategias biotecnológicas de control de virosis en cultivos de interés agronómico.

ABSTRACT

Phytopathogenic viruses produce alterations in the metabolism and physiology of their hosts, caused largely by changes in gene expression during infection. Most changes are associated to stress and defense responses and side effects probably end up causing disease symptoms. The use of transgenic plants expressing TMV proteins is a useful system for studying the complex plant-virus interaction. In this study we used transgenic tobaccos with the aim of studying alterations in gene expression and defense mechanisms. Lines that express viral proteins without silencing suppressor function were used: a mutated capsid protein (CP^{T42W}), a movement protein (MP) and a co-expressing line ($MP \times CP^{T42W}$); the latter showed morphological alterations (similar to some viral symptoms) and changes in the accumulation of miRNAs. We performed microarray analysis in $MP \times CP^{T42W}$ in order to study the differential gene expression patterns resulting from the co-expression of CP^{T42W} and MP. As a control we used an isogenic line with silenced transgenes and a normal phenotype ($mp \times cp^{T42W*}$). The biological processes linked to those genes whose expression was altered by CP^{T42W} and MP were selected. This study demonstrated that MP and CP^{T42W} produced stress phenotypes and modulated innate immune defense responses in a complex manner: MP seemed to act as a defense elicitor by impairing ROS production and inducing SA while CP could play an antagonistic role by inhibiting PR-1 and RDR1 expression levels. Furthermore, functional studies of RNA decay pathways showed that RNA exosome genes, induced by the expression of MP and CP^{T42W} in tobacco, were implicated in altering miRNAs and could constitute alternative mechanisms underlying the generation of viral disease symptoms. This work contributes to the understanding of antiviral defense mechanisms and symptoms production, providing potential tools for the design of new biotechnological strategies of viral control in agronomically important crops.

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN GENERAL

Las enfermedades asociadas a fitopatógenos producen una gran diversidad de síntomas y generan cuantiosas pérdidas en la producción de cultivos de importancia agropecuaria. Las reducciones en el rendimiento están asociadas a respuestas a estreses bióticos en sentido amplio. Por este motivo, entender la relación hospedante-patógeno y consecuentemente la producción de síntomas es de vital importancia para proponer estrategias antivirales efectivas o perfeccionar las que se están empleando en la actualidad. La búsqueda de resistencia genética es considerada de alta prioridad. Este tipo de resistencia es de especial importancia en el caso de las virosis debido a que la utilización de otro tipo de estrategias para su control es complicada, costosa y de impacto negativo en el medio ambiente. Frente a un crecimiento estructural de la demanda internacional de alimentos, las aplicaciones biotecnológicas han sido y siguen siendo claves para la ampliación de la producción agropecuaria sustentable.

Los virus fitopatógenos inducen diversas alteraciones metabólicas y fisiológicas que provocan probablemente los fenotipos sintomáticos de la enfermedad. Las interacciones planta-virus susceptibles resultan en la interferencia y/o competencia por los recursos del huésped. La expresión génica del huésped se altera durante el transcurso de una infección viral, produciendo reprogramaciones e interrupciones, que en su conjunto se denominaron “*shut off*” (Aranda y Maule, 1998; Havelda *et al.*, 2008) durante el cual una gran diversidad de genes implicados en numerosos procesos celulares, como señalización por fitohormonas, control del ciclo celular, transporte endógeno de macromoléculas, genes de pared celular y plástidos entre otros, son reprimidos (Whitham *et al.*, 2006; Pallas y Garcia, 2011; Shimizu *et al.*, 2007; Bazzini *et al.*, 2011). Gran parte de los cambios en la expresión génica característicos están asociados a estrés celular y defectos en el desarrollo (Whitham *et al.*, 2006), consecuentemente se los puede relacionar con las causas de la producción de los síntomas en las enfermedades.

Las plantas han desarrollado diferentes mecanismos de defensa frente al ataque de patógenos que forman un complejo y eficiente sistema inmune al funcionar de forma coordinada. Estos incluyen diferentes estrategias de defensa, entre ellas el sistema denominado basal o de inmunidad innata (por su homología con el sistema animal), que reconoce la presencia de un invasor y activa respuestas de defensa local y sistémica. A su vez, las plantas poseen estrategias de defensa mediadas por silenciamiento de ARNs. Este fenómeno se establece a partir del reconocimiento de un ARN de origen viral y la subsiguiente generación de sARNs (ARNs pequeños) que reducen la expresión de los ARNs virales. La activación y posterior acción de estas barreras de defensa traen consecuencias en el metabolismo que a su vez podrían ser las causas de la sintomatología generada por la infección. Los sistemas de defensa naturales de las plantas, aunque actualmente muy estudiados, todavía no son comprendidos en su totalidad y por este motivo, el estudio de la interacción planta-virus desarrollado en el presente trabajo no solo posee un amplio campo de aplicación en la producción agropecuaria sino también abre nuevos interrogantes en las ciencias agronómicas.

A continuación, se presenta una amplia revisión bibliográfica a los efectos de arrojar luz sobre los temas contenidos en esta tesis.

1.1. Enfermedades virales en plantas

En nuestro país, las enfermedades virales afectan a varios cultivos de importancia agronómica. Dos ejemplos de cultivos muy representativos que se ven afectados por virosis son la papa y el maíz.

Los principales virus que atacan a los cultivares de papa y provocan cuantiosas pérdidas son: el virus Y (PVY, de *Potato virus Y*), el virus X (PVX, de *Potato virus X*) y el virus del enrollamiento de la hoja de papa (PLRV, de *Potato leaf rolled virus*). Estos

virus pueden ser diseminados de muchas maneras, por tubérculos-semillas infectados, mediante el contacto con plantas infectadas o herramientas contaminadas o por vectores como insectos, nematodos y hongos. La forma de propagación agámica del tubérculo es la más utilizada por los productores y como consecuencia de este procedimiento se produce la acumulación de numerosos patógenos (especialmente virus). Una estrategia que permite controlar la incidencia de virosis es usar semilla de papa certificada que tiene un bajo contenido del virus. Esta estrategia es efectiva pero eleva sustancialmente los costos de la producción.

El virus del Mal de Río Cuarto (MRCV) es la enfermedad más importante del cultivo de maíz en Argentina y afecta también, pero en menor medida a cultivos de invierno como el trigo. Este virus ha ocasionado importantes pérdidas en el cultivo de maíz desde su aparición, en el Departamento de Río Cuarto, sur de Córdoba, en la década del sesenta (Nome *et al*, 1981). En la campaña 1996/97 afectó 300 mil ha, provocando pérdidas de aproximadamente 120 millones de dólares (Lenardon *et al* 1998). Luego, en la campaña 2006/2007 los ataques de este virus produjeron pérdidas que ascendieron a 70 millones de dólares (Lenardon *et al* 2007). Además de las pérdidas directas, la enfermedad tiene consecuencias indirectas derivadas de su control. Si bien existen híbridos de maíz con mayor tolerancia al virus, estos pueden infectarse igualmente.

Se han descrito innumerables enfermedades virales, cuyos agentes causantes se clasificaron de acuerdo a diferentes criterios. Desde 1990 (Milne, 1990) la clasificación de los distintos grupos virales se basa en: 1) la naturaleza del ácido nucleico que compone el genoma del virus (ADN o ARN), 2) el tipo de genoma (cadena simple o doble; polaridad positiva o negativa), 3) el número de moléculas que conforman el genoma (fragmentado ó no fragmentado), 4) la morfología de las partículas virales (envueltas, esféricas, geminadas, baciloformes, en forma de bastón, filamentosas, etc), 5) el mecanismo de transmisión (mecánica, por semillas, por polen o mediada por un organismo vector), y 6) el efecto citopático que produce (inclusiones, asociación con cloroplastos, núcleos, floema, etc), entre otras características.



Figura 1.1. Síntomas de la enfermedad del mosaico del tabaco en *Nicotiana tabacum*. NI corresponde a plantas de tabaco no inoculadas y TMV son plantas infectadas que desarrollan los síntomas de la infección.

En el presente trabajo se utilizaron virus pertenecientes al género Tobamovirus de la familia Virgaviridae, cuyo orden es no asignado (ICTV *International Comitee on Virus*

Taxonomy, 2011. <http://ictvonline.org>). Los miembros de este género son capaces de infectar a la mayoría de las Solanáceas (tomate, papa, tabaco, etc.), y algunos a la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (crucífera) (van Regenmortel *et al*, 2000). El miembro tipo de este género es el *Virus del mosaico del tabaco* (TMV). La infección en plantas de tabaco produce un mosaico característico en las hojas (Fig 1.1).

Los Tobamovirus son virus a ARN de cadena simple (ssRNA, *single strand*) positiva y no fragmentados. Es decir que su genoma está conformado por una única hebra de ARN. El genoma del TMV posee 6395 nucleótidos y codifica para un total de 4 proteínas: dos de ellas (126 kDa y 183 kDa) forman la replicasa viral, y las otras dos son la proteína de movimiento (MP) (30 kDa) y de cápside (CP) (17,5 kDa). Las proteínas de 126 y 183 kDa son traducidas a partir del ARN genómico. Se conocen dos ARNs subgenómicos a partir de los cuales se traducen por un lado la MP y por otro la CP (van Regenmortel *et al*, 2000). Los viriones constituyen partículas rígidas, alargadas, de 300 nm x 12 nm de diámetro (Fig 1.2).

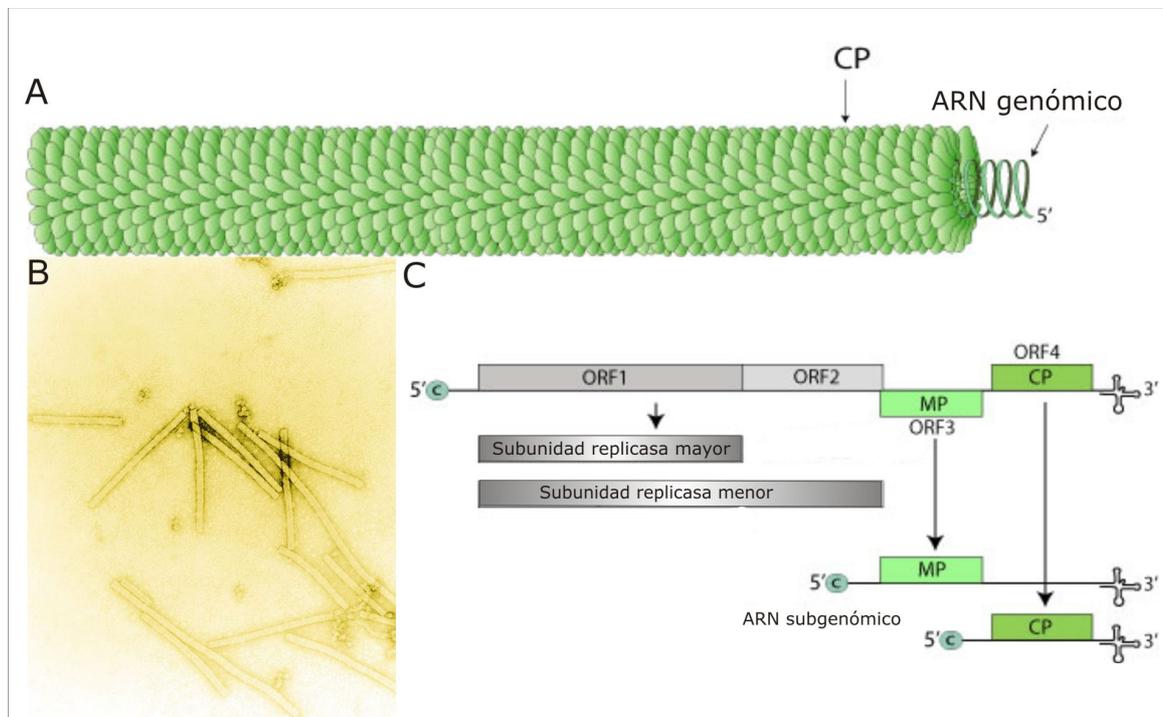


Figura 1.2. Viriones de TMV. A) Esquema tridimensional del virión de TMV. B) Viriones de TMV observados al microscopio electrónico. C) Genoma viral de TMV. Extraído de <http://viralzone.expasy.org/>.

Los Tobamovirus se transmiten fácilmente por inoculación mecánica. No se conocen insectos vectores y solo eventualmente se pueden llegar a transmitir por semilla (mediante la contaminación de la cubierta seminal). El ciclo viral comienza con la entrada del virus a la célula vegetal y el posterior desensamblado del virión en el citoplasma. A partir del ARN genómico se traducen las proteínas que componen la replicasa viral que se encarga de sintetizar la hebra complementaria. Su posterior traducción produce en primer lugar a la MP y luego a la CP (Fig. 1.3). Finalmente, el virus puede trasladarse desde la célula de ingreso a la célula contigua y así sucesivamente hasta alcanzar el sistema vascular y generar una infección sistémica. Este proceso puede demorar entre 5 a 10 días; en paralelo se acumula como virión (cadena positiva de ssARN envuelta en CP) en cada unas de las células infectadas.

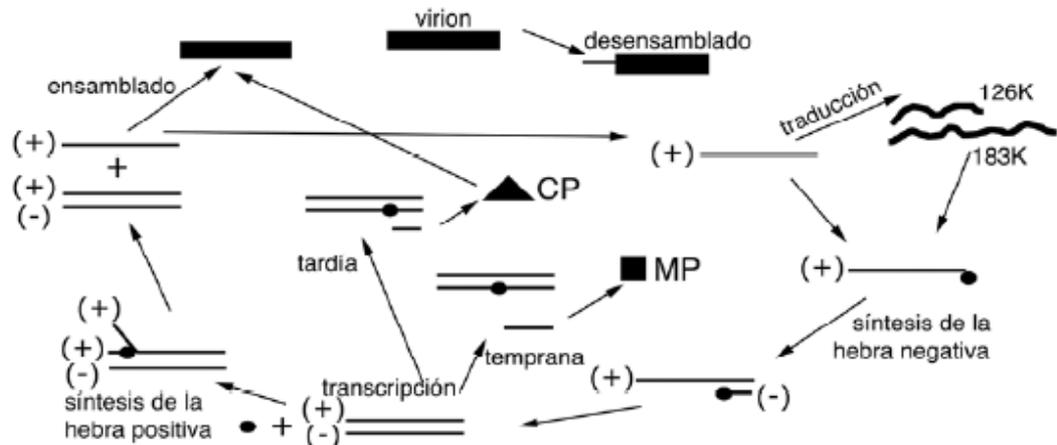


Figura 1.3. Esquema del ciclo viral del TMV en el citoplasma de una célula vegetal comenzando con el desensamblado viral y finalizando con la conformación del virión. El esquema está basado en el previamente descrito en el libro (Fernández Valiela, 1995). K= kDa.

1.2. Mecanismos de defensa en plantas

Las plantas están continuamente expuestas a un amplio espectro de patógenos, incluyendo virus, bacterias, hongos, oomycetes, nematodos. Cada uno de estos organismos establece una relación con la planta huésped que puede variar de acuerdo a la estrategia utilizada por cada patógeno y se clasifica generalmente en biotrófica, hemibiotrófica o necrotrofica (Glazebrook, 2005; Spoel *et al.*, 2007). Como respuesta, las plantas han desarrollado barreras estructurales y metabolitos antimicrobianos que impiden la enfermedad. Estas barreras no siempre son suficientes, por lo tanto las plantas activan otros mecanismos para limitar el ingreso de los patógenos, como el complejo sistema de inmunidad innata y el silenciamiento de ARNs en el caso de patógenos virales.

1.2.1. Inmunidad basal e innata

Las respuestas inmunes primarias permiten reconocer estructuras típicas de los patógenos como la flagelina, quitina, lipoproteínas y lipopolisacáridos (Gohre y Robatzek, 2008), comúnmente denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Jones y Dangl, 2006; Hou *et al.*, 2009; Zhang y Zhou, 2010). Los PAMPs activan proteínas receptoras denominadas PRRs (receptores de reconocimiento de patrón) quienes a su vez inducen diversos eventos de señalización que resultan en la activación de resistencia basal (PTI, inmunidad inducida por PAMPs) (Nomura *et al.*, 2005; Boller y He, 2009; Zipfel, 2009). En algunos casos los patógenos producen moléculas efectoras o elicitores específicos que son transportados al interior de las células del huésped y suprimen la PTI, promoviendo la virulencia o susceptibilidad inducida por efectores (ETS) (Fig. 1.4). Las plantas a su vez, como estrategia de contra-defensa expresan proteínas de resistencia (PRs) en respuesta al reconocimiento de los efectores (Edreva, 2005). Esta segunda barrera de inmunidad innata se denomina ETI (inmunidad inducida por efectores) (Chisholm *et al.*, 2006) (Fig 1.4).

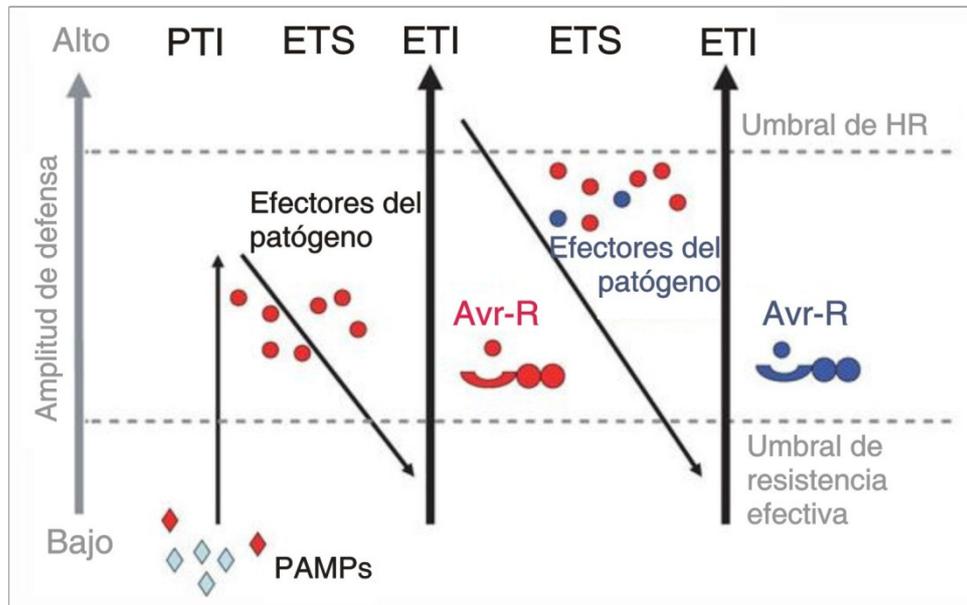


Figura 1.4. Esquema en zig-zag, representativo de la amplitud de defensa, donde la resistencia/susceptibilidad es proporcional a $[PTI - ETS + ETI]$. En la primera etapa, la planta detecta la presencia de PAMPs y activa PTI. A su vez, en la segunda etapa, el patógeno genera efectores que interfieren con PTI, dando lugar a ETS. Seguidamente, los efectores son reconocidos por proteínas de tipo NB-LRR activando ETI, una versión amplificadora de PTI que generalmente supera el umbral de respuesta hipersensible (HR). Aquellos patógenos que adquirieron nuevos efectores son capaces de suprimir ETI nuevamente y las plantas que contengan nuevas proteínas NB-LRR capaces de reconocerlos serán seleccionadas, provocando nuevamente ETI. Adaptado de Jones y Dangl (2006).

Dado que las proteínas que reconocen PAMPs y efectores muchas veces son comunes, al igual que los mecanismos de defensa desencadenados en respuesta al reconocimiento, se ha propuesto que la defensa de las plantas está determinada por receptores inmunes que reconocen ligandos del patógeno, determinando cierta amplitud de respuesta que indicará el nivel de inmunidad efectiva (Thomma *et al.*, 2011). Entre los mecanismos de inmunidad integrada involucrados en la defensa basal e innata (PTI y ETI respectivamente) se activan diversas respuestas de defensa que incluyen fortificación de la pared celular a través de la síntesis de celulosa y lignina, producción de metabolitos secundarios antimicrobianos como las fitoalexinas, producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) como moléculas señalizadoras e incremento de proteínas asociadas a patogénesis de diversa naturaleza (*pathogenesis related*, PRs), a saber: quitinasas, glucanasas, proteinasas, inhibidores de proteinasas, proteínas de tipo taumatina, ribonucleasas, peroxidasas, etc. (Nurnberger *et al.*, 2004; Edreva, 2005).

Inmunidad basal e innata en las infecciones virales

El silenciamiento de ARNs virales es una barrera primaria o basal de defensa de la planta huésped contra los efectores virales (ARN de doble cadena, dsARN o estructuras secundarias formadas por los virus) que evita la dispersión sistémica del virus (ver sección 1.2.2). Este dsARN o algún otro determinante de virulencia aun no caracterizado o VAMP (*Viral Associated Molecular Pattern*) desencadenaría respuestas de defensa basal como ya fue propuesto por (Ruiz-Ferrer y Voinnet, 2009; Bazzini *et al.*, 2011). Los virus a su vez producen nuevos determinantes de virulencia que podrían ser considerados efectores cuya función es suprimir la defensa basal (el silenciamiento). A estos se les denomina VSRs (supresores virales del silenciamiento de ARN) (revisado en 1.2.2) y no

sorprendentemente, las plantas despliegan a su vez un segundo sistema de defensa que reconoce y restringe el movimiento viral: las proteínas de resistencia R (Maule *et al.*, 2007; Palukaitis *et al.*, 2008), homologando esta etapa de respuesta la contradefensa a un sistema ETI. Es decir que el mismo esquema de zig-zag, efectivo contra infecciones bacterianas y fúngicas, podría ser aplicado a la defensa frente a infecciones virales (Chisholm *et al.*, 2006).

Especies reactivas de oxígeno (ERO), fitohormonas ácido salicílico (SA) y jasmónico (JA) en la defensa contra patógenos

El reconocimiento de un patógeno es seguido de un incremento local de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), se produce entonces un estallido oxidativo que culmina en algunos casos en la muerte celular programada (HR, respuesta hipersensible) en la zona de la invasión, a fin de mantener al patógeno invasor aislado del tejido circundante. Este tipo de reacción que involucra muerte celular es característico de muchas interacciones donde la infección no llega a desarrollarse (interacciones incompatibles) (Van Breusegem y Dat, 2006; Zurbriggen *et al.*, 2010). Una vez activadas las respuestas de defensa locales se desencadenan respuestas sistémicas, entre las cuales las más común es la denominada SAR (resistencia sistémica adquirida), que se caracteriza por ser duradera y de amplio espectro (Grant y Lamb, 2006). SAR consiste en la activación coordinada de numerosos genes PR y se la asocia con el incremento de los niveles de ácido salicílico (SA) (Thimm *et al.*, 2004; Jones y Dangl, 2006). Existen otros tipos de inducciones de defensa sistémica, por ejemplo el caso de ISR (resistencia sistémica adquirida, que suele ser desencadenada por la colonización de raíces con microorganismos benéficos y depende, como SAR, de señales de larga distancia que viajan a través del sistema vascular hacia tejidos sistémicos. Contrariamente, ISR suele estar regulada por vías dependientes de JA y etileno (ET) y no se encuentra asociada a la activación de genes PR (Pieterse *et al.*, 2009). Este trabajo profundiza el estudio de la defensa sistémica de tipo SAR. Durante su activación, la proteína NPR1 (*NON EXPRESSOR OF PR GENES 1*) es un regulador maestro de SAR, es considerado un receptor que interactúa directamente con SA y un transductor de señal que activa la expresión de proteínas PR (Dong, 2004; Mukhtar *et al.*, 2009; Maier *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012). La inducción de PR-1 es absolutamente dependiente de NPR1 y ácido salicílico. Por el contrario, la inducción de PR-2 (β -1,3 glucanasas), PR-5 (proteínas de tipo taumatina) y otros genes de defensa no requieren NPR1, sugiriendo que las vías de señalización que regulan la expresión de genes de defensa se diversifican luego de la inducción de SA (Nawrath y Metraux, 1999; Reuber *et al.*, 1998). SAR es además efectiva contra un amplio rango de patógenos y depende de una regulación fina entre un conjunto de fitohormonas, como ácido jasmónico (JA), etileno (ET) y ácido abscísico (ABA), siendo la interacción entre éstas fundamental para definir la especificidad de la respuesta de defensa (Pieterse *et al.*, 2009).

El tipo de respuesta (local ó sistémica) y la dependencia de una u otra hormona están determinados principalmente por el tipo de patógeno invasor. Por lo tanto, los patógenos biotróficos y necrotróficos generalmente desencadenan respuestas de resistencia reguladas por diferentes hormonas. El ácido salicílico promueve la resistencia contra patógenos biotróficos, mientras que las vías del etileno y del jasmónico son importantes para la resistencia contra patógenos necrotróficos (Spoel *et al.*, 2007). Estas dos vías (SA y JA) son generalmente antagónicas, es decir que la activación de una de ellas generalmente suprime la activación de la otra (Thaler *et al.*, 2012). El antagonismo entre esos dos compuestos se evidenció a través de los estudios de expresión de sus genes marcadores en mutantes deficientes en SA y JA de *Arabidopsis thaliana*. En las mutaciones que inhibían la señalización por JA se observaba la inducción del gen PR1

(marcador de SA) y en aquellas que afectaban la vía del SA aumentaba la expresión basal de PDF1.2 (marcador de JA) (Koornneef *et al.*, 2008; Leon-Reyes *et al.*, 2010). Sin embargo, luego de la aplicación de SA exógeno en bajas concentraciones, el gen PDF1.2, dependiente de JA aumentaba su expresión y a altas concentraciones de SA exógenos, éste reducía su expresión. Estos datos permitieron proponer que la interacción entre JA y SA es dependiente de dosis (Mur *et al.*, 2006). Por otra parte, plantas tratadas con SA o infectadas con un organismo hemibiotrófico, *Pseudomonas syringae*, inductor de respuesta mediada por SA, provoca mayor susceptibilidad a infecciones con patógenos necrotróficos, como *Alternaria brassicicola* debido a la supresión de la vía de señalización por JA (Spoel *et al.*, 2007) (Fig. 1.5). La interacción antagónica entre SA y JA depende parcialmente de NPR1, un regulador maestro de la señalización mediada por SA, aunque también responde a eventos de oxidación (Spoel *et al.*, 2007).

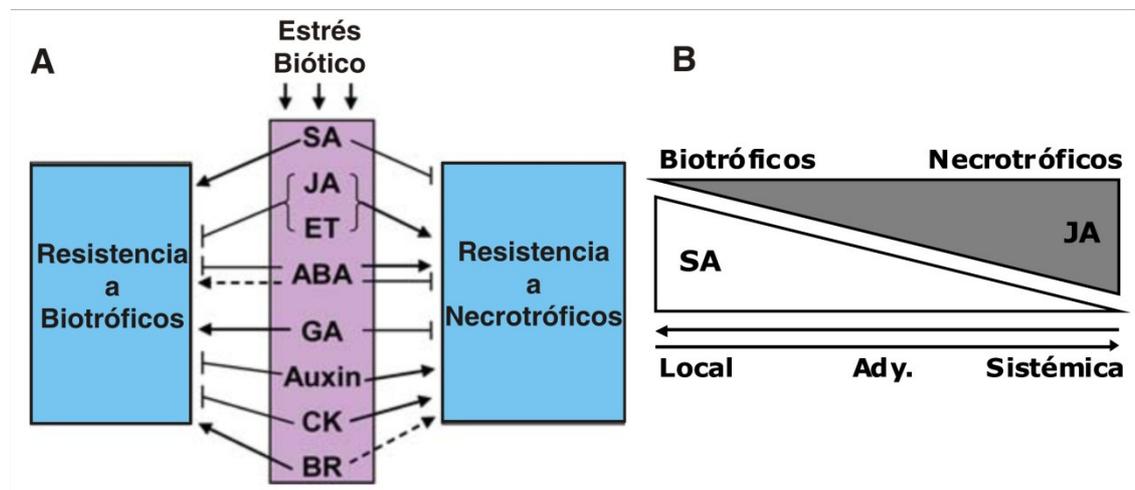


Figura 1.5. Papel de las hormonas en la respuesta de defensa contra patógenos. A) Esquema donde se muestra un modelo simplificado de la acción de diferentes fitohormonas en la regulación positiva o negativa de la resistencia a patógenos biotróficos y necrotróficos. Las flechas indican la activación o interacción positiva y las líneas truncadas indican represión o interacción negativa (Bari y Jones, 2009). B) Modelo propuesto para la interacción de las vías de defensa contra patógenos biotróficos y necrotróficos. Los primeros inducen señalización fuerte por SA en tejidos locales y adyacentes, disminuyendo en los tejidos sistémicos, mientras que la relación opuesta se manifiesta en los necrotróficos. Adaptado de Spoel *et al.* (2007).

ERO y SA en la defensa contra virus

El desarrollo de respuestas de defensa antivirales está caracterizado por la inducción de proteínas de choque térmico (HSP) (Aranda *et al.*, 1996; Jockusch *et al.*, 2001; Mayer, 2005), cambios en la expresión de numerosos genes involucrados en mecanismos de detoxificación de ERO, como catalasas, superóxido dismutasas, peroxidasas y otros genes relacionados al estado redox (Fodor *et al.*, 1997; Mittler *et al.*, 1998; Yi *et al.*, 1999; Riedle-Bauer, 2000; Li *et al.*, 2005). Las respuestas de defensa desencadenadas por acción de ERO están mediadas por la producción de ácido salicílico (SA), la inducción de genes PR y otros genes asociados a defensa (Thimm *et al.*, 2004; Jones y Dangl, 2006; van Loon *et al.*, 2006). Pese a que la inducción de genes PR está ampliamente asociada con respuestas de defensa, no existen evidencias de un rol directo de estas proteínas en la defensa antiviral (Cutt *et al.*, 1989; Linthorst *et al.*, 1989; Palukaitis *et al.*, 2008).

Love *et al.* (2005) sugirieron que los viriones de CaMV inducen respuestas similares a las desencadenadas por PAMPs en *Arabidopsis*. También se ha observado que la proteína de cápside de TMV induce la producción de ERO en células epidérmicas de tabacos susceptibles (Allan *et al.*, 2001). Se ha observado además que en plantas de tabaco resistentes a TMV, los niveles de SA son muy elevados en comparación con las susceptibles y esto presentó estrecho paralelismo con la expresión de genes PR (Malamy *et al.*, 1990). Por lo tanto, se podría postular que los virus tienen la capacidad de activar mecanismos de defensa innata en plantas, hipótesis ya planteada por Zvereva y Pooggin (2012) y demostrada a través del uso de un sistema de expresión transgénico del supresor viral AC2 en tabaco (Soitamo *et al.*, 2012).

Interacciones planta-virus compatibles

Las interacciones planta-patógeno donde la defensa de tipo PTI o ETI es efectiva, por tanto la planta resiste a la infección y la enfermedad no se desarrolla, son denominadas interacciones incompatibles y han sido ampliamente estudiadas. Por el contrario, poco se conoce acerca de las interacciones compatibles, aquellas donde la planta es susceptible y la enfermedad sí se desarrolla. En tabacos susceptibles, por ejemplo, se sabe que la aplicación exógena de SA inhibe la replicación de TMV provocando reducciones en la acumulación viral y retardos en la aparición de síntomas (Naylor *et al.*, 1998; Nie, 2006), esto sugiere que en interacciones compatibles el SA juega un rol en la activación de la defensa. También se ha demostrado que la biosíntesis de SA se induce levemente en este tipo de interacciones, sugiriendo que esta hormona está involucrada en la respuesta de defensa basal contra virus (Krecic-Stres *et al.*, 2005; Malamy *et al.*, 1990). Adicionalmente, en interacciones planta-virus compatibles, la expresión de una gran diversidad de genes de defensa se induce por vías de señalización dependientes de SA (Whitham *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005) y también se ha observado que el tratamiento de tabaco con SA restringe el movimiento de TMV en células epidérmicas (Murphy y Carr, 2002). No obstante, la complejidad de la reacción de la planta susceptible frente a infecciones virales compatibles, depende de varios aspectos, los requerimientos del virus, la defensa de la planta, factores de estrés de la planta, respuestas celulares y respuestas locales o sistémicas. Todos estos factores actuando en conjunto convierten este escenario en un complejo sistema, donde el entendimiento de las respuestas globales plantea un gran desafío.

1.2.2. Silenciamiento génico post-transcripcional como mecanismo antiviral

Una respuesta específica de defensa contra infecciones virales es el silenciamiento de ARN, un mecanismo que detecta la presencia de ARNs invasivos, como virus o retro elementos transponibles y los degrada de modo secuencia-específico (Mlotshwa *et al.*, 2008; Xie y Qi, 2008). En plantas el silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) es un mecanismo inducible y específico de degradación de ARN que evolucionó como sistema de defensa antiviral debido a que restringe la acumulación o la diseminación del virus en las células vegetales (Vance y Vaucheret, 2001; Voinnet, 2001; Baulcombe, 2004; Herr y Baulcombe, 2004). El PTGS puede ser desencadenado por la formación de estructuras de ARN de doble cadena (ARNdc) generadas durante la replicación viral o por estructuras propias de su ARN genómico. A su vez PTGS puede ser desencadenado eficientemente por transgenes nucleares que generan transcritos con estructura de ARNdc o que expresan niveles aberrantes de transcritos (Baulcombe, 2005). Cualquiera sea su origen, una vez formadas las estructuras de ARNdc, luego de ser reconocidas por ARNasas de tipo III similares a dicer (DCLs) son procesadas dando lugar a ARNs pequeños (sARNs, de *small RNAs*) de 21 a 25 nt de ambas polaridades. Los siARNs (*small interfering RNAs*) se asocian luego a un complejo enzimático endógeno

denominado RISC (*RNA induced silencing complex*) cuyo integrante más importante es la proteína Argonauta (actividad endoribonucleasa). Este complejo puede reconocer y actuar en *trans* dirigiendo la degradación específica de los ARNs desencadenantes del proceso (Tang, 2005; Joshua-Tor, 2006).

Amplificación de la señal de silenciamiento génico

Mediante la amplificación de la señal de silenciamiento, la planta es capaz de inmunizar tejidos aun no infectados. Las ARN polimerasas celulares dependientes de ARN (RDRs) aseguran esta respuesta, absolutamente necesaria para eliminar el virus. Las RDRs sintetizan ARNdc utilizando como templado ARN simple cadena (ssARN). Luego, estos nuevos ARNdc son clivados por diferentes DCLs para producir siARNs que amplifican la señal y son capaces de moverse sistémicamente. En plantas se expresan seis variantes de RDRs (RDR1–RDR6) (Wassenegger y Krczal, 2006). RDR1 ha sido implicada en la defensa contra virus dado que en estudios de resistencia contra TMV inducida por tratamiento con SA. Xie *et al.*, (2001) describieron que tanto infecciones con TMV como tratamientos con SA inducen la actividad y la expresión de RDR1 en tabaco (NtRDR1). La inhibición de NtRDR1 mediada por antisentido en tabaco genera plantas transgénicas más susceptibles a TMV (Xie *et al.*, 2001), suprime el silenciamiento de ARN en tabaco y genera susceptibilidad a infecciones virales en *N. benthamiana* (Ying *et al.*, 2010). Asimismo, la reducción de los niveles de expresión de RDR6 en *Nicotiana benthamiana* induce hipersusceptibilidad a diversos tipos de virus de plantas (Qu *et al.*, 2005) y está involucrada en la defensa frente a PVX en *N. benthamiana* evitando la dispersión sistémica del virus y su exclusión de meristemas apicales (Schwach *et al.*, 2005).

Supresión del silenciamiento génico

Ciertamente, si todas las estrategias mencionadas previamente no son capaces de limitar la infección viral, se podría sugerir que los virus manipulan la defensa estableciendo estrategias de contradefensa y de ese modo sobrepasan las barreras del huésped. Ha sido ampliamente documentado que los virus son capaces de superar el silenciamiento antiviral mediante la expresión de supresores del silenciamiento de ARN (VSRs, de *viral supresors of RNA silencing*) (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Beclin *et al.*, 1998; Brigneti *et al.*, 1998; Ding y Voinnet, 2007). Los supresores se unen a componentes de la maquinaria de silenciamiento de la planta e interfieren con su funcionamiento (Voinnet *et al.*, 1999; Vance y Vaucheret, 2001; Li y Ding, 2006). Se han identificado aproximadamente 30 VSRs de distintos virus, tanto de ARN como de ADN (Li y Ding, 2006; Qu y Morris, 2005; Wu *et al.*, 2010). La acción de los VSRs genera efectos secundarios sobre los mecanismos de silenciamiento de ARN endógenos. Estas alteraciones podrían explicar algunas manifestaciones de síntomas de las infecciones virales como las alteraciones en el crecimiento y desarrollo observadas en órganos y tejidos de las plantas como hojas, flores y frutos (Siddiqui *et al.*, 2008; Shimura y Pantaleo, 2011; Bazzini *et al.*, 2011).

Relación entre ARNs pequeños endógenos e infecciones virales

Los eucariotas multicelulares producen moléculas de ARN pequeños (de aproximadamente 19 a 28 nt) que silencian o regulan de manera específica genes, transposones y virus y son capaces de modificar la cromatina y la estructura del genoma. En plantas se conocen diferentes tipos de ARNs pequeños, clasificados de acuerdo a su origen, enzimas involucradas en su biogénesis y modo de acción. Entre ellos se encuentran los microARNs (miARNs), los ARNs pequeños interferentes (siARNs), los *trans-acting* siARNs (tasi-ARNs), los antisentidos naturales siARNs (nat-siARNs) y muchos otros aún no caracterizados.

Los miARNs se originan a partir de transcriptos endógenos que se pliegan sobre sí mismos dando lugar a estructuras de ARNdc (denominados pre-miARNs) (Bartel, 2004). Son procesados para producir una única cadena de miARN de pequeño tamaño (21-22 nt). La cadena complementaria, denominada miARN*, es degradada. Al igual que en la vía de los siARNs, la proteína AGO1 es responsable del clivaje de los ARNm blanco mediante la formación del complejo RISC (Vaucheret *et al.*, 2004). Adicionalmente, algunos miARNs de plantas son capaces de inhibir la traducción de los ARNm blanco uniéndose a los extremos 3' no codificantes de los mismos de manera similar a lo que ocurre con los miARNs de animales (Huntzinger e Izaurralde, 2011). En plantas, los ARNs blanco de los miARN codifican para una amplia variedad de factores de transcripción involucrados en la identidad y mantenimiento de meristemas, en la división celular, la señalización hormonal y el desarrollo de la planta (Anderson *et al.*, 2004; Palatnik *et al.*, 2003; Rhoades *et al.*, 2002) o cambian su abundancia en respuesta al frío o la salinidad (Sunkar y Zhu, 2004; Allen *et al.*, 2004; Mallory y Vaucheret, 2004; Bartel, 2004; Rhoades *et al.*, 2002). Múltiples evidencias sugieren que los supresores del silenciamiento viral (VSRs) no solamente afectan a la vía de los siARNs sino también a la vía de los miARNs (Chapman *et al.*, 2004; Anderson *et al.*, 2004; Brodersen *et al.*, 2008; Bendahmane *et al.*, 2007; Schott *et al.*, 2012). Esto no resulta sorprendente dado que ambas vías tienen algunos elementos en común. A su vez, como resultado del efecto de los supresores sobre la vía de los miARNs se producen defectos de desarrollo (Zhang *et al.*, 2006; Siddiqui *et al.*, 2008).

Además de los VSRs, los virus producen gran variedad de respuestas en las células huéspedes mediadas por la perturbación de diferentes vías de señalización.

1.3. Relación entre degradación de ARNs, silenciamiento antiviral y generación de síntomas

El reciclado de ARN es un proceso determinante de la estabilidad para todas las moléculas de ARN. Las células requieren la eliminación constante de moléculas aberrantes y la reposición de productos residuales resultantes del procesamiento del ARN. En plantas es un paso muy importante en el control de la expresión génica. Los virus expresan VSRs como estrategia de contradefensa que detiene el silenciamiento de ARN antiviral. De modo alternativo, los virus podrían alterar la maquinaria de reciclado de ARN, ya que cuando ingresan a las células del huésped activan la maquinaria de transcripción alterando el balance de ARNs estables y aberrantes (Christie *et al.*, 2011). En levaduras se han estudiado ampliamente dos vías de degradación de ARNs mensajeros. En la primera, luego de la eliminación de la caperuza 5' (*decapping*), el mensajero es degradado por una exorribonucleasa que hidroliza en dirección 5'-3' denominada Xrn1p ((Muhlrad y Parker, 1994). La segunda vía de degradación ocurre en sentido 3' - 5' y está dirigida por un complejo de exonucleasas denominado exosoma (Anderson y Parker, 1998). En ambos casos, el paso inicial y limitante es la remoción de la cola poli(A) en el extremo 3' del transcripto (deadenilación). La información acerca de las vías de degradación de ARNs en organismos multicelulares es limitada con respecto a las levaduras. Considerando que muchos componentes de la maquinaria de degradación de ARNs deberían estar conservados entre organismos eucariotas, en plantas se han identificado diversas enzimas correspondientes a estas dos vías similares a las de levaduras. Sin embargo, el análisis de algunas enzimas involucradas en la degradación de ARNs mensajeros de *Arabidopsis* rebeló relaciones entre esta vía y el silenciamiento génico, así como un rol en procesos del desarrollo y respuestas a hormonas (Chiba y Green, 2009).

En plantas, al igual que en levaduras, los mecanismos generales de degradación de ARNs mensajeros comprenden varias etapas. Inicialmente la deadenilación de los transcritos a ser degradados y luego la eliminación de la caperuza 5'. En ambas etapas se han identificado los genes responsables de catalizar estos procesos y otros genes reguladores (Belostotsky y Sieburth, 2009).

1.3.1. Deadenilación: en levaduras se han descrito dos complejos responsables del acortamiento o eliminación de los extremos poli(A) en los transcritos, un complejo llamado Caf1p (Tucker *et al.*, 2001) y otro complejo de unión a extremos poli(A) (PABP) (Lowell *et al.*, 1992). En plantas se han detectado numerosos homólogos potenciales, entre los cuales CaCAF1 (*Capsicum annum* CAF1) muestra fenotipos particulares en las mutantes de pérdida de función y en tomate, la sobreexpresión de este gen mostró incrementos en el crecimiento y la resistencia a patógenos (Sarowar *et al.*, 2007).

1.3.2. Eliminación de la caperuza 5' (decapping): en levaduras y eucariotas multicelulares este proceso es catalizado por un complejo de dos subunidades, Dcp1 y Dcp2 (Shyu y Chen, 2010). En *Arabidopsis* se han aislado los genes *DECAPPING 1* (AtDCP1), *DECAPPING 2* (AtDCP2) (Iwasaki *et al.*, 2007) y *VARICOSE* (VCS) (Goeres *et al.*, 2007). La acción de este mecanismo se ha descrito en agregados citoplasmáticos denominados *p-bodies* (*processing bodies*) y en gránulos de estrés, donde se acumulan ARN mensajeros cuya traducción está detenida (Balagopal y Parker, 2009; Xu y Chua, 2011).

1.3.3. Degradación mediante exorribonucleasas 5'-3': las levaduras poseen dos componentes, Xrn1p (citoplasmático) y Xrn2p (de localización nuclear). En *Arabidopsis* se han identificado tres miembros de la familia XRN, todos ellos con actividad exonucleasa 5'-3'. Entre ellos, AtXRN4, el más estudiado y adicionalmente AtXRN2 y AtXRN3. Mediante la estrategia de genética reversa y análisis de microarreglos se han identificado muy pocos transcritos degradados por acción de AtXRN4. Sorprendentemente, los sustratos descritos incluyen productos del clivaje por acción de miARNs (Souret *et al.*, 2004; German *et al.*, 2008). También se ha descrito que AtXRN4 regula negativamente el silenciamiento de transgenes sin caperuza, es decir, elimina los sustratos de las RDRs inhibiendo la amplificación del silenciamiento (Gazzani *et al.*, 2004). Al igual que AtXRN4, AtXRN2 y AtXRN3 también funcionan como supresores endógenos del silenciamiento inducido por transgenes, probablemente mediante la degradación de ARNs correspondientes a transgenes aberrantes. Adicionalmente, AtXRN2 y 3 cumplen un rol en el proceso de maduración de miARNs, a través de la degradación de los bucles (*loops*) derivados de los precursores (Gy *et al.*, 2007). Finalmente, se ha descrito un rol para la AtXRN4 en la respuesta a etileno, ya que en *Arabidopsis* se ha identificado un componente denominado *Ethylene-Insensitive 5* (EIN5) y corresponde exactamente a AtXRN4 (Olmedo *et al.*, 2006).

1.3.4. Degradación mediante exorribonucleasas 3'-5': La degradación de ARN en sentido 3'-5' ocurre en un complejo de exonucleasas denominado exosoma (Mitchell *et al.*, 1997). El exosoma es un complejo multiproteico responsable de la degradación exonucleolítica 3' - 5' tanto en el núcleo como en el citoplasma. En levaduras el exosoma consiste en una región central compuesta por numerosas subunidades (Rrp41p, Rrp42p, Rrp43p, Rrp45p, Rrp46p y Mtr3p) junto a otras proteínas asociadas requeridas para ejercer su función. Las seis subunidades mencionadas de la región central, muestran homología al dominio catalítico ARNasa PH del exosoma de bacterias y existen otras tres

subunidades (Rrp40p, Rrp4p y Csl4p) que muestran homología con las proteínas de unión a ARN S1 y KH. En conjunto, estas nueve unidades forman una estructura en forma de anillo. En *Arabidopsis* se han identificado numerosas proteínas componentes del exosoma. Dos de ellas, AtRRP41 y AtRRP4 han sido caracterizadas en detalle. La primera es una exorribonucleasa fosforolítica que complementa los defectos en el procesamiento de ARN ribosomal 5.8S y en la degradación 3'-5' observados en las levaduras deficientes de Rrp41p (Chekanova *et al.*, 2000). AtRRP4 también es una exorribonucleasa 3'-5' hidrolítica que interacciona físicamente con AtRRP41 (Chekanova *et al.*, 2002). Los análisis de mutantes para AtCSL4, AtRRP41 y AtRRP4 en *Arabidopsis* revelaron diferentes funciones para cada subunidad del exosoma (Fig. 1.6).

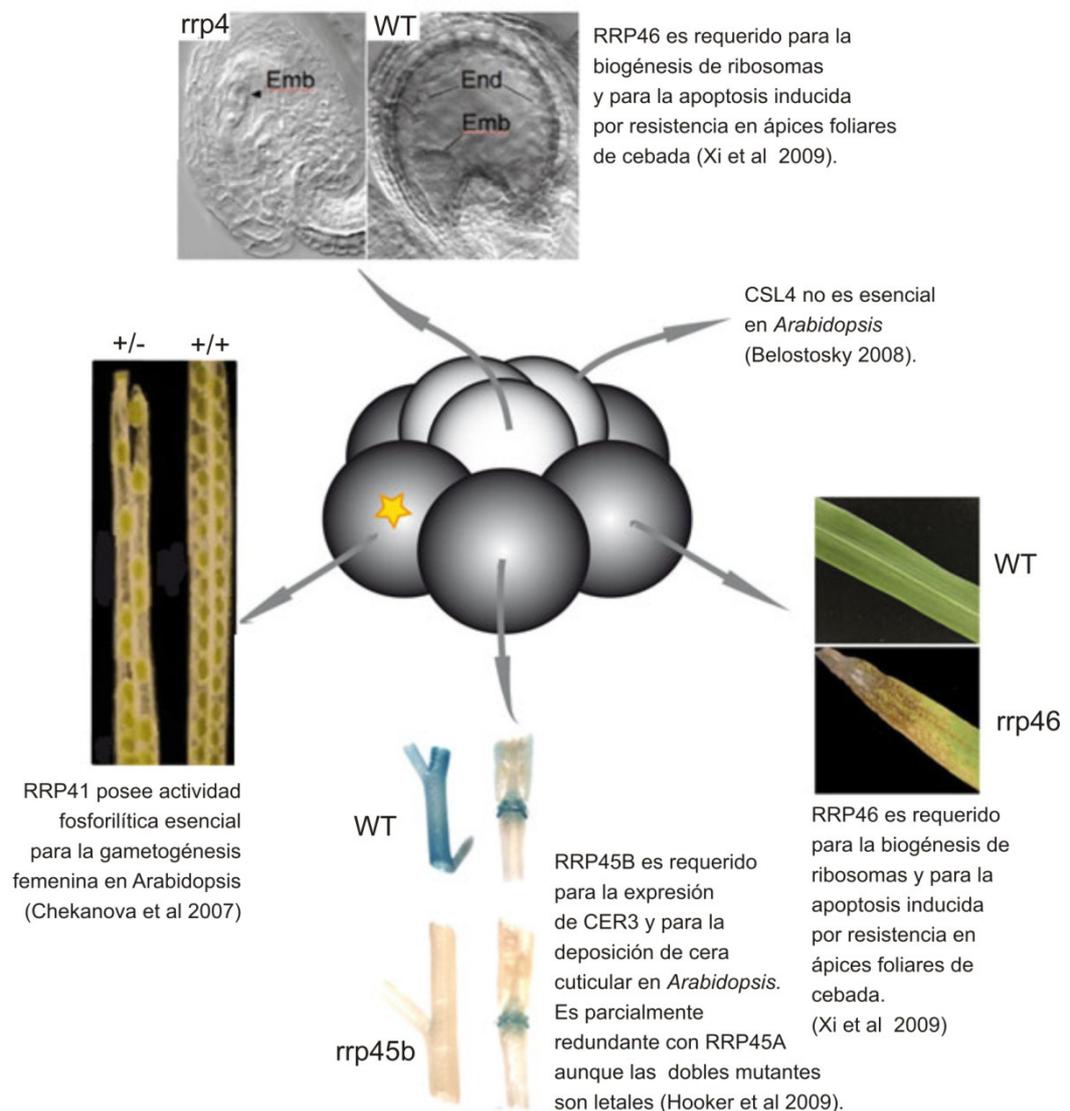


Figura 1.6. Fenotipos que presentan las plantas mutantes para componentes del ARN exosoma. El núcleo del ARN exosoma de plantas consta de seis dominios de proteínas-PH que forman una estructura similar a un anillo (representados por bolas de color gris oscuro) y tres dominios-S1 que cierran el anillo (representados por bolas de color gris claro). La subunidad Rrp41 (indicada con una estrella amarilla) posee actividad catalítica en plantas. Mutaciones ocasionadas en diferentes subunidades del complejo provocan

defectos diferenciales en el desarrollo. En el esquema se resumen los defectos encontrados. Extraído y adaptado de Jensen (2010).

AtRRP41 y AtRRP4 son esenciales para el desarrollo de los gametofitos femeninos y la embriogénesis respectivamente, mientras que AtCSL4 es indispensable durante el crecimiento y desarrollo. Estudios de *knock-down* mediante sistemas de ARNi inducibles han rebelado numerosos sustratos de la degradación por parte del exosoma, entre ellos un grupo de de ARNs pequeños nucleares y nucleolares, ARNs de transferencia y mensajeros, sumados a una amplia variedad de ARNs mensajeros que no completaron su correcto procesamiento 3' y miARNs primarios (Chekanova *et al.*, 2007). Una función adicional descrita para el exosoma está asociada a la biosíntesis de cera cuticular en tallos y silicuas de *Arabidopsis*, mediante el análisis funcional de un mutante *wax-deficient eceriferum 7 (cer7)*. El gen CER7 es un homólogo funcional del gen de levaduras Rrp45p y su función es controlar indirectamente la transcripción de un gen clave para la producción de cera (Hooker *et al.*, 2007).

1.4. Expresión transgénica de proteínas virales en plantas

El uso de plantas huésped en las cuales se expresan proteínas virales es un sistema experimental simplificado, con el potencial de discriminar los efectos individuales de cada proteína del impacto de la replicación viral (Maule *et al.*, 2002). Por ejemplo, la expresión ectópica del gen P6 del *Virus del mosaico del coliflor* (CaMV) en *Arabidopsis thaliana*, una especie huésped, demostró que esta proteína es capaz de producir alteraciones fenotípicas similares a los síntomas de la infección, como retrasos en la floración y clorosis leves (Zijlstra *et al.*, 1996; Cecchini *et al.*, 1997). En otro caso, la expresión transgénica de la subunidad menor de la proteína de cápside P74 del virus de floema *Beet western yellow virus* (BMYV) produjo patrones inusuales de PTGS en *Nicotiana benthamiana* cuando esta era infectada con BMYV u otros virus relacionados (Brault *et al.*, 2002). En un ensayo similar, la expresión de la proteína TMV-126-kDa fusionada a proteína fluorescente verde (GFP) en *Nicotiana tabacum* produjo incrementos de susceptibilidad frente a una gran variedad de virus (Harries *et al.*, 2008).

1.4.1 Resistencia derivada del patógeno

En 1985, Sanford y Johnston propusieron un método para interferir en el desarrollo de procesos patogénicos a través del uso de genes derivados del patógeno, confiriendo de este modo resistencia a la enfermedad en la planta huésped (Sanford y Johnston, 1985). En patógenos virales, la expresión de ciertos genes del propio virus en la planta altera el balance normal de sus componentes e interfiere en el proceso de replicación. Esta estrategia de control de virosis se denominó “resistencia derivada del patógeno” y consiste en la generación de plantas transgénicas que expresan secuencias genómicas del patógeno que se desea controlar, provocando de esta manera reducciones en la acumulación y/o multiplicación viral. Se han utilizado principalmente dos modos de conferir resistencia derivada del patógeno. La primera fue la expresión de la proteína de cápside del virus TMV (CP) y fue desarrollada por el grupo de Roger Beachy para el control de este virus en plantas de tabaco. Posteriormente, se encontró que aún expresando versiones no traducidas de la CP o de otras secuencias virales se podía llegar a conferir resistencia (Powell *et al.*, 1989; Braun y Hemenway, 1992). Este mecanismo fue llamado resistencia mediada por ARN y es consecuencia del silenciamiento génico.

1.4.2. Expresión de proteínas de cápside viral (CP)

A partir de 1986, la expresión de proteínas de cápside viral fue ampliamente utilizada para conferir resistencia a infecciones virales. Este mecanismo se denominó “resistencia mediada por cápside” (CP-MR, de *coat protein mediated resistance*) y fue utilizado para conferir resistencia al *Virus del mosaico de la alfalfa*, (AIMV) (Loesch-Fries *et al.*, 1987; van Dun *et al.*, 1987; van Dun *et al.*, 1988), al *Virus del mosaico del pepino* (CMV) (Cuozzo *et al.*, 1988), al PVX (Hemenway *et al.*, 1988), al virus del rayado del tabaco (TSV) (van Dun *et al.*, 1987), entre otros. Sin embargo, luego fue demostrado que las bases moleculares de cada tipo de resistencia son diferentes entre sí. A pesar de ser ampliamente estudiados, los mecanismos moleculares que gobiernan el modo de acción de CP-MR aun no son completamente comprendidos. En el caso del TMV, CP-MR se basa en la interferencia con la desencapsidación del genoma viral cuando el virus ingresa a la célula (Fig. 1.7). Dado este mecanismo, la resistencia puede ser superada cuando la inoculación se realiza con ARN desnudo o con viriones parcialmente desencapsidados (pre-tratados a pH 8) (Register y Beachy, 1988). Además, se sabe que el grado de resistencia es dependiente del nivel de inóculo, es decir que a mayores niveles de inóculo menor es la resistencia. El nivel de expresión transgénica de CP se correlaciona positivamente con la resistencia conferida (Powell *et al.*, 1990) y esta correlación positiva también se presenta cuanto mayor es la capacidad de CP de autoensamblarse (Bendahmane *et al.*, 2007). Cuando el aminoácido 42 (treonina) de la CP es mutado a triptófano, la nueva variante mutada de CP se denomina CP^{T42W}. La cantidad de agregados CP de 20S es superior y más estable en el caso de las mutantes CP^{T42W} (Bendahmane *et al.*, 1997; Asurmendi *et al.*, 2007). Esta podría ser la razón de los incrementos de resistencia observados cuando CP^{T42W} es expresada en plantas de tabaco (Bendahmane *et al.*, 1997; Asurmendi *et al.*, 2007; Bazzini *et al.*, 2007).

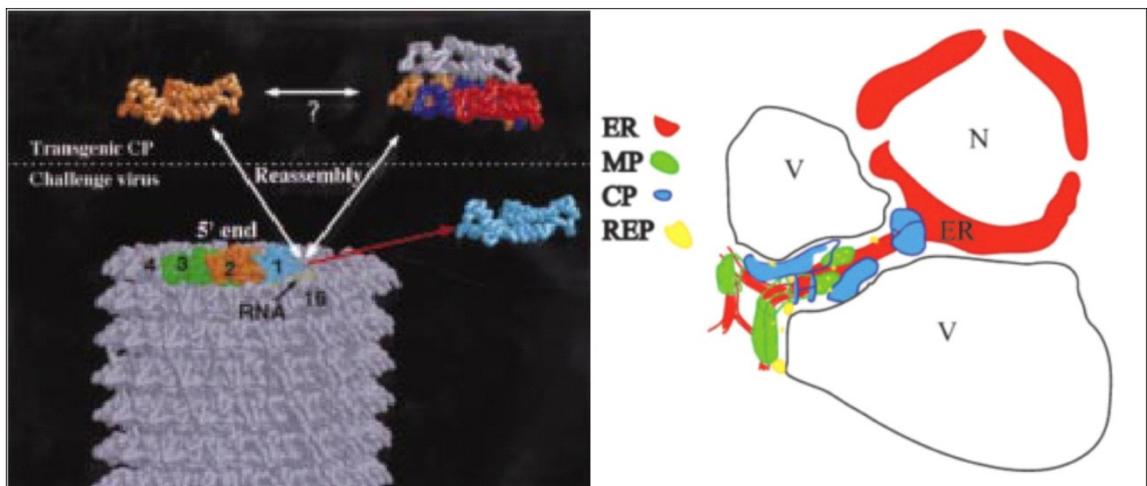


Figura 1.7. Funciones de CP en la replicación viral y en la interacción planta-virus. A la izquierda se muestra un modelo bioinformático que representa las interacciones predichas durante el desarrollo de CP-MR entre las proteínas virales del TMV CP (color anaranjado) y el virus TMV que ingresa a la célula durante un desafío con TMV (gris) (extraído de Bendahmane y Beachy 1998). A la derecha se muestra la formación de complejos de replicación viral en las células vegetales infectadas con TMV (Asurmendi *et al* 2004).

Sin embargo, también se ha observado cierta resistencia al inocular con ARN infectivo (Bendahmane *et al.*, 1997) y se detectó a su vez que CP^{T42W} disminuye la producción de proteína de movimiento restringiendo la dispersión célula-célula del virus (Bendahmane

et al., 2002). Por otra parte, la mutante CP^{T42W} reduce la formación de complejos de replicación viral (VRC) (Asurmendi *et al.*, 2004) y al igual que la CP salvaje logran un retraso en la infección con PVX, un virus no relacionado (Bazzini *et al.*, 2006). Por todas estas razones se ha propuesto que la CP posee un rol regulador, no esencial, sobre la replicación viral que permite un normal desarrollo de la infección (Bazzini *et al.*, 2006). Posteriormente, Bendahmane *et al.* (2007) determinaron que la expresión transgénica de CP tanto salvaje como mutante son capaces de interferir con funciones de la CP viral como regulación de la infección, movimiento y replicación del virus.

1.4.3. Expresión de proteínas de movimiento (MP)

La expresión de proteínas de movimiento (MP) ha sido ampliamente estudiada. Algunos trabajos demostraron que la expresión de MP confiere resistencia a ciertos virus. Por ejemplo, en el caso de la expresión transgénica de p24 de PVX (una de las MPs de PVX) se observó resistencia frente a la infección con TMV (Ares *et al.*, 1998), lo mismo fue observado con la MP 32 kDa de BMV (Malysenko *et al.*, 1993). En el caso de la expresión de p12 de PVX la resistencia observada fue específica contra PVX (Kobayashi *et al.*, 2001) y cuando la MP de ORMV se expresó transgénicamente en *Arabidopsis thaliana*, se observaron leves efectos fisiológicos y susceptibilidad a la infección con ORMV, aunque la sintomatología fue más leve (Mansilla *et al.*, 2006). Por otro lado, las MP de diversos virus han demostrado ser capaces de desarrollar alteraciones similares a síntomas y defectos fisiológicos en la partición de carbohidratos y en la fotosíntesis ya sea cuando se expresan bajo promotores constitutivos como tejido específicos (Duan *et al.*, 1997; Almon *et al.*, 1997; Balachandran *et al.*, 1997; Rinne *et al.*, 2005).

La MP (30 kDa) de TMV ha sido la más estudiada. Su expresión constitutiva en tabaco demostró que esta proteína interactúa con los plasmodesmos modificando su límite de exclusión y de esta manera facilita el movimiento célula-célula del virus durante el proceso de infección (Deom *et al.*, 1987; Wolf *et al.*, 1989; Deom *et al.*, 1990; Atkins *et al.*, 1991). Para permitir el movimiento célula-célula a través de los plasmodesmos, esta proteína también es capaz de unir ARN viral, asociarse al retículo endoplasmático y a elementos del citoesqueleto (Citovsky *et al.*, 1990; Heinlein *et al.*, 1995; Heinlein *et al.*, 1998).

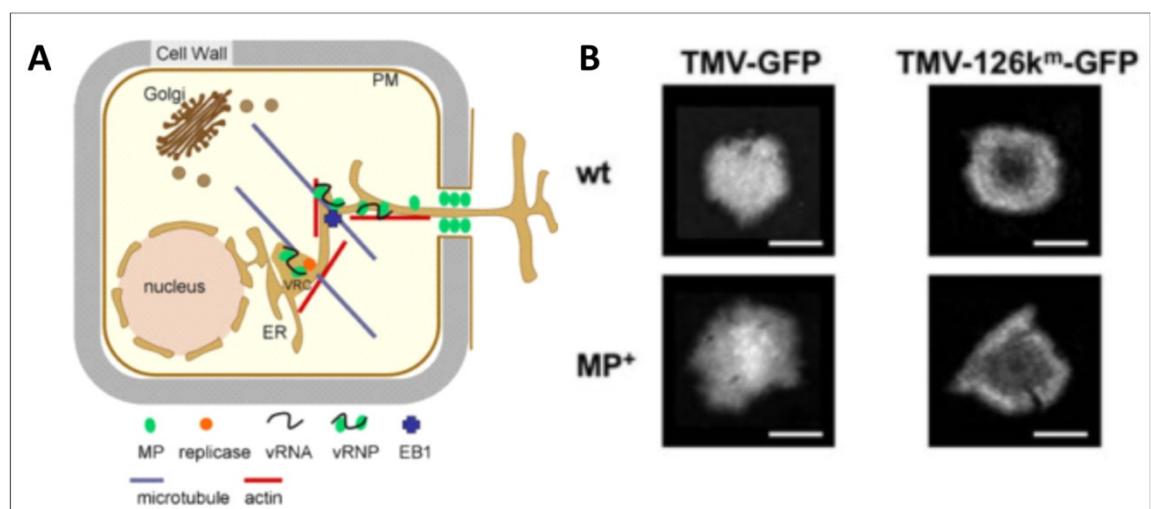


Figura 1.8. Funciones de MP en la replicación viral y en la interacción planta-virus. A) MP permite el movimiento célula-célula mediante la interacción con componentes del citoesqueleto y plasmodesmos (Niehl y Heinlein, 2011). B) MP aumenta la dispersión del

la señal de silenciamiento (el movimiento de siRNAs) en infecciones virales (Guenoune-Gelbart *et al.*, 2008).

1.4.4. Doble expresión de proteínas CP^{T42W} y MP de TMV en *Nicotiana tabacum*

En el laboratorio, se generaron plantas transgénicas de tabaco que expresan simultáneamente la proteína de cápside mutante (CP^{T42W}) y la proteína de movimiento (MP) de TMV mediante un cruzamiento de las líneas transgénicas parentales que expresan individualmente cada una de estas proteínas virales. Estas plantas fueron caracterizadas morfológicamente y a nivel molecular (Bazzini *et al.*, 2007). La línea transgénica MPxCP^{T42W} acumula ambas proteínas de TMV y presenta alteraciones morfológicas en hojas y flores, algunas de las cuales se asemejan a los síntomas producidos por la infección viral (Fig 1.9).

Por otro lado, se cuenta con una línea isogénica de MPxCP^{T42W}, que no expresa los dos transgenes virales, ha recuperado el fenotipo normal y constituye por lo tanto un excelente control experimental. Esta línea ha sido denominada mpxcp^{T42W*}.

La caracterización molecular de estas líneas permitió detectar mediante PCR la presencia de los transgenes MP y CP^{T42W} tanto en la línea MPxCP^{T42W} como en mpxcp^{T42W*} (Fig 1.10 A). Se detectó adicionalmente, mediante *Western blot* la presencia de ambas proteínas virales en la línea MPxCP^{T42W} pero no en la línea mpxcp^{T42W*} (Fig 1.10 B) En la línea cpxmp tampoco fue posible detectar los ARNs mensajeros, lo cual sugería que los transgenes estarían silenciados, hecho que fue confirmado mediante la detección posterior de los siARNs de CP (Fig 1.10 C). Se determinó adicionalmente que estas plantas presentan alteraciones en los niveles de un grupo de miRNAs involucrados en el desarrollo (Fig 1.10 E), fenómeno que podría explicar los defectos observados.

Estas alteraciones de miARNs no involucran la intervención de supresores del silenciamiento génico, ya que ninguna de estas proteínas virales tiene actividad supresora detectable (Bazzini *et al.*, 2007). Por otra parte, se demostró que la infección con TMV y otros virus producen alteraciones del patrón de acumulación de varios miARNs y que no existe correlación entre el nivel del efecto supresor de estos virus y la producción de síntomas. Se presentaron evidencias donde el nivel de alteración de ciertos miARNs correlaciona con la severidad de la infección, es decir la severidad de síntomas producido por cada virus (Bazzini *et al.*, 2007).

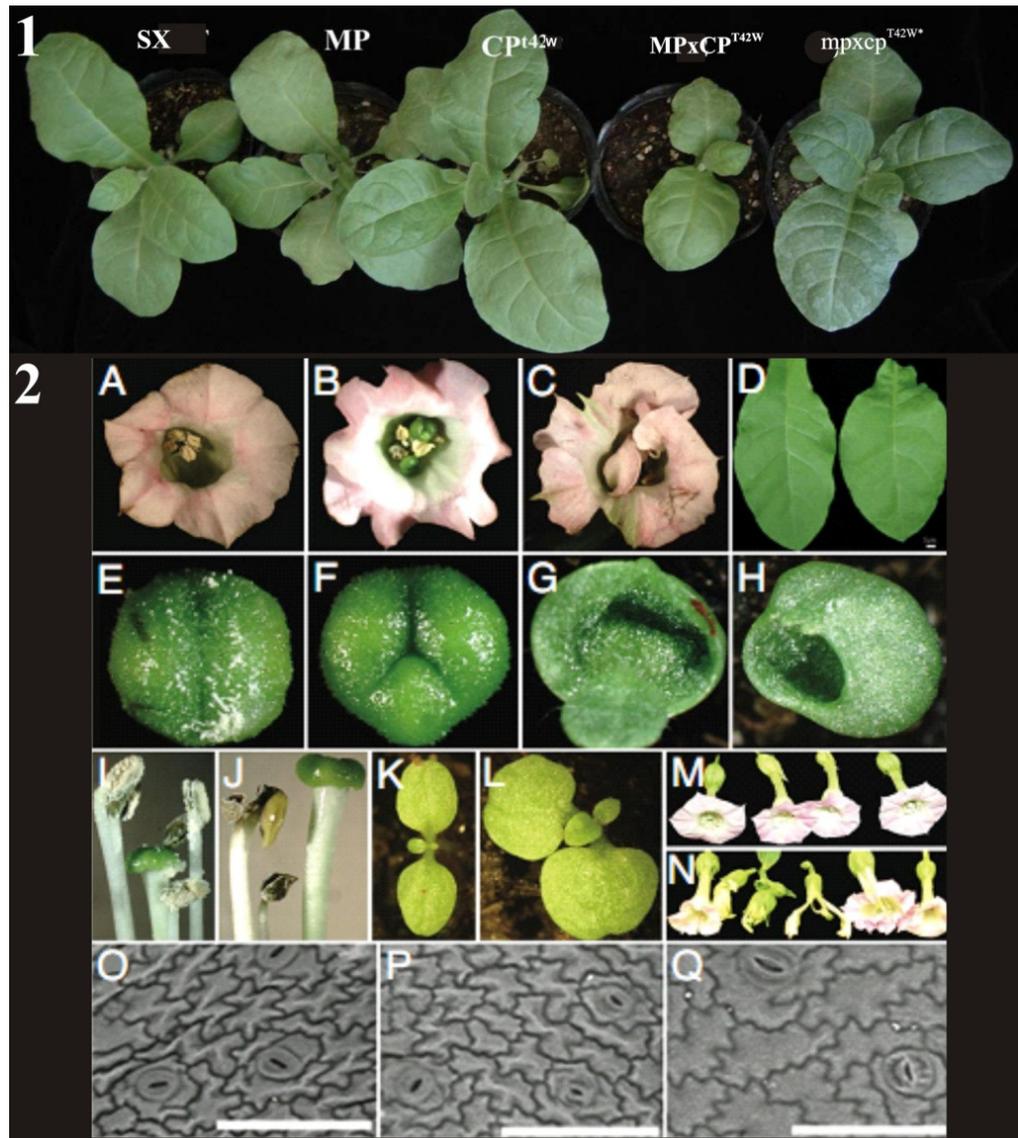


Figura 1.9. Fenotipos asociados a la expresión de las proteínas virales MP y CP^{T42W}. 1) Aspecto general de plantas de 4 semanas. SX: *Nicotiana tabacum* no transgénica, MP: línea parental que expresa MP, CP^{T42W}: línea parental 42W que expresa CP; línea progenie MPxCP^{T42W} (que expresa ambos transgenes) y línea progenie mpxcp^{T42W*} (silenciada para ambos transgenes). 2) Defectos en el desarrollo producidos por la expresión conjunta de MP y CP^{T42W}: A: flor normal; B y C: flor anormal de línea MPxCP^{T42W}; D: alteraciones en la morfología foliar, E y F: estigma normal y tripartito respectivamente, G y H: cotiledones fusionados en forma de copa, I y J: defectos en la morfología de pistilos, K y L: pérdida de simetría en plántulas, M y N: morfología floral alterada, O, P y Q: aumento del tamaño de células epidérmicas en Q (línea MPxCP^{T42W}). Extraído y adaptado de (Bazzini *et al.*, 2007).

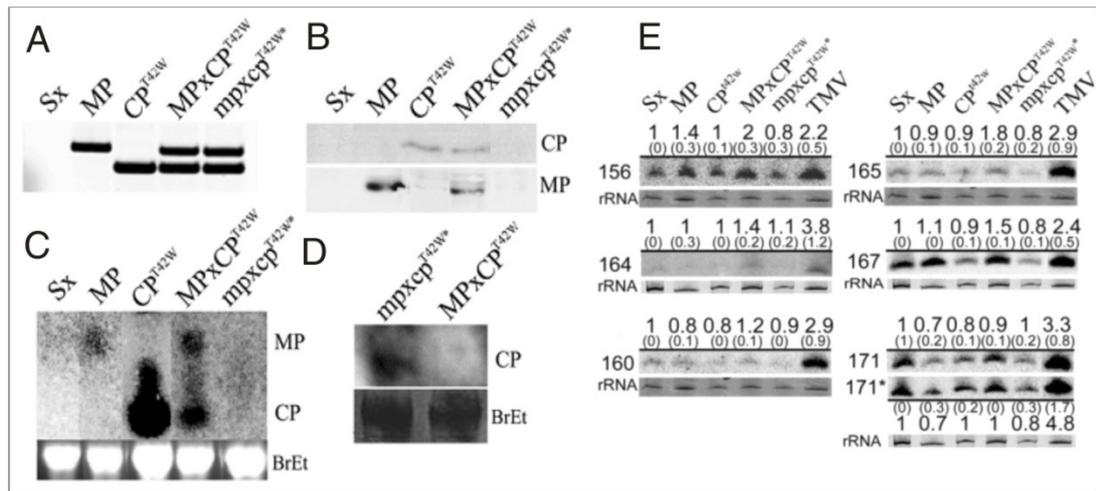


Figura 1.10. Análisis molecular de las líneas transgénicas de tabaco MP, CP^{T42W}, MPxCP^{T42W}, mpxcP^{T42W} y controles SX. A) Análisis de PCR para detectar la presencia de los transgenes. B) *Northern blot* (detección de ARNm transgénicos). C) *Western blot* (detección de proteínas virales transgénicas). D) *Northern blot* de sARNs para detección de silenciamiento de los CP por PTGS en la línea mpxcP^{T42W}. E) *Northern blot* de miARNs, donde se demuestra la alteración en la acumulación de miARNs en plantas de las líneas transgénicas y plantas infectadas con TMV. Extraído y adaptado de Bazzini *et al.*, (2007).

1.5. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es comprender el efecto de la expresión individual de la proteína de movimiento (MP) y la proteína de cápside (CP) del TMV así como el impacto de la co-expresión de ambas en la expresión génica de tabaco. Dado que se ha propuesto que la proteína CP ejerce un rol adicional a la interferencia con la desencapsidación, relacionado con la defensa y también se ha implicado a MP en la generación de alteraciones similares a síntomas, resulta de interés estudiar el impacto de la expresión de ambos genes, individualmente y en conjunto, desde el punto de vista de la defensa (inmunidad basal e innata). Por otra parte, considerando que estas proteínas virales no poseen actividad supresora del silenciamiento y cuando son co-expresadas generan numerosas alteraciones morfológicas y cambios en la acumulación de miARNs, resulta interesante considerar nuevas fuentes de modificación en la regulación de miARNs no relacionados al impacto de supresores del silenciamiento; por ende, nuevas formas de explicar la generación de síntomas.

Ambos aspectos de este trabajo se enfocan en contribuir con el lento proceso de discernimiento de la compleja interacción entre virus y plantas, donde un sinnúmero de mecanismos se activan simultáneamente y la resultante de dichos procesos múltiples es el desarrollo de la infección viral y la generación de síntomas en la planta huésped. Esta contribución tendrá un impacto inmediato en la comprensión general de la relación hospedante-patógeno y por lo tanto, sobre aspectos de relevancia económica como el control de enfermedades virales.

1.5.1. Objetivos específicos

1) Establecer los patrones de expresión diferencial génica resultantes de la co-expresión de CP^{T42W} y MP mediante análisis transcriptómico, para determinar genes y vías de regulación alteradas por la expresión de ambas proteínas virales.

- 2) Evaluar en profundidad la expresión y actividad de genes y vías metabólicas relacionados a la inmunidad basal e innata alterados por la expresión de las proteínas virales.
- 3) Identificar posibles fuentes alternativas de alteraciones en la acumulación de miARNs y de generación de síntomas mediados por la maquinaria de degradación de ARN (ARN *decay*).
- 4) Generar hipótesis integradas que permitan desentrañar la compleja red de la interacción planta – virus, donde están involucrados simultáneamente la defensa innata, el silenciamiento de ARN y como consecuencia, la generación de síntomas de enfermedades virales.

1.6. Hipótesis

La expresión de las proteínas virales del TMV CP^{T42W}, MP y la co-expresión de MPxCP^{T42W} modulan diferencialmente la activación de respuestas de defensa basal e innata.

Existen mecanismos de modulación de la abundancia de miARNs en infecciones virales independientes de la acción de supresores virales del silenciamiento génico que actúan simultáneamente y podrían contribuir a la generación de síntomas.

1.7. Estructura de la Tesis

El impacto individual de la expresión de cada proteína viral es interesante para el estudio de la interacción virus planta, dado que los efectos producidos son independientes de sus funciones en el ciclo de replicación viral. Es inclusive más interesante considerar el resultado de la co-expresión de dos proteínas, en este caso MP y CP^{T42W}. Por estos motivos, en el capítulo 2 se expone la realización y el análisis de un microarreglo con la finalidad de estudiar los patrones de expresión diferencial génica resultantes de la co-expresión de MP y CP^{T42W}. Se utilizó como control la línea isogénica silenciada mpxcp^{T42W*}, que es útil para excluir las potenciales alteraciones debidas a la localización de los transgenes en diferentes sitios de inserción. La información obtenida en el análisis de microarreglos permitió la generación de las hipótesis que fueron estudiadas con mayor detalle en los siguientes capítulos. En el capítulo 3, de acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de microarreglos, se demostró que la mayor parte de los genes validados clasificados dentro de los subgrupos más representados de estrés oxidativo (genes de biosíntesis de ácido ascórbico y de detoxificación de ERO) y regulación hormonal (genes posiblemente involucrados en la vía de señalización mediada por SA) mostraron una depresión general en sus niveles de expresión en plantas de la línea MPxCP^{T42W}. Por este motivo, se profundizó en el análisis de vías metabólicas ligadas a la defensa innata de las plantas. Por otra parte, en el capítulo 4 se analizó un subgrupo de genes cuya expresión se encontró aumentada. Este subgrupo comprende transcritos involucrados en vías de procesamiento y degradación de ARN. Si se considera que las proteínas virales CP^{T42W} y MP no poseen actividad supresora del silenciamiento, resulta interesante considerar que este mecanismo podría implicar, directa o indirectamente, una nueva fuente de modificación en la regulación de siARNs en general, no relacionados a la presencia de supresores del silenciamiento y por ende, quizás una explicación adicional para el mecanismo de generación de síntomas. Por este motivo se analizaron los niveles de

expresión de genes involucrados en vías de degradación de ARN y a su vez se realizaron ensayos de genómica funcional mediante VIGS en *Nicotiana benthamiana*. Finalmente, en el capítulo 5, se plantean hipótesis integradas que pretenden esclarecer algunos puntos en la compleja interacción planta-virus y de este modo realizar nuevos aportes al área en estudio.

CAPÍTULO 2

**Estudio de la expresión diferencial génica resultante de la co-
expresión de CP^{T42W} y MP en tabaco**

2.1. Introducción

El uso de plantas transgénicas que expresan proteínas virales es un sistema útil para estudiar la complejidad de la interacción planta-virus. La evaluación del impacto individual de la expresión de cada proteína viral es de interés para obtener información sobre sus efectos en la interacción con la planta huésped independientemente de sus funciones en el ciclo de replicación viral. Por otra parte, es inclusive más interesante considerar el resultado de la co-expresión de dos proteínas en conjunto. Se ha publicado en trabajos previos que CP y MP co-localizan durante la infección de TMV (Asurmendi *et al.*, 2004) y además, Bazzini *et al.*, (2007) demostraron mediante ensayos de BiFC que MP y CP^{T42W} interactúan *in vivo* formando un complejo con características o funciones desconocidas, probablemente diferentes a las ya descritas para las proteínas individuales. Entre estas nuevas funciones Bazzini *et al.*, (2007) confirmaron que el complejo, al igual que las proteínas individuales no muestran actividad supresora del silenciamiento, por lo tanto, todos los efectos resultantes de la co-expresión de MPxCP^{T42W} son independientes de este mecanismo.

La tecnología de microarreglos es una herramienta valiosa para evaluar los cambios en la expresión de genes a escala genómica (Whitham *et al.*, 2006; Wise *et al.*, 2007). Este capítulo expone la realización y el análisis de un microarreglo con la finalidad de estudiar los patrones de expresión diferencial génica resultantes de la co-expresión de MP y CP^{T42W}. Se utilizó como control la línea isogénica silenciada mpxcp^{T42W*}, que en este caso es extremadamente útil, ya que permite determinar todos aquellos cambios de expresión génica producidos exclusivamente por la expresión de proteínas virales, excluyendo las potenciales alteraciones debidas al sitio de inserción de los transgenes.

El análisis de microarreglo fue realizado con la tecnología *Affymetrix* mediante una plataforma *GeneChip Tomato 10K*.

2.2. Material y métodos

2.2.1. Material vegetal utilizado

Se utilizaron plantas de *Nicotiana tabacum Xanthi-nn* salvajes que en el presente trabajo se denominaron SX y plantas transgénicas correspondientes a la misma variedad de tabaco. Entre las líneas transgénicas se encuentran la CP^{T42W} (línea nn T42W) que expresa una versión mutada de la CP de TMV (Bendahmane *et al.*, 1997); la línea transgénica para la MP de TMV (línea nn 277) (Deom *et al.*, 1990); dos líneas doble transgénicas: MPxCP^{T42W} y mpxcp^{T42W*} homocigotas, provenientes de un cruzamiento entre la línea CP^{T42W} y la línea 277. Tanto las líneas transgénicas como la salvaje fueron mantenidas en invernáculo en condiciones controladas de 24° a 26°C, con ciclos de 16 horas (hrs) luz y 8 hrs oscuridad.

2.2.2. Extracción de ARN para análisis de microarreglos

Se colectaron tejidos foliares de plantas de tabaco de aproximadamente 6 semanas de edad. Cada muestra consistió en la recolección de hojas pertenecientes a tres plantas. Los tejidos fueron homogeneizados con ayuda de nitrógeno líquido, morteros y pistilos. Luego el ARN total fue extraído con *RNeasy™ Plant Mini kit (Qiagen)* de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La calidad del ARN fue evaluada mediante *BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies)* y la concentración de ARN fue cuantificada mediante espectrofotometría (*Nanodrop ND-1000; NanoDrop Technologies*).

2.2.3. Análisis de microarreglos

Para la confección del microarreglo, se respetaron las normas internacionales MIAME (Brazma *et al.*, 2001). Se hibridaron tres réplicas biológicas independientes correspondientes a cada línea transgénica de acuerdo a las instrucciones del Manual *Affymetrix*. Las hibridaciones fueron escaneadas utilizando el *GeneChip Scanner 3000 7G* y los datos fueron obtenidos mediante el *Microarray Suite version 5.0 (MAS 5.0)* utilizando las condiciones estándar sugeridas por *Affymetrix*. Esta etapa de confección del microarreglo fue realizada en el laboratorio del Dr. Marcelo Javier Yanovsky, por el Lic Matías Rugnone de la Cátedra de Fisiología Vegetal, IFEVA (FAUBA).

Los datos brutos fueron pre-procesados mediante el método RMA (Irizarry *et al.*, 2003) y los análisis estadísticos fueron realizados en dos etapas. En una primera fase se retuvieron aquellas secuencias que mostraron diferencias entre tratamientos mediante el uso de ANOVA con p-valores $< 0,10$. De esta forma, partiendo de una matriz original compuesta por 10.209 genes se conservaron únicamente 1.667. Luego, una segunda etapa del análisis consistió en seleccionar secuencias con p-valores $< 0,05$ para eliminar descubrimientos falsos (análisis FDR), como fue descrito por Benjamini (1995). Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con la ayuda de Julio Di Rienzo y el *software* estadístico InfoStat. (www.infostat.com.ar; InfoStat Group, 2004; National University of Córdoba, Argentina).

2.2.4. Extracción de ARN y confección de ADNc para RT-qPCR

El ARN total fue extraído a partir de 50-75 miligramos (mg) de tejido foliar de tabaco procesado en nitrógeno líquido, utilizando *Trizol Reagent (Invitrogen)*, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ARN total se cuantificó por espectrofotometría mediante *Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies)* y posteriormente fue tratado con *DNase I (Invitrogen)*. El ADNc se sintetizó con la enzima retro-transcriptasa MMLV (*Invitrogen*) y oligonucleótidos al azar. Para las reacciones de RT-qPCR se confeccionaron ADNc a partir de entre cuatro y cinco réplicas biológicas.

2.2.5. Diseño de oligonucleótidos,

Para evaluar la expresión de genes se diseñaron oligonucleótidos específicos mediante el *software PrimerExpress 2.0 (Applied Biosystems)*. La lista de oligonucleótidos específica se detalla en la Tabla 1. Las eficiencias de los pares de oligonucleótidos y los valores de Ct se obtuvieron mediante el *software LinRegPCR* (Ramakers *et al.*, 2003).

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos utilizados para la validación de los resultados obtenidos en el análisis de microarreglo y para la evaluación de la expresión de genes de detoxificación redox y defensa.

Unigen de tabaco	Nombres putativos	Secuencia de oligonucleótidos Izquierdo y Derecho
SGN-U442525	GDP-manosa pirofosforilasa	TTCCCAAAAATTGCAGCGG CGCAACATCTGGTCCAATCAA
SGN-U424966	Cu/Zn superóxido dismutasa	TCCTGATGGCAAGACACATGGAG CGTGAACCACAAGTGCTCTTCCA
SGN-U44665	Transportador de ascorbato 6	ATGTGCCATTCTCATCGGAAG CATGGCTTGCCTCTGTCTTTC
SGN-U448855	Ascorbato Peroxidasa 1	TTGCGCTCCTCTTATGCTCC TCCTTGCTCAGCCTTGAACC

Unigen de tabaco	Nombres putativos	Secuencia de oligonucleótidos Izquierdo y Derecho
SGN-U429188	Riboforina II	TTTCCGTGCCATAAAGGCTC GGCTCTCAAGTGCAATTCCTG
SGN-U438230	Prot relacionada a estrés	CCCAATTCCTCCACTCTTCG TCCTCAGTTTGAGCCATCTCG
SGN-U422474	Isocorismatasa hidrolasa	TGGGTTGTCCGTGAGCATGA TGCCCCCACACTACCCTTTG
SGN-U424612	Nudix Hidrolasa similar a (AtNudH20)	AATTCCTGTCTCAGATCCCC GAAAGACGTCGTCCCAGGTG
SGN-U450319	Etileno Insensible 4 (EIN4)	GCAAGTTCCACAGCCATGG TGAGACCGTTGATTCCGACC
SGN-U449198	Prot. transm con repet ricas en leucina	GAACCTGGAAGGAACCTCCC ACAGCCAAATCCCCTATCCC
SGN-U438453	Kinasa dependiente de Calcio (CPK4)	ATTTAGAGGCACGTAGCCACG TGCCAAAATTCTTTTGTGAAGG
SGN-U436722	Complejo proteico de tipo retromero (MAG1)	GGAGACACGTTACCCTGAGACC ATGAGTCCAAGTCACCCCATG
SGN-U447185	Prot. de retención en lumen de RE	TCATGGTCTATGGCCTTCAATG ACCAGCTGTCCACCGAAAAC
SGN-U436888	Peptidasa de RE putativa	TTCTCTATGCCACGGTCAAC CCGTCATGATTATGGTCACCC
SGN-U449026	Prot. dedos de Zinc (tipo C3HC4-RING)	ATCAGGACCTGACAGTCACGG CTGGAAGGAACCTCCCCAG
SGN-U443635	Prot.dedos de Zinc 1 (ZFN1)	CCTCTTTGTCACCGTCTCTCG GGTTCACCTTCACGGACAGG
SGN-U435843	Familia de prot. similar a transducinas	ATGCGAACATCCCAAACACG CACCCGTGTGAAAGGCATTG
SGN-U474793	Similar a Nt-KED	TCAATGCCAAACTGGAAGCTC CTTTAGGACTCTCAACCACGGC
SGN-U426225	Helicasa caja DEAD/DEAH (RH16) putativa	ATTTCTTCCGCTCACTGCCAT ATTAAATGCGGAGCTGCCTCA
SGN-U443437	ARN helicasa depte de ATP (DEAD-box) (RH51)	CGGAAAGAAAGGAAGTGACG GGCAGGACAAAAATGTGGAC
SGN-U431343	Exorribonucleasa 3'-5'-similar a Rrp42	GGAGATAGAAGCCGCTGAAA GCCGCTCAAACCTAAATTCC
SGN-U445842	Prot de unión a clorofila a/b 21 (LHCII tipo I CAB-21)	GGATTCTTCGTTACAGGCTATCG TGTGGCATAGGCCCAAGC
SGN-U443543	D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa putativa	TTGAGCAGGCCATAGCCAC TCTTCATCTTTGCGAATGCG
SGN-U444454	Desconocida	GAAGAATTCCGCCGTTTTCG AGCGTTTCCATTTTCTTGC
SGN-U450832	Oxidasa Alternativa	TATTGGACCGTCAAGGCTCT TGCATCCTCTCATTTTCAGC
SGN-U444943	Prot. relacionada a patogénesis 1 (PR-1)	CGCCGCCTTCCCTCAACTTAA TCGCCAAAGGGACGTTGCCT

Unigen de tabaco	Nombres putativos	Secuencia de oligonucleótidos Izquierdo y Derecho
SGN-U446829	Prot. de tipo Taumatina (PR-5)	GGCAGGTGGTGAATGTTCCCTTC TCGCCACCAGATGCCTTCTT
SGN-U431860	RDR1	GCATTGAACACGCCTTGA GCAGAACCCGATTGGATACG
SGN-U437134	RDR6	CTCAGCTTGGGGACCTCA CAGCCTCCAGAATCCTCAC

2.2.6. Selección de genes de referencia para su utilización como control interno

Para la selección del gen de referencia más estable en las líneas transgénicas y la línea salvaje se evaluaron cuatro posibles candidatos, entre ellos el factor de elongación 1α (EF- 1α , SGN-U446573), ubiquitina 3 (Ubi-3, SGN-U440543), actina (SGN-U431117) y gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH, SGN-U448919). Para los análisis de estabilidad se utilizaron como herramientas los *softwares*: geNorm 3.5 (Vandesompele *et al.*, 2002), Normfinder 0.953 (Andersen *et al.*, 2004) y Bestkeeper v1 (Pfaffl *et al.*, 2004).

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos diseñados para la selección de genes de referencia.

Unigen de tabaco	Nombre del Unigen	Secuencia de oligonucleótidos Izquierdo y Derecho
SGN-U446573	Factor de Elongación 1α	GATTGGTGGTATTGGTACTGTC AGCTTCGTGGTGCATCTC
SGN-U440543	Ubiquitina-3	GCTGATTACAACATCCAGAAGG TGCAACACAGCAAGCTTAACC
SGN-U431117	Actina	ACGCCAGTGGCCGTACAACA ATCGCGGACAATTTCCCGTTC
SGN-U448919	GAPDH	GGAGGAGGAACAACAAGAGG AGATGCCGTCAGTGCCGA

2.2.7. Confección de RT-qPCRs, obtención y análisis de datos de expresión

Las condiciones experimentales para la confección de las RT-qPCR se establecieron a partir de las normas internacionales MIQE (Bustin *et al.*, 2009) detalladas en la Tabla 3 (ver resultados). Para obtener el valor de expresión diferencial de un gen específico en una línea transgénica con respecto al control (línea salvaje), se deben normalizar los datos utilizando un gen de referencia como control interno. Los análisis de expresión relativa fueron realizados mediante el *software* fgStatistics (Di Rienzo J.A, 2009) (<http://sites.google.com/site/fgStatistics/>) que utiliza el algoritmo desarrollado por Pfaffl *et al* (2001) para obtener los valores de expresión relativa. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos niveles de expresión cuyos p-valores fueron menores a 0,05 (indicados con *); menores a 0,01 (indicados como **) y menores a 0,01 (indicados con ***).

2.3 Resultados

2.3.1 Perfil de expresión diferencial génica resultantes de la co-expresión de MP y CP^{T42W}

Con el objetivo de detectar cambios en la expresión global de genes de tabaco en respuesta a la expresión conjunta de las proteínas virales MP y CP^{T42W} se hibridó un microarreglo *Tomato* 10K *Affymetrix Microarray GeneChip*. Se compararon los patrones de expresión génica de dos líneas transgénicas isogénicas MPxCP^{T42W} (co-expresantes de MP y CP^{T42W}) y mpxc^{T42W*} (silenciada para ambos transgenes) (Bazzini *et al.*, 2007). Esta última fue utilizada como control considerando que el sitio de inserción de los transgenes y el genotipo están conservados entre ambas líneas, la única diferencia entre ellas es el producto de la expresión de las dos proteínas virales. El microarreglo de *Solanum lycopersicum* (*Tomato* 10K de *Affymetrix*) contiene más de 10.000 sondas que representan aproximadamente 9.200 genes. Ha sido previamente demostrado que este microarreglo es útil para un cierto rango de especies de la familia de las solanáceas incluyendo a *Nicotiana tabacum* dado el alto grado de conservación entre los transcritos (Rensink *et al.*, 2005).

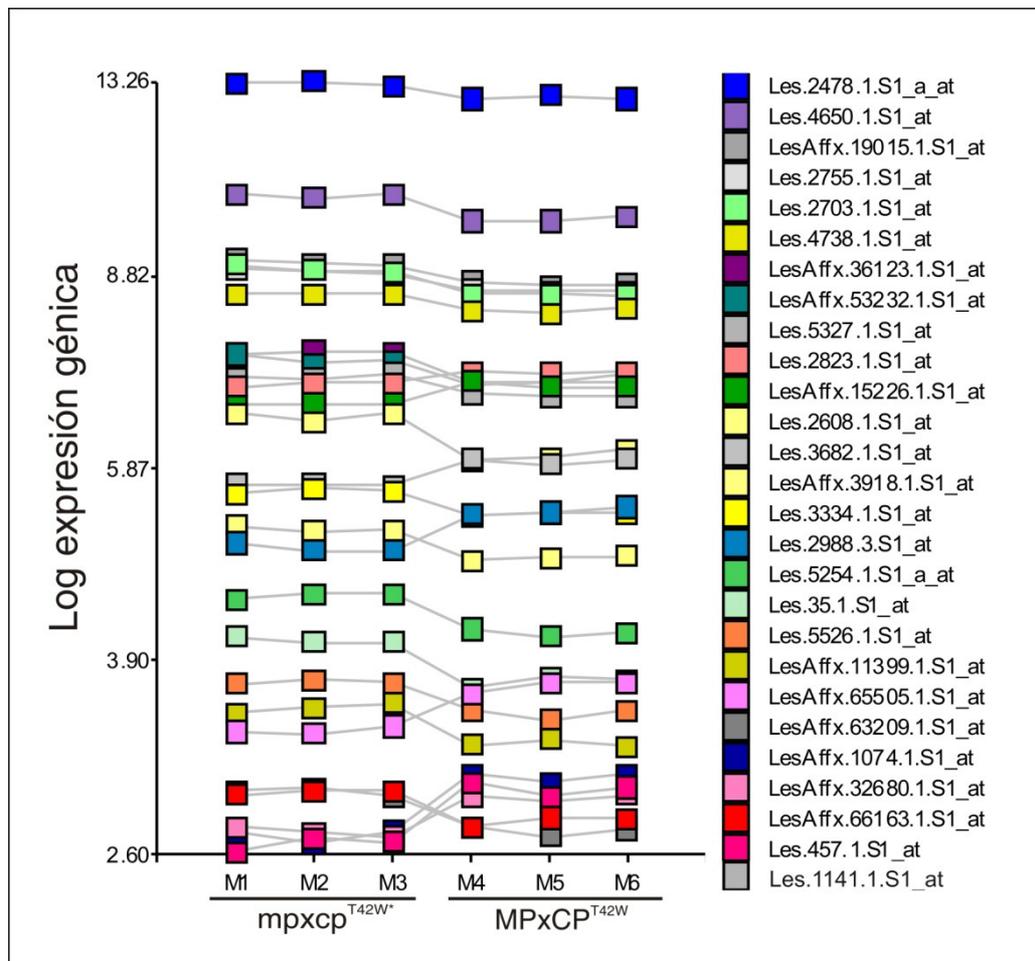


Figura 2.1. Perfiles de expresión génica entre las tres réplicas biológicas de las líneas transgénicas MPxCP^{T42W} y mpxc^{T42W*}. Cada cuadro en color corresponde a una sonda obtenida a partir del microarreglo *Affymetrix*.

Los análisis estadísticos de la matriz de expresión génica fueron realizados en dos etapas (ver material y métodos, sección 2.2.3). Los resultados obtenidos mostraron un

total de 28 genes, cuyas sondas presentaron niveles de hibridación significativamente diferentes en la línea MPxCP^{T42W} con respecto al control mp_{xcp}^{T42W*} (Fig 2.1). Los datos crudos del experimento de microarreglo fueron depositados en *Gene Expression Omnibus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) bajo el número de acceso GEO GSE37905.

Para determinar qué genes corresponden a cada transcripto se realizaron búsquedas bioinformáticas mediante la herramienta *Tomato Functional Genomic Database* (<http://ted.bti.cornell.edu/>), que permitió obtener los *unigenes* de tomate partiendo de las sondas *Affymetrix*. Posteriormente, mediante las herramientas BLASTX y BLASTN se buscaron *unigenes* ortólogos en tabaco utilizando las bases de datos de *Sol Genomics Network* (<http://solgenomics.net/>) y la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Luego, para realizar una categorización funcional se consideró el proceso biológico en que estos genes están involucrados (Tabla 3).

Tabla 3. Unigenes de tabaco diferencialmente expresados resultantes de la co-expresión de CP^{T42W} y MP de TMV. ↓ y ↑ indican los niveles de expresión de cada gen con respecto al control mp_{xcp}^{T42W*}.

Sonda <i>Affymetrix</i>	Unigen de tabaco		Descripción	Función putativa
Les.4650.1.S1_at	SGN-U442525	↓	GDP-manosa pirofosforilasa (GMP1)	
LesAffx.65505.1.S1_at	SGN-U426799	↓	GDP-D-manosa 4,6-dehidratasa	
	SGN-U313819	↓	Cu/Zn- superóxido dismutasa (CSD2)	
Les.4738.1.S1_at	SGN-U44665	↓	Transportador de ascorbato putativo, similar a atNAT6	Estrés Oxidativo
LesAffx.3918.1.S1_at	SGN-U448855	↓	Ascorbato peroxidasa citosólica (cAPX1)	
Les.5254.1.S1_a_at	SGN-U429188	↓	Similar a Riboforina II (RPN2)	
Les.2988.3.S1_at	SGN-U438230	↑	Proteína relacionada a estrés	
LesAffx.66163.1.S1_at	SGN-U422474	↓	Proteína de la familia Isocorismato hidrolasa	
LesAffx.11399.1.S1_at	SGN-U424612	↓	Nudix hidrolasa similar a atNudH20	Respuesta a Hormonas
Les.35.1.S1_at	SGN-U450319	↓	Receptor de etileno (NTHK2)	
LesAffx.63209.1.S1_at	SGN-U471865	↓	Proteína de respuesta auxina putativa	
Les.5327.1.S1_at	SGN-U449198	↓	Prot transmembrana de respuesta a leucina	
Les.3334.1.S1_at	SGN-U438453	↓	Quinasa dependiente de calcio (CPK4)	
Les.2755.1.S1_at	SGN-U436722	↓	Ser-Thr fosfatasa, similar a MAG1	
Les.5526.1.S1_at	SGN-U447185	↓	Receptor de retención en lumen de RE	Transducción de señales
LesAffx.19015.1.S1_at	SGN-U436888	↓	Peptidasa de RE putativa	
LesAffx.53232.1.S1_at	SGN-U449026	↓	Proteína dedos de Zinc de la familia RING-C3HC4	Regulación transcripcional
Les.2608.1.S1_at	SGN-U443635	↓	Proteína dedos de Zinc 1 (ZFN1)	
Les.2823.1.S1_at	SGN-U435843	↑	similar a transducina	
Les.3682.1.S1_at	SGN-U474793	↑	Similar to Nt-KED	

Les.1141.1.S1_at	SGN-U426225	↑	Similar a ARN helicasa DEAD/DEAH box (RH16)	
LesAffx.15226.1.S1_at	SGN-U443437	↑	Similar a ARN helicasa DEAD-box dependiente de ATP (RH51)	Metabolismo de ARN
LesAffx.32680.1.S1_at	SGN-U431343	↑	Exorribonucleasa 3'-5' similar a Rrp42	
Les.2478.1.S1_a_at	SGN-U445842	↓	Proteína de union a clorofila (CAB21)	Metabolismo
Les.2703.1.S1_at	SGN-U443543	↓	D-3-Fosfoglicerato deshidrogenasa	
LesAffx.1074.1.S1_at	SGN-U444454	↓	Proteína desconocida	
LesAffx.36123.1.S1_at	SGN-U425185	↓	Proteína similar a Os08g0534400	Función desconocida
Les.457.1.S1_at	SGN-U443197	↑	Proteína desconocida	

Los genes diferencialmente expresados se agruparon de acuerdo a sus niveles de expresión en perfiles estandarizados (Fig 2.2 A). En esta figura se puede observar que un gran número de genes en las plantas de la línea MPxCP^{T42W} mostraron niveles de expresión disminuidos con respecto a los controles mpxcp^{T42W*}. Esto sugiere que las plantas que co-expresan ambas proteínas virales presentan cierta depresión específica de la expresión génica, proceso que suele presentarse en etapas iniciales de la replicación viral y se denomina *shut off* (Aranda y Maule, 1998). Posteriormente, los transcritos fueron clasificados en diferentes subgrupos de acuerdo a sus funciones putativas, entre ellas se encontraron respuestas a estrés oxidativo, compuesta por genes pertenecientes a varios compartimientos intracelulares como citosol y cloroplastos; respuesta a fitohormonas, como ácido salicílico, etileno y auxinas; transducción de señales; regulación transcripcional; metabolismo basal y metabolismo de ARN, incluyendo genes responsables del procesamiento y la degradación de ARNs de núcleo y citoplasma (Fig. 2.2 B).

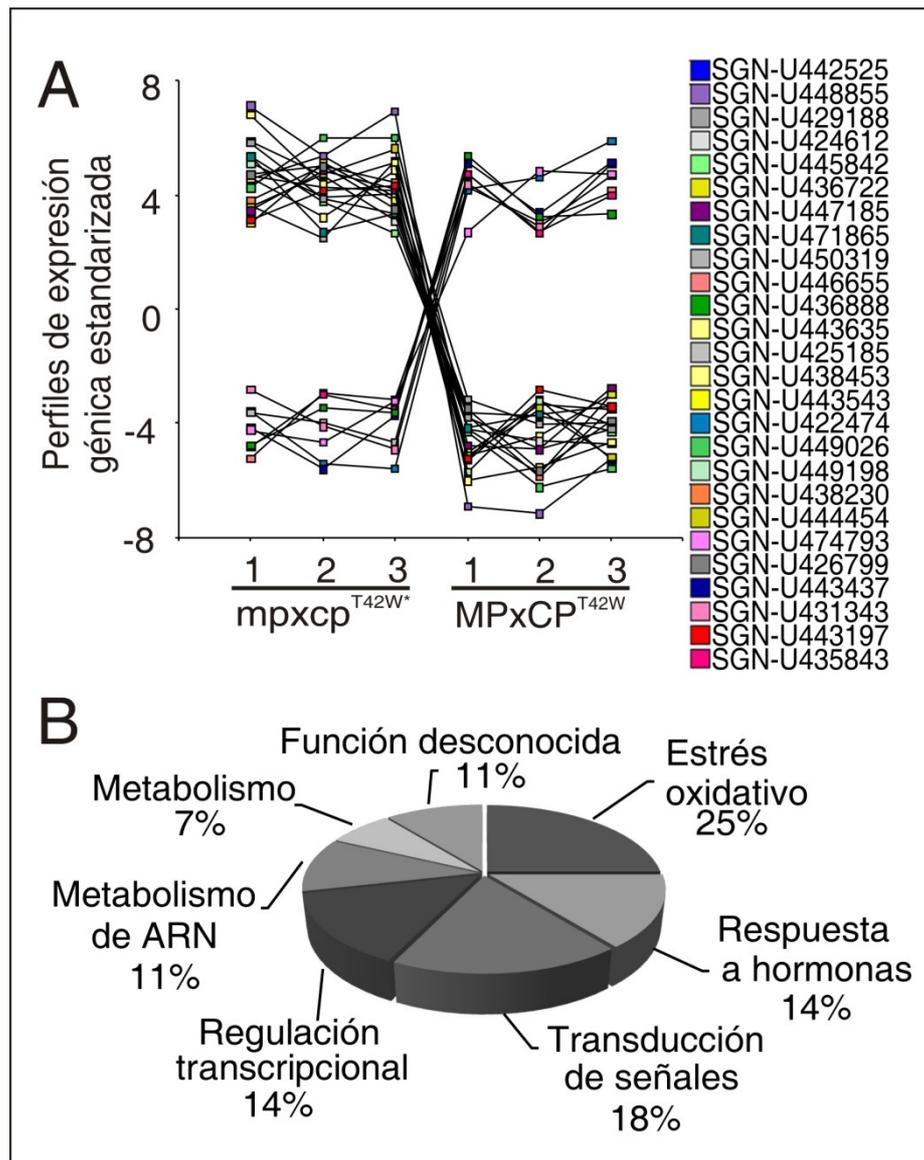


Figura 2.2. Perfiles estandarizados de expresión génica entre las tres réplicas biológicas de las líneas transgénicas MPxCP^{T42W} y mpxcp^{T42W*}. A) Los unigenes de tabaco están agrupados de acuerdo a sus niveles de expresión en las líneas transgénicas. B) Diagrama representativo del agrupamiento de genes de acuerdo a sus funciones biológicas putativas y el porcentaje de representación en la totalidad de genes que cambiaron su expresión en respuesta a la expresión de MP y CP^{T42W} de TMV.

2.3.2. Puesta a punto y estandarización de protocolo de RT-qPCR: Información mínima requerida para la publicación de experimentos de RT-qPCR (MIQE)

La confección y análisis de experimentos de RT-qPCR requiere de un alto grado de consenso en el diseño experimental y las posteriores etapas hasta obtener los resultados de expresión génica. La falta de consenso sumada a la escasa información detallada que se provee en las publicaciones en general dificulta enormemente la reproducibilidad de los experimentos y la evaluación crítica de los mismos. Para poder superar estas dificultades y obtener información de expresión génica confiable y robusta, se evaluó y ajustó cada etapa experimental: el diseño, el muestreo, la extracción de ARN, los protocolos de transcripción reversa y confección de las reacciones de RT-qPCR y la validación y análisis de datos, siguiendo los requerimientos establecidos por las normas MIQE (Bustin *et al.*, 2009) (Tabla 4)

Tabla 4. Condiciones experimentales utilizadas para el análisis de expresión de genes mediante RT-qPCR de acuerdo a los requerimientos MIQE.

Diseño Experimental	
Controles	<i>Nicotiana tabacum</i> cv xanthi (SX)
Tratamientos	Líneas transgénicas / Tabacos infectados con TMV
Muestras	
Tipo de muestra	Tejido foliar
Procesamiento	Homogeneización en Nitrógeno líquido
Condiciones de congelamiento	-80°C
Extracción de ARN	
Procedimiento	Extracción Fenol-Ácido
Reactivos	TRIzol (Invitrogen [®])
Detalles del tratamiento con ADNasa	DNase I Amp Grade (Invitrogen), 15 min a temperatura ambiente
Determinación de contaminaciones	< 3%
Cuantificación de ácidos nucleicos	Absorbancia a 260 nm
Instrumento	NanoDrop ND-1000; NanoDrop [®] Technologies
Pureza (A_{260}/A_{280})	> 1,8
Integridad del ARN	Análisis mediante electroforesis en geles de agarosa
Transcripción Reversa	
Condiciones de la reacción completa	De acuerdo a las instrucciones del fabricante Invitrogen [®] .
Cantidad de ARN y volumen de reacción	1 µg de ARN total en 20 µl de reacción
Oligonucleótidos utilizados	oligo d(T) ₂₀ de (Invitrogen [®]) y oligonucleótidos al azar.
Transcriptasa Reversa	
Temperatura y tiempo	50 min a 37°C, luego 15 min a 70°C
Protocolo para RT-qPCR	
Condiciones para la reacción completa	5 min a 95 °C, 40 ciclos de 30 seg a 95°C y 1 min 60 °C
Volumen de reacción y cantidad de ADNc	20µl reacción, 20-200 ng de ARN
Concentraciones de oligonucleótidos, Mg ⁺² y dNTPs	3 mM Mg ²⁺ , 200 nM oligos, 0,2 mM de dNTPs
Polimerasa	<i>Taq Platinum</i> (Invitrogen [®])
<i>Buffer</i>	20 mM Tris-HCL (pH 8,4) y 50 mM KCl
Fabricante del equipo de qPCR	ABI 7500, <i>Applied Biosystems</i>

Tabla 4. Continuación.	
Validación de datos de qPCR	
Especificidad	Análisis mediante geles de agarosa y curvas de disociación en cada corrida de qPCR
Método para determinación de eficiencia de las PCRs	Eficiencia media por amplicón calculada mediante el programa LingRegPCR (Ramakers <i>et al.</i> , 2003).
Análisis de datos	
Programa para análisis de qPCR	ABI 7500 (<i>Applied Biosystems</i>)
Método para determinación de Ct	LinRegPCR
Identificación de datos espúreos	LinRegPCR
Criterios de selección de genes de referencia	Se evaluaron 4 genes de referencia (Actina, Ubi-3, GAPDH y EF-1 α) para ensayos de estabilidad mediante tres algoritmos (ver ítem 2.3.2). Se seleccionó EF-1 α como control interno.
Descripción de método de normalización	(Pfaffl, 2001) $R = \frac{E_{target}^{(control\ Ct\ mean - sample\ Ct\ mean)_{target}}}{E_{reference}^{(control\ Ct\ mean - sample\ Ct\ mean)_{reference}}}$ Implementado mediante la interface multivariada fgStatistics.
Número de réplicas técnicas	3
Número de replicas biológicas	5 a 7
Método de análisis estadístico	Prueba de permutaciones de a pares (5000)
Programa	fgStatistics
Repetibilidad (variación intra-ensayo), error estándar de Ct	0,17

Se define eficiencia de una reacción de PCR como la capacidad de amplificación de un determinado producto en cada ciclo de amplificación, es decir, en una situación ideal, la cantidad de producto debería duplicarse, siendo el modelo matemático $N_c = N_0 (1+E)^C$, donde N_c es la cantidad de producto luego de C reacciones, N_0 es la cantidad inicial de templado, E es el porcentaje de ADNc obtenido por ciclo de amplificación (entre 0 y 1) y n el número de ciclo. Para la selección del método de determinación de eficiencia de las qPCRs se utilizó el programa LinRegPCR (Ramakers *et al.*, 2003). Este método permite la estimación de la eficiencia a través de la medición de fluorescencia por muestra en cada ciclo de reacción. Este enfoque se basa en la linealización (mediante logaritmo) de la fórmula básica de amplificación exponencial por PCR, generando el siguiente algoritmo: $\text{Log}(N_c) = \text{Log}(N_0) + \text{Log}(E) \times C$, donde N_c es la fluorescencia medida en cada ciclo y C el número de ciclos de PCR. La parte lineal logarítmica de los datos de PCR se puede determinar para cada muestra mediante la selección de un límite inferior y un límite superior de una “ventana de linealidad”. La intersección $\text{Log}(N_0)$ y la pendiente $\text{Log}(E)$ se calculan mediante un análisis de regresión lineal. La concentración inicial deriva directamente de la intersección de la regresión lineal ($N_0 = 10^{\text{intersección}}$) y se

expresa en términos de fluorescencia. La eficiencia individual de cada reacción se expresa como ($E_f = 10^{\text{pendiente}}$) y se puede utilizar como un control de calidad para excluir posibles contaminaciones. Es importante también considerar que en los ciclos iniciales de la qPCR, los valores de fluorescencia no pueden ser estimadores de la línea de base, ya que estos son aleatorios y podrían introducir errores que luego se trasladan a la estimación de la eficiencia. Para estimar correctamente la fluorescencia de la línea de base Ruijter *et al.* (2009) desarrollaron un algoritmo que permite calcular la línea de base mediante la reconstrucción de la fase log-lineal partiendo desde el final, es decir desde la fase *plateau* de la curva de fluorescencia de cada reacción de PCR. Este algoritmo fue incorporado al programa LinRegPCR, reduciendo la variabilidad de los resultados ocasionada por errores en la estimación de la eficiencia.

El método de normalización utilizado para calcular el valor de expresión relativa de un gen específico en una muestra con respecto a un control se realizó de acuerdo al algoritmo desarrollado por Pfaffl *et al.*, (2001). Este modelo matemático permite determinar la cuantificación relativa de un gen específico (X) en comparación con un gen de referencia (REF). El valor de expresión relativa (R) de un gen en una muestra se calcula en base a la eficiencia (E) y la desviación (Ct , definido como el ciclo de PCR en el que la fluorescencia supera el valor umbral o *threshold*, es decir, el número del ciclo donde se da la intersección $Log(N_0)$ de una muestra de interés frente a un control, expresado en comparación con un gen de referencia).

$$R = \frac{(E_X)^{Ct_X \text{ control} - Ct \text{ muestra}}}{(E_{REF})^{Ct_{REF} \text{ control} - Ct \text{ muestra}}} = \frac{(E_X)^{\Delta Ct_X (\text{control} - \text{muestra})}}{(E_{REF})^{\Delta Ct_{REF} (\text{control} - \text{muestra})}}$$

R se expresa como la relación entre el nivel de expresión de un gen específico en una muestra con respecto a un control en comparación con un gen de referencia. E_X es la eficiencia de la RT-qPCR del gen específico; E_{REF} es la eficiencia de la RT-qPCR del gen de referencia; $\Delta Ct_X^{(\text{control} - \text{muestra})}$ es la diferencia en el ciclo umbral de la muestra versus el control para el gen específico y $\Delta Ct_{REF}^{(\text{control} - \text{muestra})}$ es la diferencia en el ciclo umbral de la muestra versus el control para el gen de referencia. Para la selección del gen de referencia ver ítem 2.3.3.

2.3.3. Selección de genes de referencia para estudios de expresión génica mediante RT-qPCR

Para realizar estudios de cuantificación relativa de niveles de ARNm se emplea usualmente la técnica de PCR en tiempo real (RT-qPCR). En el caso de este trabajo, se utilizó para validar la información obtenida mediante los análisis de microarreglos y para extender los análisis de expresión génica. Con el objetivo de obtener datos expresión relativa confiables y de alta repetibilidad, es de vital importancia seleccionar genes de referencia endógenos, cuya expresión permanezca estable en todas las etapas del desarrollo, tipos celulares y condiciones específicas, para ser empleados como controles internos en la normalización de los datos.

En este trabajo se seleccionaron cuatro genes de referencia para realizar análisis de estabilidad, entre ellos el factor de elongación 1α (EF-1 α , SGN-U446573), ubiquitina 3 (UBI-3, SGN-U440543), actina (ACT, SGN-U431117) y gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH, SGN-U448919). Se obtuvieron oligonucleótidos para cada uno de los genes candidatos y se llevaron a cabo cuatro reacciones de RT-qPCR diferentes (una para cada gen candidato) a partir de cuatro réplicas biológicas de todas las líneas

transgénicas (CP^{T42W}, MP, MPxCP^{T42W} y mp_xcp^{T42W*}) y los controles salvajes (SX). Los datos de fluorescencia fueron procesados mediante el *software* LinRegPCR y los valores de Ct fueron utilizados para analizar la estabilidad de expresión mediante tres métodos diferentes: *geNorm* 3.5 (Vandesompele *et al.*, 2002), *Normfinder* 0.953 (Andersen *et al.*, 2004) y *Bestkeeper* v1 (Pfaffl *et al.*, 2004).

GeNorm es una aplicación *visual basic* (VBA) para *Microsoft Excel* que permite ordenar los genes bajo estudio asignándoles un índice de estabilidad M. De acuerdo a este ordenamiento, EF-1 α fue el más estable, con un valor M= 0,61, seguidos estuvieron UBI-3, GAPDH y ACT. Sin embargo, según esta herramienta, todos los genes evaluados son adecuados, ya que mostraron valores de M < 1,2 (Fig 2.3 A). *Normfinder* analiza la estabilidad de expresión mediante un modelo matemático que considera las variaciones intra e intergrupos de datos. Este método también consideró al gen EF-1 α como transcripto más estable (valor de estabilidad= 0,17) seguido de UBI-3. Sin embargo, consideró que GAPDH es el gen menos estable (Fig 2.3 B). Finalmente, la aplicación *Bestkeeper* v1 analiza la variabilidad de expresión mediante la estimación del desvío estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV) de cada gen y luego realiza comparaciones de a pares considerando un gen de referencia ideal que denomina *bestkeeper*. A diferencia de los anteriores, esta aplicación estableció que UBI-3 es el gen de referencia más estable, con un valor de desvío estándar, SD= 0,49, seguido de EF-1 α , con SD= 0,51. Por otra parte, consideró que el transcripto menos estable es GAPDH (Fig 2.3 C) y cuando realizó las comparaciones de a pares con respecto a un gen de referencia ideal, los mejores coeficientes de correlación fueron obtenidos por GAPDH (R= 0,942) y EF-1 α (R= 0,922), ambos con p= 0,001 (Fig 2.3 D). Para finalizar la evaluación de los cuatro genes de referencia candidatos se graficó la totalidad de los valores de Ct con la finalidad de comparar los niveles de expresión de cada gen. Los mayores niveles de expresión fueron alcanzados por EF-1 α y GAPDH, aunque este último fue visiblemente más variable (Fig 2.3 E). Luego de una evaluación exhaustiva se decidió utilizar el gen de referencia EF-1 α , pues de acuerdo a las dos primeras aplicaciones fue el más estable, mostró un alto grado de correlación con respecto a un gen de referencia ideal y sus niveles de expresión fueron los más elevados.

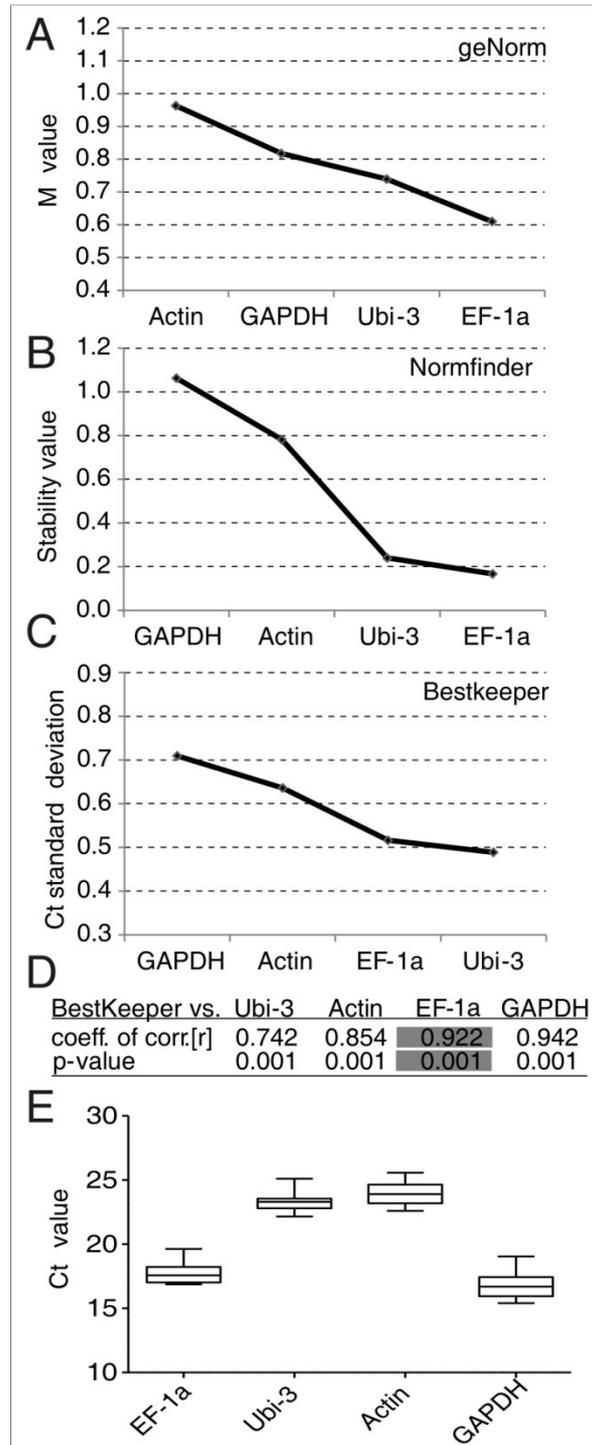


Figura 2.3. Evaluación de estabilidad de genes de referencia mediante las aplicaciones estadísticas A) *geNorm*, B) *Normfinder* y C) *BestKeeper*. En los tres gráficos, los genes están ordenados de menor (izquierda) a mayor (derecha) estabilidad. D) Comparación entre los diferentes genes candidatos con respecto al gen de referencia ideal calculado por el programa *Bestkeeper*. E) Valores de Ct de los cuatro genes candidatos EF-1 α , UBI-3, ACT y GAPDH, obtenidos por RT-qPCR y procesamiento de datos en LinRegPCR.

2.3.4. Validación de análisis de microarreglos mediante RT-qPCR

Con el objetivo de validar los datos obtenidos a partir del análisis de microarreglo entre MPxCP^{T42W} y mp MCP^{T42W*}, se empleó la técnica de RT-qPCR y se analizó la expresión de los 28 genes de tabaco que presentaron expresión diferencial. Se

cuantificaron los niveles de expresión relativa de 23 transcritos (que pudieron ser amplificados por PCR) en la línea transgénica MPxCP^{T42W} con respecto a la línea control mpxcp^{T42W*} y se utilizó como gen de referencia el EF-1 α , previamente seleccionado. A su vez, de estos 23 genes, fue posible validar la expresión de 19 de ellos (Fig 2.4). Por lo tanto, se pudo confirmar un 69% de la información obtenida en el análisis de microarreglos. Este porcentaje es elevado considerando que se utilizó una matriz de tomate para ser hibridada con material genético de tabaco.

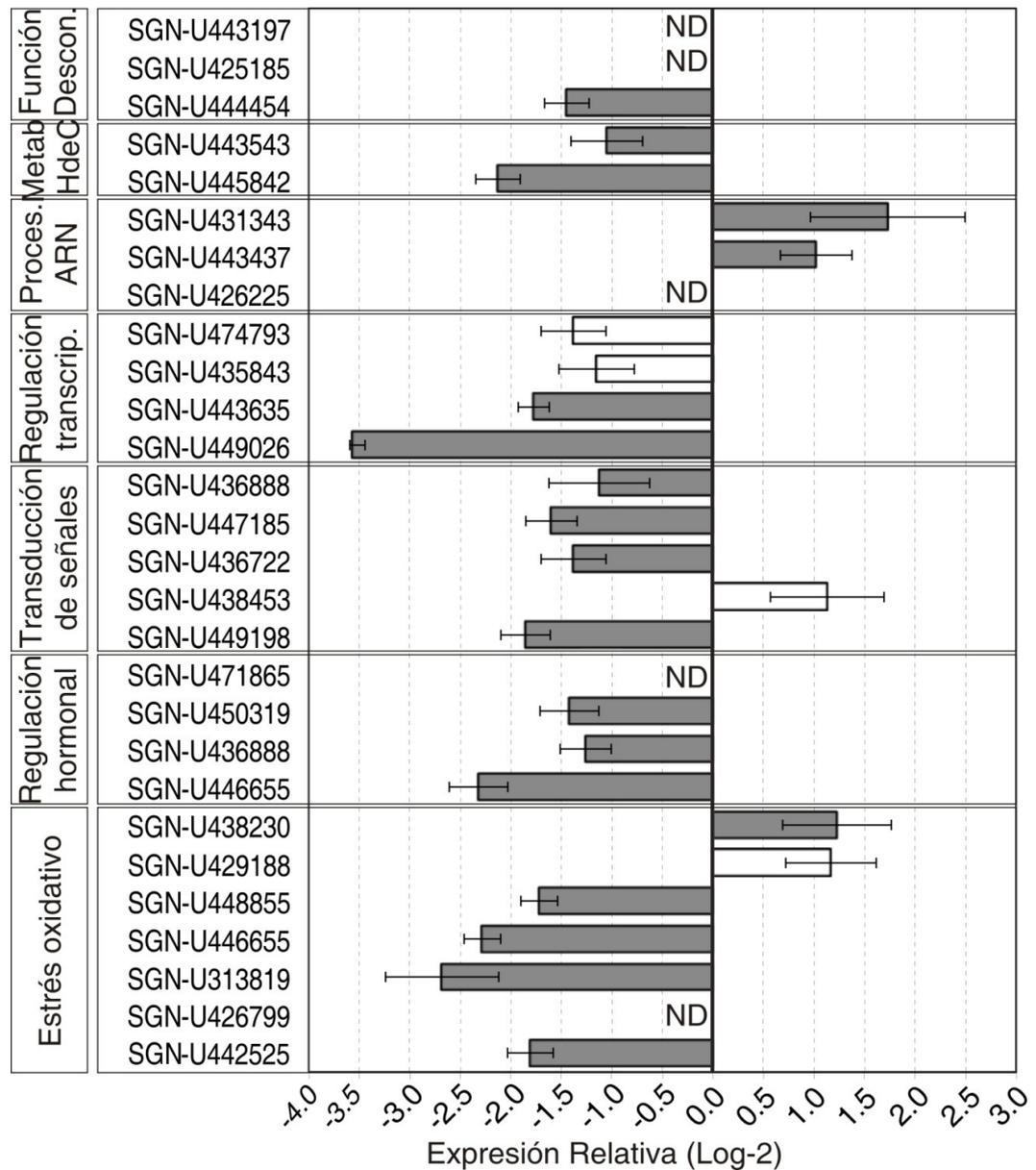


Figura 2.4. Gráfico de análisis de expresión relativa obtenido mediante RT-qPCR. Se efectuó la validación de los 28 transcritos diferencialmente expresados de acuerdo al análisis de microarreglos. Las barras indican los niveles de expresión diferencial (log-2) de genes entre las líneas MPxCP^{T42W} y mpxcp^{T42W*}. Las barras grises corresponden a transcritos que pudieron ser validados, las barras blancas muestran genes cuya expresión fue diferente a la obtenida por el análisis de microarreglos y ND corresponde a aquellos transcritos que no pudieron ser amplificados por PCR. Se utilizó como control interno el gen de referencia EF-1 α .

2.4. Discusión

Existen en la bibliografía numerosos trabajos en los que se han determinado los perfiles globales de expresión génica de plantas infectadas con diversos virus, donde se utiliza la tecnología de microarreglos (Golem y Culver, 2003; Whitham *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2012) y mucho más recientemente se ha comenzado a utilizar la tecnología de *RNA-seq* (secuenciación masiva de ARNs) (Hillung *et al.*, 2012). Por otra parte, se han publicado trabajos donde se realizaron meta-análisis de datos de numerosos microarreglos en simultáneo, donde se integran datos provenientes de perfiles de expresión diferencial de genes en respuesta a muchas infecciones virales de distinta naturaleza (Postnikova y Nemchinov, 2012; Rodrigo *et al.*, 2012). En todos los trabajos se detectaron una gran variedad de cambios en la expresión de genes, tanto sobre-expresados como reprimidos, implicados en procesos biológicos diversos como biosíntesis y metabolismo, pared celular, fotosíntesis, transducción de señales, respuestas a estreses bióticos y abióticos y defensa. Consecuentemente, existe un gran conjunto de genes que se alteran durante el transcurso de una infección viral y existen muchos mecanismos comunes entre los diferentes virus. De acuerdo al perfil global de expresión diferencial obtenido en este trabajo, se comprobó que numerosos genes alterados están implicados en procesos biológicos similares a los descritos en trabajos anteriores, aunque sus niveles de expresión (aumentada o reprimida) muchas veces es opuesta, indicando que la expresión de CP^{T42W} y MP podría producir efectos diferentes en la expresión génica de tabaco a la observada en la infección sistémica de TMV. A nivel global, se pudo observar que muchos de los genes diferencialmente expresados en la línea MPxCP^{T42W} mostraron niveles de expresión disminuidos con respecto a los controles mp_{xcp}^{T42W*}. Ya ha sido previamente estudiado que los virus son capaces de modificar las demandas del huésped para favorecer su replicación mediante la disminución de la expresión de genes específicos del mismo (Aranda y Maule, 1998). Este efecto fue denominado *shut off* y en plantas incluye varios aspectos que comprometen la fisiología y la defensa de amplio espectro (Havelda y Maule, 2000; Maule *et al.*, 2002; Pallas y Garcia, 2011; Bazzini *et al.*, 2011). El *shut off* ha sido descrito como un efecto transitorio que ocurre durante etapas de replicación viral intensa. Sin embargo, Havelda *et al.* (2008) demostraron que algunos virus de ARN inducen la disminución de la expresión de genes cuando el virus no se encuentra en etapas de replicación activa. Inclusive, demostraron que el *shut off* puede persistir por varias semanas. Los datos obtenidos a partir del análisis de microarreglo y su confirmación mediante RT-qPCR demuestran que la expresión estable de ambas proteínas virales, CP^{T42W} y MP en tabaco parece inducir un efecto *shut off* específico y persistente, afectando la expresión de genes implicados en la regulación redox, biosíntesis de ácido ascórbico y regulación de hormonas involucradas en mecanismos de defensa. En los meta-análisis de datos realizados por Postnikova y Nemchinov (2012) se observa que las etapas tempranas no sintomáticas, de infecciones virales compatibles, se caracterizan por presentar una inducción masiva de genes implicados en procesos biosintéticos y metabólicos, fotosintéticos y de respuesta a estreses bióticos y abióticos. Sin embargo, cuando las plantas han sido invadidas sistémicamente, se produce una represión en la expresión de genes de respuesta a estrés, incluyendo defensa inmune, estrés oxidativo y también deposición de calosa y pared celular. Este efecto parece ser similar al observado en las plantas de la línea MPxCP^{T42W} aunque en este caso es absolutamente independiente de la replicación viral activa por tratarse de la expresión estable de únicamente dos proteínas virales. Asimismo, este efecto es independiente de la depleción de recursos del huésped que es habitual cuando las demandas del virus re direccionan los mismos a favor de la

síntesis de proteínas y ácidos nucleicos virales (Bazzini *et al.*, 2011), dado que la acumulación de CP^{T42W} y MP en la línea transgénica de tabaco es significativamente menor que en la infección sistémica con TMV (Bazzini *et al.*, 2007).

Los genes que mostraron disminuida su expresión pertenecen a diferentes categorías funcionales. Por ejemplo, en el subgrupo de genes implicados en estrés oxidativo, que incluye vías de detoxificación de especies reactivas de oxígeno, CSD2 y APX1 mostraron reducciones en su expresión. Del mismo modo, genes implicados en la biosíntesis de compuestos antioxidantes como el ácido ascórbico (GMP1 y un putativo transportador de ascorbato similar a AtNAT6) también resultados reprimidos. Asimismo, los transcritos validados en los subgrupos de respuesta a hormonas, transducción de señales, regulación transcripcional y metabolismo también muestran niveles de expresión reducida. Esto sugiere que la presencia de las proteínas CP^{T42W} y MP podría estar modulando estas vías a través de la regulación transcripcional de los genes implicados en las mismas. Por el contrario, este efecto *shu off* no se observó en todos los genes, dado que un subgrupo de genes implicados en procesamiento y degradación de ARN mostró incrementos en sus niveles de expresión (un putativo componente del ARN exosoma y una ARN helicasa RH51). Esto último permite hipotetizar que la presencia de CP^{T42W} y MP, sin función supresora del silenciamiento comprobada, podría estar modulando indirectamente los mecanismos de degradación de ARN o como contraparte, la planta podría activar su expresión como mecanismo de defensa antiviral.

La verificación y validación de los resultados obtenidos mediante análisis de microarreglos a través de otra técnica de cuantificación de ARN independiente es un elemento deseable en todo experimento. Para ello pueden ser utilizadas las técnicas de *Northern blot*, hibridación *in situ* o RT-qPCR. Se ha determinado que la reacción de RT-qPCR es la técnica más conveniente para efectuar este tipo de validaciones (Rajeevan *et al.*, 2001; Qin *et al.*, 2006) y estudios previos muestran que la correlación entre los datos obtenidos utilizando microarreglos *Affymetrix* (procesados mediante el método RMA y el algoritmo MAS 5.0) y RT-qPCR es generalmente robusta ($r = 0,89$) (Dallas *et al.*, 2005). En la bibliografía, se encontraron numerosos trabajos que utilizan la técnica de RT-qPCR para verificar los resultados obtenidos mediante análisis de microarreglos (Jain *et al.*, 2008; Soitamo *et al.*, 2011).

Con respecto a la puesta a punto y ajuste de protocolos para la confección de RT-qPCRs se consideraron aspectos relacionados a la selección de un método confiable de estimación de eficiencias de PCR, normalización de los niveles de expresión relativa precisos y selección de genes de referencia para utilizar como control interno.

En primer lugar, se decidió utilizar el programa LinRegPCR porque considera la eficiencia de cada PCR individualmente, luego promedia los datos y no requiere de la elaboración de curvas estándar, utilizando un conjunto de diluciones seriadas de una muestra y mediante la fórmula $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$, donde la pendiente se calcula mediante una regresión lineal de la concentración de la dilución seriada versus el Ct de cada dilución (Rasmussen *et al.*, 2001). Este método presenta diversos inconvenientes, como errores en la asignación de la línea de base o *threshold* obtenido manualmente o establecido arbitrariamente por el programa que utiliza el equipo de RT-qPCR (Tichopad *et al.*, 2003; Liu y Saint, 2002). Pueden generarse defectos en el cálculo de expresión relativa debido al uso de un valor de eficiencia calculado en una corrida de PCR y extrapolado posteriormente a otros experimentos independientes, siendo que cada reacción puede variar en función de diversos factores, como los reactivos utilizados en cada corrida (Farriol y Orta, 2005). Los métodos que se plantean como alternativa para superar estos inconvenientes son muy laboriosos y costosos. El primer método consiste en elaborar una curva estándar y un valor de eficiencia por cada corrida individual y el

otro método consiste en utilizar una curva de calibración promedio, derivada del conjunto de datos obtenidos durante un año de corridas (Ovstebo *et al.*, 2003). Por todos estos motivos se consideró que el método utilizado por el programa LinReg es el más adecuado para la estimación de la eficiencia de amplificación.

Por otra parte, se seleccionó el método de normalización desarrollado por Pfaffl *et al.* (2001) dado que se consideró el más adecuado y preciso por involucrar la eficiencia de PCR en la cuantificación de la expresión relativa. Existen otros métodos como el desarrollado por Livak y Schmittgen (2001), denominado $2^{-\Delta\Delta Ct}$, cuyo modelo matemático es similar al desarrollado por Pfaffl *et al.* (2001), aunque no considera el valor de eficiencia, es decir requiere que los genes analizados (el gen de interés y el de referencia) tengan la misma eficiencia. Esto muchas veces en la práctica es difícil de lograr y podría ser un factor introductor de errores en la normalización y la cuantificación relativa.

Posteriormente, para decidir qué genes de referencia utilizar como control interno se realizó una evaluación enfocada al sistema en estudio. La estabilidad de un gen de referencia es muy importante para los análisis de expresión mediante RT-qPCR (Guenin *et al.*, 2009). De acuerdo a los resultados obtenidos por diversos trabajos, se suelen considerar para el análisis de estabilidad genes *housekeeping*, dado que son necesarios en todos los tejidos y estadio ontogénico. Estudios de estabilidad de potenciales genes de referencia en plantas de tabaco en diferentes estadios del desarrollo y bajo condiciones de estrés abiótico demostraron que entre 8 candidatos los más estables son L25 y EF-1 α (Schmidt y Delaney, 2010). En otro estudio realizado en plantas de papa (*Solanum tuberosum*) evaluadas en condiciones de estrés biótico y abiótico, las determinaciones de estabilidad realizadas también indicaron que el gen EF-1 α es el más estable (Nicot *et al.*, 2005). Sin embargo, tejidos foliares y de raíz de plantas de tomate sometidas a infecciones con 5 virus no emparentados y un viroide indicaron que mediante los algoritmos utilizados, los genes más estables son gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y ubiquitina mientras que los que mostraron niveles altamente variables son el ARN ribosomal 18S y el EF-1 α (Mascia *et al.*, 2010). El análisis de estabilidad de genes de referencia realizado por Lilly *et al.*, (2011) en Arabidopsis infectadas con virus (grupos de plantas infectadas con 5 virus diferentes) donde se evaluaron genes candidatos, se seleccionaron como más estables una proteína F-box y el gen EF-1 α . No obstante, en el trabajo de Havelda *et al.*, (2008) se demuestra claramente que ciertos virus a ARN, entre los cuales el TMV no fue evaluado, provocan una disminución persistente en la expresión de los genes gliceraldehído fosfato deshidrogenasa A y Tub2. Si bien en la bibliografía se dispone de una gran cantidad de trabajos donde se ha estudiado la estabilidad de expresión de diferentes genes candidatos bajo diversas condiciones experimentales, existen pocas coincidencias acerca de cuál es el gen de referencia más adecuado para cada situación particular en estudio. Es por esta razón que se decidió evaluar cuatro candidatos en el sistema de estudio de este trabajo.

Para finalizar, la etapa del análisis estadístico de los datos de RT-qPCR, donde se evaluó si las diferencias de expresión entre una muestra y un control fueron significativas, se realizaron mediante el uso del programa fgStatistics. Existe en la bibliografía una robusta herramienta para el análisis de datos de expresión relativa denominada REST© (Pfaffl *et al.*, 2002) que utiliza como modelo matemático el algoritmo desarrollado por Pfaffl *et al.*, (2001) e incluye un test estadístico de randomización de a pares (*Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*©). Sin embargo, en este trabajo se decidió utilizar la herramienta fgStatistics (Grupo Infostat) dado que utiliza las mismas herramientas que el anterior, pero a diferencia de éste considera el error introducido en el valor de Ct tanto por las réplicas biológicas de cada

tratamiento como por las réplicas técnicas. La herramienta REST[©] considera un valor de Ct representativo de cada réplica biológica como el promedio de las réplicas técnicas sin tener en cuenta esta importante fuente de variación.

2.5. Conclusiones

En conclusión, los resultados obtenidos en este capítulo han podido demostrar que:

- La expresión transgénica de las proteínas virales CP^{T42W} y MP en plantas de tabaco son capaces de producir alteraciones en el perfil global de expresión génica.
- Los genes cuyo nivel de acumulación se encontró alterado pertenecen a vías metabólicas relacionadas con estrés oxidativo, respuesta a hormonas, señalización, regulación de la transcripción, procesamiento de ARN, metabolismo y fotosíntesis. Los dos primeros grupos mostraron niveles de expresión disminuidos, sugiriendo que las plantas MPxCP^{T42W} presentarían un *shut off* específico independiente de la replicación viral. Por otro lado, los aumentos de expresión de los genes implicados en el procesamiento y degradación de ARN sugieren que la planta estaría activando mecanismos antivirales o de contradefensa.
- Con el objetivo de verificar los resultados obtenidos por el análisis de microarreglos se evaluaron críticamente y se pusieron a punto protocolos para realizar cuantificaciones de expresión relativa de genes mediante RT-qPCR, que involucran diversas etapas de experimentación y análisis.
- Finalmente, se logró validar la expresión del 69% de los genes obtenidos por el análisis de microarreglos.

En este capítulo se establecieron los puntos de partida que enmarcan el eje de este trabajo. La información obtenida en el análisis de microarreglos permitió la generación de las hipótesis que son estudiadas con mayor detalle en los siguientes capítulos.

CAPÍTULO 3

**Estudio del efecto de MP y CP^{T42W} en la defensa basal e innata
y en la respuesta a diferentes estreses bióticos**

3.1. Introducción

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de microarreglos, el perfil global de expresión diferencial de genes demostró que en las plantas de la línea MPxCP^{T42W} un grupo de genes reducen su expresión con respecto a los controles mp_{xcp}^{T42W*}. Estos resultados llevan al interrogante de determinar si este efecto, que también parece ser específico de algunos procesos biológicos, es similar en plantas de las líneas CP^{T42W} y MP individuales. De esta manera se podría asignar roles específicos a cada una de las proteínas virales en la interacción planta-virus y también determinar si el impacto de la co-expresión es una sumatoria de los efectos individuales o un producto diferente y exclusivo del complejo formado por CP^{T42W} y MP (Asurmendi *et al.*, 2004). Como se demostró en el capítulo 2, la mayor parte de los genes validados clasificados dentro de los subgrupos más representados, es decir estrés oxidativo (genes de biosíntesis de ácido ascórbico y de detoxificación de ERO) y regulación hormonal (genes posiblemente involucrados en la vía de señalización mediada por SA) mostraron una depresión general en sus niveles de expresión en plantas de la línea MPxCP^{T42W}. Considerando la notable reducción en los niveles de expresión de genes involucrados en estos procesos biológicos, se podría hipotetizar que las proteínas virales son capaces de modular la activación de la defensa del huésped a favor de la replicación viral. Por este motivo, este capítulo se focaliza en el estudio de genes y vías metabólicas asociadas a estrés oxidativo y respuestas de defensa dependientes de hormonas, como SA y JA (dado su rol antagónico en la activación de la defensa). Para extender el estudio de estos mecanismos se seleccionaron otros genes, implicados en la regulación del estado redox y de respuesta a hormonas de defensa en plantas, que no fueron detectados en el análisis de microarreglo. Adicionalmente, se extendió el estudio a las líneas transgénicas parentales, que expresan CP^{T42W} y MP individualmente. Por otro lado se evaluó la respuesta de defensa frente a diferentes tipos de patógenos en plantas de todas las líneas transgénicas y en plantas de tabaco salvajes (SX) con el fin de tener una visión de mayor alcance hacia diferentes respuestas de defensa. Finalmente, se realizaron ensayos funcionales mediante la técnica de VIGS (*Virus Induced Gene Silencing*) en *Nicotiana benthamiana* para determinar si las respuestas observadas en las plantas transgénicas se correlacionan con el efecto producido por genes individuales.

3.2. Material y métodos

3.2.1 Tinciones histoquímicas para determinación de ERO y muerte celular en tejido foliar de tabaco

Se tomaron muestras de hojas de tabaco salvaje y de cada una de las líneas transgénicas (material correspondiente a la cuarta hoja de plantas de 6 semanas de edad). Para realizar tinción histoquímica mediante la técnica de DAB (diaminobencidina), que permite detectar la acumulación de peróxido de hidrógeno, se incubaron los tejidos foliares recientemente colectados en 1 mg.mL⁻¹ de DAB-HCl, pH 3.8, como fue previamente descrito por Thordal-Christensen (1997) con algunas modificaciones. Para la tinción histoquímica con NBT (*Nitroblue Tetrazolium*), que permite detectar la acumulación de iones superóxido, los tejidos foliares recientemente colectados se sumergieron en una solución de NBT 0.1% en 50 mM de fosfato de potasio, pH 7.8, como fue previamente descrito por (Wohlgemuth *et al.*, 2002). Para ambas tinciones, las soluciones fueron infiltradas en los tejidos con auxilio de pequeños pulsos de vacío de 2 minutos y posteriormente incubadas en oscuridad por 16 hs (solución DAB) y 2 hs (solución NBT). El exceso de colorante y los pigmentos foliares fueron removidos mediante sucesivos lavados con etanol (90%, v/v) caliente. Luego, el material fue

observado bajo estereomicroscopio óptico. El peróxido de hidrógeno se visualiza como un precipitado marrón y los iones superóxido se detectan cuando un precipitado de formazán, color azul, aparece depositado en los tejidos foliares. Finalmente, para la detección de muerte celular, los tejidos foliares se llevaron a ebullición durante 30 minutos, en una solución compuesta por 10 mL de ácido láctico 90% (v/v), 10 mL de glicerol 87% (v/v), 10 mL de azul de tripán y 10 g de fenol. Luego, los tejidos fueron aclarados con hidrato de cloral (2.5 mg/mL^{-1}), conservados en etanol 96% (v/v) y examinados bajo microscopía óptica.

3.2.2. Determinación de ácido ascórbico total y ácido dehidroascórbico en tejido foliar de tabaco

El protocolo para determinar ácido ascórbico total (ASC) y su forma oxidada, el ácido dehidroascórbico (DHA) utiliza HPLC con detección electroquímica amperométrica y fue descrito por Diliberto *et al.* (1983). Para la determinación de ASC y DHA se inyectaron muestras en columnas C_{18} de sílica en fase reversa (partículas de 5 μm , 150X4,6 mm, HL90-5s, Bio-Sil, Bio-Rad). La fase móvil compuesta por una solución de KH_2PO_4 (100 mM) a pH 3,0 (con ácido fosfórico) fue corrida isocráticamente con un flujo de 0,5 mL/min. El pico de ASC se observó a 3,5 min. La concentración de ASC total (reducido más oxidado) fue determinada luego de reducir con DTT (1 mM). La cantidad de DHA se determinó como la diferencia entre las áreas de los picos de las formas reducida y no reducida.

3.2.3. Determinación de ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA)

Procedimiento de extracción y purificación: SA y JA fueron extraídos de tejidos foliares liofilizados, de acuerdo al protocolo de Durgbanshi (2005) con algunas modificaciones. Como estándares internos para JA se utilizaron 100 ng de JA ($^2\text{H}_6$)-JA y ácido 12-oxo-fitodienoico ($^2\text{H}_5$) OPDA. Para cuantificar SA se utilizó como estándar interno 100 ng de SA- ($^2\text{H}_6$).

Procedimientos para la cromatografía y espectrometría de masas (LC-ESI-MS/MS): Para la cromatografía líquida de alta performance se utilizó un sistema Waters (Milford, MA) Alliance 2690. Se inyectaron alícuotas de 20 μL en un sistema de columnas C_{18} de fase reversa Nucleosil ODS (100 mm \times 2.1 mm, 3- μm). Las fitohormonas fueron eluidas comenzando con un gradiente inicial de metanol 40% y agua:etanol 60%. Luego, 25 minutos después, con metanol 80% y agua: etanol 20%. La identificación y cuantificación se efectuaron mediante la inserción de efluentes con un *electrospray* de ionización negativa (ESI-MS/MS) dentro de un espectrómetro de masas triple-cuadrupolo (*Quattro UltimaTM*, Micromass) acoplado a HPLC.

Para la identificación, la espectrometría de masa fue operada con MTM (monitoreo de múltiple reacción) y el *software MassLynxTM* v.4.1 (Micromass, Manchester, Inglaterra). Para la cuantificación se utilizó el *software QuanLynxTM* v.4.1 (Micromass, Manchester, Inglaterra). Las determinaciones de SA y JA fueron realizadas en el laboratorio del Dr Sergio Alemán, Departamento de Ciencias Naturales, FCEF-QyN, Universidad Nacional de Río Cuarto (Córdoba).

3.2.4. Procedimiento de infección con TMV

Para inocular plantas de tabaco o de *Nicotiana benthamiana*, se frotó delicadamente una hoja expandida con carborundum y 20 μL de una solución de NaH_2PO_4 20 mM a pH 7, conteniendo viriones de TMV semi-purificados. Para tomar muestras, se procedió a colectar la tercera hoja hacia arriba de la hoja inoculada. La obtención de proteína viral en tejido infectado se realizó mediante una extracción de proteína total de

tejidos foliares con PBS a pH 7.2 y posterior cuantificación con *Quick Start Bradford Protein Assay kit* (Bio-Rad). Para la detección del virus TMV se empleó la técnica de ELISA, como fue previamente descrito por Bazzini *et al.* (2006).

3.2.5. Transcripción *in vitro* de ARN de TMV

Para la transcripción *in vitro* de ARN de TMV, ADNc de ARN viral infectivo se linealizó con KpnI y se transcribió *in vitro* con ayuda de MEGAscript® T7 *in vitro transcription kit* (Ambion). A la reacción se adicionó m7G (5')ppp(5')G *Cap Analog* (Ambion) para sintetizar moléculas de ARN con estructura de capp 5'. El ARN viral fue frotado suavemente en hojas expandidas de plantas de 6 semanas de edad. La toma de muestras y detección se realizó de igual modo que en 3.2.4.

3.2.6. Procedimiento de inoculación con *Pseudomonas syringae*

Cepas bacterianas e infección: las cepas bacterianas de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (cedidas gentilmente por la Dra. Malena Alvarez) fueron cultivadas en medio King's B conteniendo 25 mg/L⁻¹ de rifampicina y 2 mg/L⁻¹ de tetraciclina a 28°C y agitación a 200 rpm por 24 hs y posteriormente se centrifugaron 5 minutos a 4000 rpm. Los sedimentos bacterianos se resuspendieron en MgCl₂ 10 mM y se ajustó la concentración a 10⁸ cfu/mL⁻¹. Se inocularon bacterias en solución, en hojas completamente expandidas de plantas de tabaco de 6 semanas de edad, utilizando jeringas hipodérmicas sin aguja. Los controles fueron inoculados con MgCl₂ 10 mM sin bacterias.

Recuento de bacterias: luego de 48 horas post-infiltración, se colectaron discos foliares de zonas infiltradas y el tejido fue homogeneizado en una solución de MgCl₂ 10 mM, para liberar las bacterias de los tejidos. El contenido de proteína total fue utilizado como medida para ajustar concentraciones equivalentes previamente al recuento bacteriano. La concentración de proteína total se determinó mediante *Quick Start Bradford Protein Assay kit* (Bio-Rad). Se plaquearon 20 µl de diluciones en medio selectivo King's B durante 16 hs a 28°C. Las concentraciones se ajustaron para obtener un número aproximado de 20-400 colonias por placa. El recuento bacteriano fue obtenido a través del cálculo: n° de colonias / volumen placa * factor de dilución.

3.2.7. Procedimiento de inoculación con *Sclerotinia sclerotiorum*

Se cultivó en placas de Petri conteniendo medio PDA (*potato dextrose agar*) un aislado de *Sclerotinia sclerotiorum* (cedido gentilmente por Ing. Agr. Dora Barreto, del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola de INTA Castelar) como fue previamente descrito por Godoy (1990). Luego de 4 días de cultivo, se cortaron discos de ágar de 5 mm de diámetro conteniendo micelios fúngicos. La superficie del disco de ágar conteniendo micelios fue colocada sobre la cara adaxial de hojas de tabaco. Las hojas de tabaco, previamente cortadas fueron mantenidas dentro de placas de Petri con papel de filtro embebido en agua. Las placas se incubaron a 26°C y luz continua. Los síntomas de la infección con *Sclerotinia sclerotiorum* fueron monitoreados cada 24 hs durante un periodo de 6 días.

3.2.8. Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) para ensayos funcionales con el gen GMP1 en *N. benthamiana*

Clonado de un fragmento de GMP1 y construcción del vector para VIGS: para amplificar un fragmento de ADNc de GMP1 en *N. benthamiana*, se utilizaron oligonucleótidos cuyas secuencias fueron: 5'-GTA₂CTCGGCTGAGGCCATTG-3' y 5'-CCAGCAGGTA₂AAT TCCAGCG -3' (de izquierda a derecha). Se obtuvo un fragmento de ADNc de 506 pb que fue clonado en un vector pCR[®]8/GW/TOPO[®] (Invitrogen) y

posteriormente verificado mediante secuenciación. El fragmento de GMP1 fue introducido en un vector pTRV2-GW (Liu *et al.*, 2002) mediante una reacción de recombinación LR (LR *Clonase Enzyme Mix de Invitrogen*). Plásmidos conteniendo el fragmento GMP1 (pTRV2-*gmp1*) fueron electroporados en la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* y cultivados en medio selectivo LB con gentamicina 50 mg/L⁻¹ y kanamicina 50 mg/L⁻¹.

Agroinfiltración y confirmación del silenciamiento: se cultivaron en medio LB selectivo *Agrobacterium* GV3101 transformadas con plásmidos pTRV1, pTRV2-*gfp* (controles) y pTRV2-*gmp1* durante 24 hs a 28°C. Las células fueron centrifugadas y los sedimentos bacterianos se resuspendieron en una solución de MES (10 mM MgCl₂ y 10 mM MES) con 200 mM de acetosyringona, y una OD₆₀₀ de 1. La suspensión fue mantenida a temperatura ambiente durante 3 a 4 hs. Posteriormente, se mezclaron alícuotas equivalentes de GV3101-pTRV1 y pTRV2 con las distintas construcciones (*gfp* o *gmp1*). Se agroinfiltraron plantas de 4 o 5 hojas de *Nicotiana benthamiana* como fue previamente descrito por Liu *et al.* (2002). Se colectaron muestras de tejido foliar 20 días luego de transcurrida la agroinfiltración. Las muestras se congelaron a -80°C y se confirmó el silenciamiento de GMP1 mediante RT-qPCR y oligonucleótidos específicos, que amplifican una región del gen no contenida en el fragmento de 506 pb. Las secuencias de estos oligonucleótidos son 5'-TTCCCAAAAATTGCAGCGG-3' y 5'-CGCAACATCTGGTCCAATCAA-3' (de izquierda a derecha).

3.2.9. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos empleados para realizar comparaciones en los experimentos de determinación de ácido ascórbico, SA y JA y niveles de infección con TMV se realizaron mediante el método *one-way* ANOVA y posterior análisis con *Dunnet post-test* (determinación de ácido ascórbico, SA y JA e infecciones con TMV). Para los análisis de las infecciones con *P.syringae* y *S.sclerotiorum* se utilizó *Kruskal-Wallis* con *Dunns post-test*. Para estos análisis se utilizaron los programas de análisis estadísticos *GraphPad Prism v.5* (<http://www.graphpad.com/>) e *InfoStat* (InfoStat versión 2008. Grupo InfoStat. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). El nivel de significancia fue establecido para todos los análisis fue de $\alpha = 0,05$.

3.3. Resultados

3.3.1. Determinación de ERO y muerte celular

Dada la reducción en la expresión de genes implicados en el balance redox y detoxificación de ERO en plantas de la línea MPxCP^{T42W}, según los perfiles obtenidos de expresión global, se evaluaron los niveles de acumulación de peróxido de hidrógeno e iones superóxido, así como la tasa de muerte celular en tejidos foliares. Se extendió el análisis a las líneas transgénicas parentales de MPxCP^{T42W} y mp_{xcp}^{T42W*}, es decir las líneas CP^{T42W} y MP. Se utilizaron como control plantas salvajes de *Nicotiana tabacum* var. *Xanthi* (SX). Para la determinación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) e iones superóxido (O₂⁻) se utilizaron las tinciones histoquímicas DAB y NBT respectivamente. Los resultados mostraron que las líneas transgénicas MP y MPxCP^{T42W} acumularon niveles más elevados de H₂O₂ y O₂⁻ en relación a las plantas SX. Estos efectos fueron más pronunciados en las plantas MPxCP^{T42W}, así como también, esta línea mostró tasas superiores de muerte celular en tejidos foliares, evaluados mediante tinción histoquímica con azul de tripán (Fig 3.1).

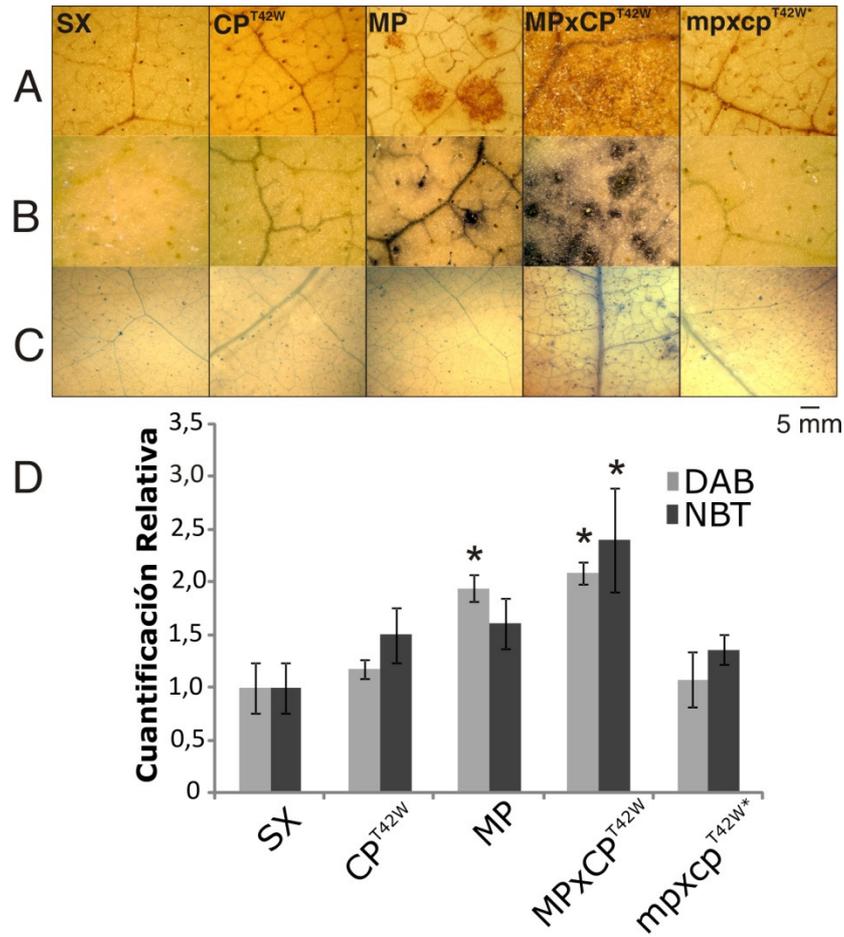


Figura 3.1. Determinación de ERO mediante tinciones histoquímicas en tejido foliar de tabaco de las líneas transgénicas CP^{T42W}, MP, MPxCP^{T42W}, mpxcp^{T42W*} y controles no transgénicos SX. A) Detección de peróxido de hidrógeno mediante tinción con DAB. B) Detección de iones superóxido mediante tinción con NBT. C) Detección de focos de muerte celular mediante tinción con azul de tripán. D) Análisis cuantitativos de A y B) donde se muestran las diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles SX. Los * indican diferencias cuyos p-valores < 0,05.

3.3.2. Determinación de ácido ascórbico total (ASC) y ascórbico reducido (DHA)

El ácido ascórbico es un agente reductor muy importante en las plantas y actúa minimizando los daños causados por la acumulación de radicales libres de oxígeno. Está presente en todos los compartimientos intra y extracelulares. Las plantas MPxCP^{T42W} mostraron reducciones significativas del nivel de acumulación de GMP1, implicada en la biosíntesis de ácido ascórbico. Por este motivo, con la finalidad de evaluar el estado redox en las plantas de las cuatro líneas transgénicas y los controles, se determinaron los niveles de acumulación de ASC total y reducido (la forma reducida constituye usualmente el 90% del ASC total). Los resultados mostraron que las plantas de la línea MPxCP^{T42W} acumulan cantidades significativamente menores de ASC total y consecuentemente de su forma reducida (Fig. 3.2). Dado que estas plantas acumulan más ERO y adicionalmente, tienen su capacidad antioxidante reducida, es lógico observar un fenotipo asociado a estrés oxidativo superior que en plantas de la línea MP, y esto explicaría también el aumento de la tasa de muerte celular observada. Por otra parte, las plantas de la línea mpxcp^{T42W*} mostraron niveles normales de acumulación de ERO, muerte celular y ASC, confirmando que el efecto es consecuencia de la expresión de las proteínas MP y CP^{T42W}. Finalmente, la línea parental CP^{T42W} mostró los mismos niveles

de ERO, muerte celular y ASC que los controles SX, sugiriendo que individualmente es incapaz de generar respuesta de estrés, aunque al ser expresada en conjunto con MP, parece incrementar la severidad del efecto de esta última.

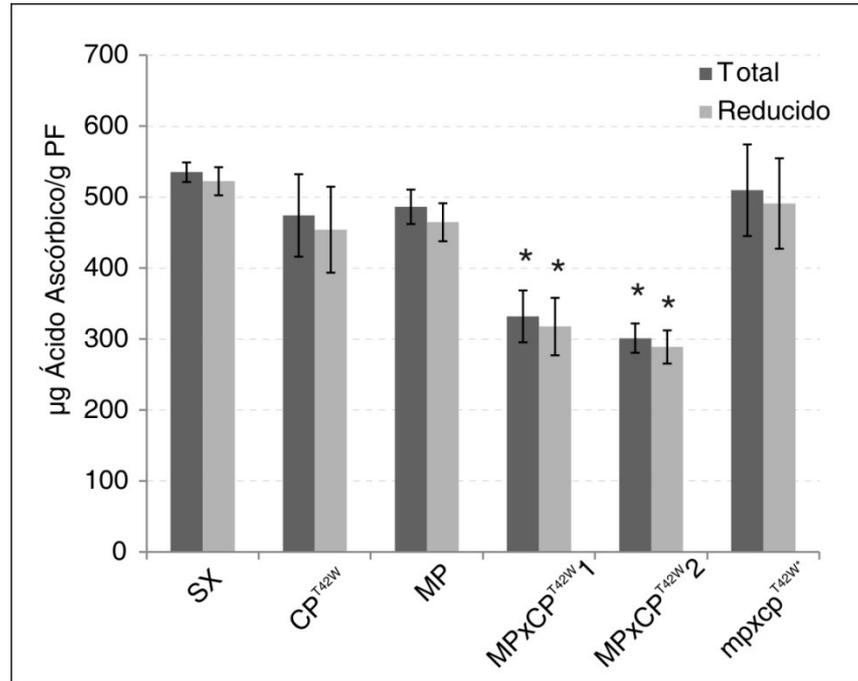


Figura 3.2. Determinación de ácido ascórbico total y reducido (ASC y DHA) mediante cromatografía (HPLC) en plantas de las líneas transgénicas CP^{T42W}, MP, MPxCP^{T42W} (1 y 2) y mpxc^{T42W}. En este caso se utilizaron dos líneas isogénicas 1 y 2 que expresan ambas proteínas virales. Los * muestran las diferencias estadísticamente significativas obtenidas mediante ANOVA con p-valor < 0,05.

3.3.3. Cuantificación relativa de genes implicados en balance redox y detoxificación de ERO.

Para controlar los niveles de ERO y mantener un adecuado balance redox, las células vegetales, dependiendo del estado fisiológico de la planta y del tejido involucrado, activan diversas vías para la producción de compuestos antioxidantes, tales como el ácido ascórbico, glutatión, tocoferoles, etc. Además, muchas otras enzimas forman parte de la maquinaria detoxificante de ERO. En base a los resultados obtenidos en el perfil de expresión génica, que mostró alteraciones de expresión en un grupo de genes implicados en vías de biosíntesis de antioxidantes (GMP1 y un transportador de ASC) y detoxificación (APX y CSD2); y en conjunto con los resultados de las determinaciones de ERO, muerte celular y ASC, se decidió profundizar en el estudio de la regulación génica de mecanismos de respuesta a estrés oxidativo. Para esto se cuantificó la expresión de genes implicados en detoxificación de ERO y biosíntesis de ASC en las líneas transgénicas y los controles SX, mediante RT-qPCR.

En este caso, se incluyeron en el análisis plantas SX infectadas con TMV, en una etapa temprana de la infección (6 dpi, días post-infección), donde el virus no ha alcanzado aún el tejido sistémico y una etapa tardía (18 dpi) en la que se encontraron elevados niveles de acumulación viral. Esta información se obtuvo mediante cuantificación por ELISA de la acumulación de CP de TMV (NC_001367) en los diferentes tiempos de infección con respecto a controles no infectados (Fig. 3.3).

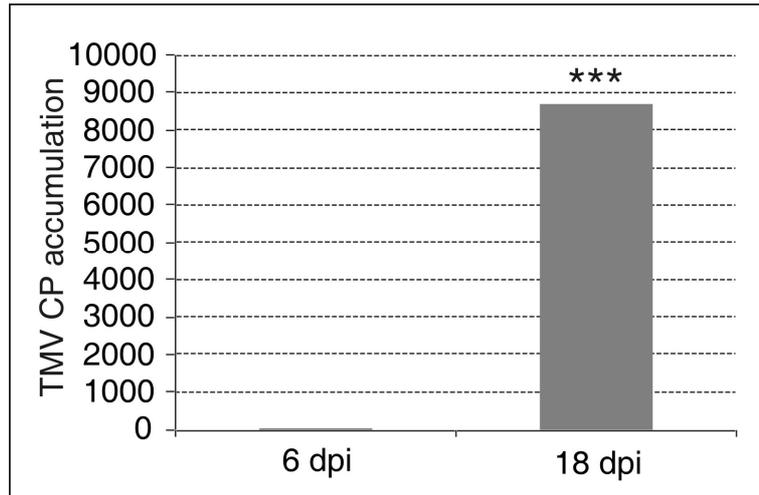


Figura 3.3. Niveles de acumulación de CP de TMV (determinados mediante ELISA) en plantas de tabaco infectadas con TMV a 6 y 18 dpi. A 6 dpi no se detectó acumulación de partículas virales en muestras de tejido sistémico. Los valores corresponden al promedio de 8 plantas por tiempo de muestreo. Las diferencias estadísticamente significativas indicadas por *** corresponden a p-valores < 0,005.

Las cuantificaciones relativas de genes implicados en vías de biosíntesis de ASC y de detoxificación de ERO mostraron que, en primer lugar el gen que codifica para GDP-manosa pirofosforilasa 1 (GMP1) (SGN-U442525), implicada en la biosíntesis de ASC, redujo su expresión en las plantas MPxCP^{T42W} (coincidiendo con los niveles reducidos de ASC) y por el contrario, sus niveles aumentaron en plantas de tabaco infectadas con TMV (18dpi) (Fig. 3.4). En estos análisis se utilizaron dos líneas isogénicas MPxCP^{T42W} 1 y 2, para corroborar los resultados de expresión obtenidos. El gen que codifica para la enzima detoxificante ascorbato peroxidasa citosólica (cAPX1) (SGN-U448855) no mostró niveles de transcripción alterados en las plantas transgénicas ni en plantas de tabaco infectadas con TMV a 6 dpi, aunque resultó sobre-expresada en tabacos infectados a 18 dpi. Por otra parte, la enzima Cu/Zn superóxido dismutasa cloroplástica (CSD2) (SGN-U313819), mostró niveles de transcritos reducidos con respecto a los controles en la línea MPxCP^{T42W} y resultó sobre-expresada en infecciones tardías con TMV. (Fig. 3.4). Finalmente, los niveles de expresión relativa de la oxidasa alternativa (AOX) (SGN-U450832) fueron inferiores en plantas de la línea MPxCP^{T42W} y no mostraron aumentos en las infecciones con TMV (Fig. 3.4). Ninguno de estos genes mostró cambios en los niveles de transcripción en plantas CP^{T42W} y mp MCP^{T42W*}, en coincidencia con los resultados previos, donde no se observaron cambios de acumulación de ERO, muerte celular y niveles de ASC en estas líneas. Al parecer, la reducción de la expresión de GMP1, CSD2 y AOX podría jugar un rol importante en el fenotipo asociado a estrés observado en las plantas MPxCP^{T42W}. Se ha demostrado en trabajos anteriores que cuando una planta sufre una infección sistémica con TMV, los niveles de expresión de genes detoxificantes aumentan drásticamente (Fodor *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2005; Wise *et al.*, 2007). Sin embargo, las plantas que expresan MP no mostraron inducción de ninguno de los genes evaluados, a pesar del desbalance redox que mostraron estas plantas. Más aún, la línea MPxCP^{T42W}, mostró reducción en la acumulación de estos genes. Estos resultados sugieren que al menos la expresión de MP es capaz de producir un desbalance en la activación del sistema de detoxificación de ERO, siendo en parte responsable del desbalance redox observado en las líneas MP y MPxCP^{T42W}. Más interesante aún resulta el efecto de la co-expresión de MP y CP^{T42W}, donde el estrés oxidativo es más severo, probablemente debido a la reducción en la expresión de los genes de detoxificación

evaluados. Esto sugiere que en este caso, la expresión conjunta de MP y CP^{T42W} produce un efecto diferente al observado cuando ambas proteínas se expresan individualmente.

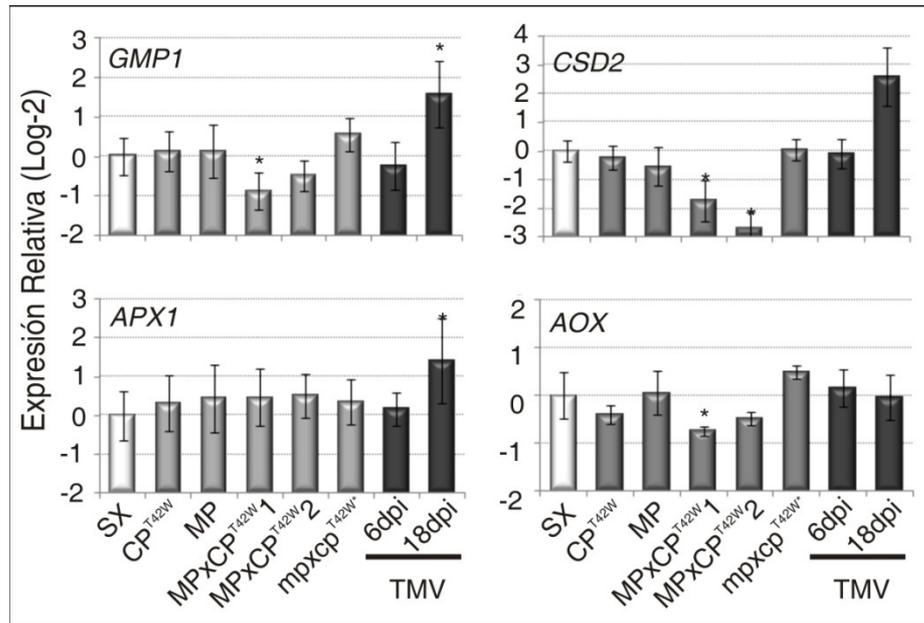


Figura 3.4. Niveles de expresión relativa (Log-2) obtenidos mediante RT-qPCR de GMP1, cAPX1, CSD2 y AOX en tabacos de las líneas transgénicas, tabacos infectados con TMV a 6 y 18 dpi y controles SX., Los gráficos de barras representan la media \pm errores estándar obtenidos a partir de 5 réplicas biológicas de cada línea. Se utilizaron dos líneas isogénicas MPxCP^{T42W} 1 y 2. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas entre líneas transgénicas e infectadas respecto a los controles SX (* p-valores < 0,05 y ** p-valores < 0,01).

3.3.4. Determinación de ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA)

Como fue establecido en el perfil de expresión génica, algunos transcritos implicados en regulación hormonal exhibieron cambios en sus niveles de expresión en plantas de tabaco de la línea MPxCP^{T42W}. El ácido salicílico ha sido ampliamente descrito como una señal hormonal implicada en la defensa en plantas (Durrant y Dong, 2004; Vlot *et al.*, 2009). Se ha demostrado previamente que los niveles de SA aumentan en plantas de tabaco resistentes a infecciones con TMV y esto se vio acompañado de aumentos en la expresión de genes PR (Malamy *et al.*, 1990; Vlot *et al.*, 2009; Grant y Lamb, 2006). También se ha demostrado que el SA interactúa con otras vías de señalización hormonales, como es el caso del ácido jasmónico. Ambos compuestos suelen jugar un rol antagónico en la defensa aunque la relación entre SA y JA es dependiente de dosis (Mur *et al.*, 2006). Por estos motivos se determinaron los niveles de acumulación de SA y JA en plantas de tabaco transgénicas (en este caso se evaluaron las líneas CP^{T42W}, MP y la doble expresante MPxCP^{T42W}) y en los controles SX. Los resultados mostraron que los niveles de SA sufrieron importantes incrementos en las líneas MP y MPxCP^{T42W} y se mantuvieron invariables en las plantas CP^{T42W} (Fig 3.5). Por el contrario, los niveles de JA mostraron reducciones drásticas en las plantas que expresan MP y MPxCP^{T42W} y permanecieron invariables en la línea CP^{T42W} (Fig. 3.5). Estos resultados sugieren que la proteína viral MP sería reconocida por el sistema de defensa de la planta, estaría generando una respuesta mediada por ERO (tal vez mediante el desbalance de la detoxificación) y activando la producción de SA, es decir, podría ser considerada un elicitador de defensa. Por otra parte, cuando se expresa CP^{T42W} de manera

individual, no sería reconocida por el sistema de defensa, pero cuando es co-expresada con MP parecería exacerbar la respuesta elicitada por esta última.

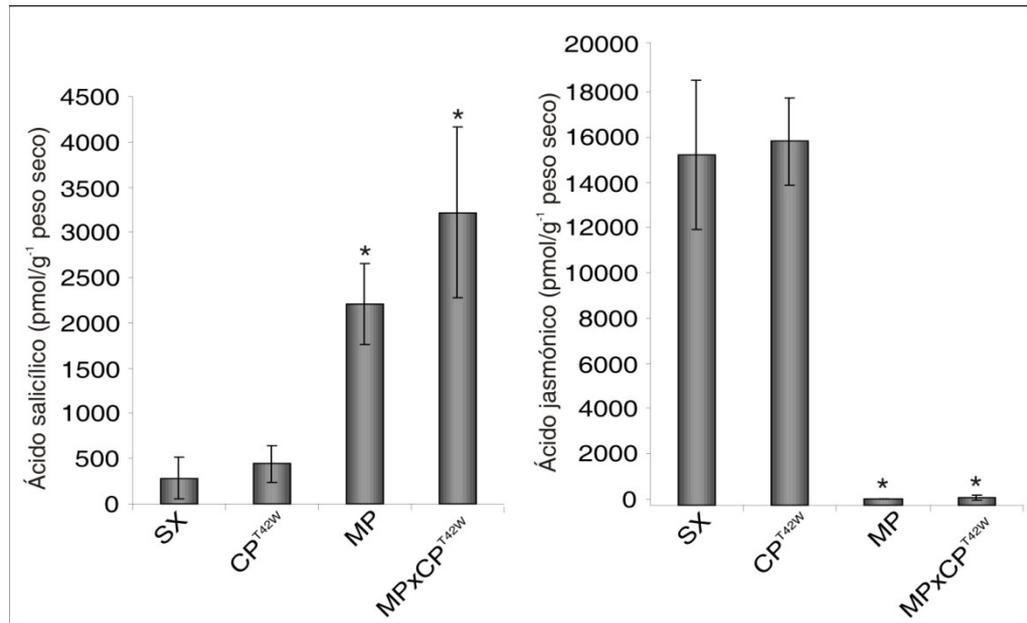


Figura 3.5. Niveles de acumulación de ácido salicílico y jasmónico en tejido foliar liofilizado de tabacos de las líneas transgénicas CP^{T42W}, MP y MPxCP^{T42W} en comparación a los controles SX. Los datos fueron obtenidos mediante determinaciones por HPLC. Los * indican diferencias estadísticamente significativas con p-valor < 0,05.

3.3.5. Cuantificación relativa de genes implicados en respuesta a SA y JA

Con la finalidad de cuantificar los niveles de expresión de genes participantes de la respuesta a ácido salicílico (directa o indirectamente implicados en defensa viral), se realizaron análisis de expresión relativa mediante RT-qPCR en las cuatro líneas transgénicas y los controles (nuevamente se utilizaron dos líneas isogénicas MPxCP^{T42W} 1 y 2). En principio, se cuantificó la expresión de PR-1 (SGN-U444943), PR-2 (SGN-U439941) y PR-5 (SGN-U446829). En concordancia con los resultados de la determinación de SA, los tres genes PR evaluados mostraron incrementos significativos de expresión en las plantas que expresan MP y MPxCP^{T42W} (Fig. 3.6). Respuestas similares fueron observadas en etapas tardías (18 dpi.) de infecciones con TMV. En la línea isogénica mp_{xcp}^{T42W*}, así como en etapas tempranas de la infección con TMV (6dpi) no se detectaron cambios de expresión. Sin embargo, en la línea CP^{T42W}, no solamente no se observaron incrementos, sino que, sorprendentemente, los niveles de PR-1 sufrieron reducciones significativas.

Por otra parte, se cuantificó la expresión de RDR1 (*NtRdRP1*) (SGN-U431860), un gen de respuesta a SA directamente implicado en la defensa contra virus mediante la amplificación de la señal de silenciamiento antiviral (Xie *et al.*, 2001). Este gen resultó sobre-expresado en plantas infectadas con TMV (18 dpi), aunque en las líneas transgénicas, no solamente no mostró incrementos (en MP y mp_{xcp}^{T42W*}) sino que sufrió reducciones significativas en las líneas CP^{T42W} y MPxCP^{T42W} (Fig 3.6). Adicionalmente, se demostró que la expresión transgénica de MP y CP^{T42W} no produce cambios de acumulación de RDR6 (SGN-U437134), otro componente de la defensa antiviral implicado en la amplificación de la señal de silenciamiento (Curaba y Chen, 2008), aunque el análisis de su expresión sugiere una inducción en infecciones con TMV en

etapas tardías. Al parecer, los aumentos de expresión de RDR1 y RDR6 en infecciones virales tardías parecen depender de la presencia de la replicasa viral y no de MP o CP.

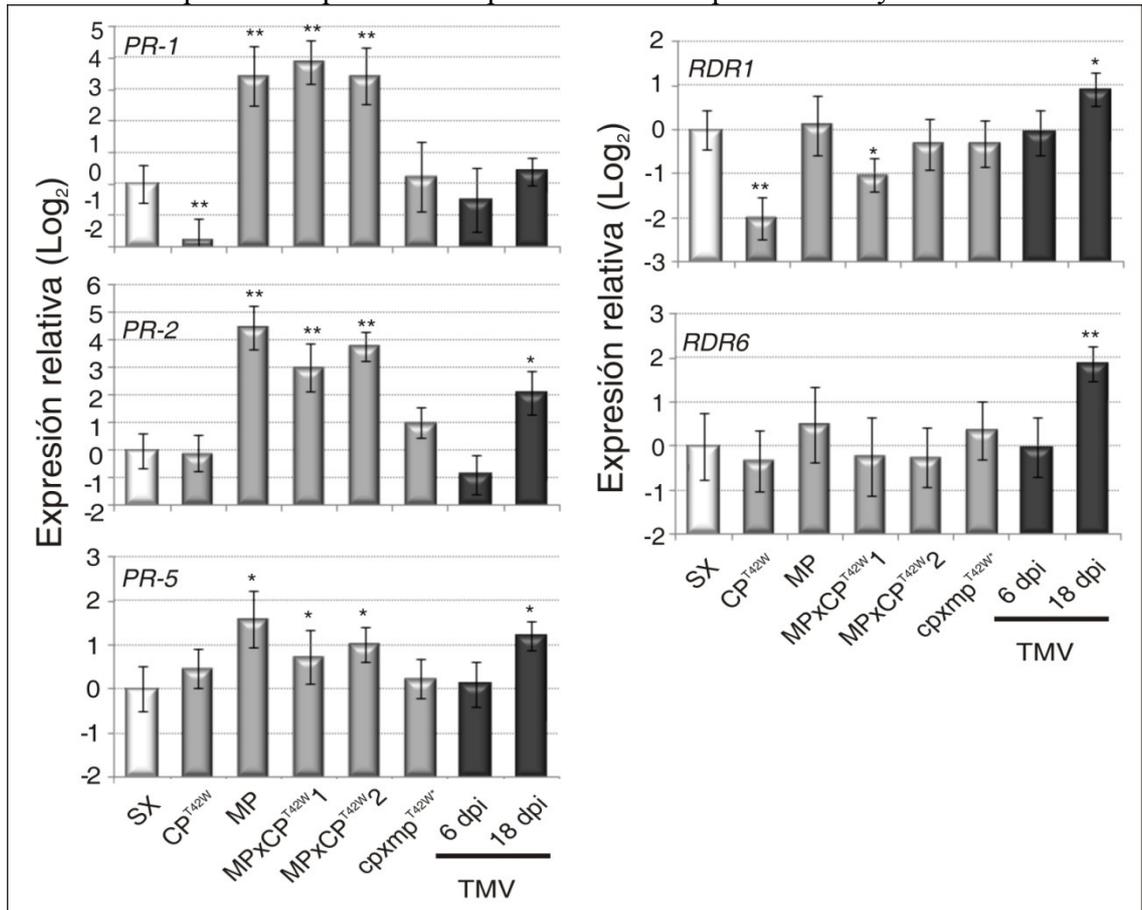


Figura 3.6. Niveles de expresión relativa (log-2) de genes involucrados en la respuesta a ácido salicílico: PR-1, PR-2 y PR-5 y genes responsables de amplificar la señal de silenciamiento antiviral, RDR1 y RDR6 en tabacos transgénicos de las líneas CP^{T42W}, MP, MPxCP^{T42W}, mpmp^{T42W}, junto a plantas infectadas con TMV (6 y 18 dpi) y controles no transgénicos (SX). Las determinaciones fueron realizadas mediante RT-qPCR. Las barras muestran la media y el error estándar de 5 réplicas biológicas. Los asteriscos indican las diferencias significativas entre plantas transgénicas y los controles SX (* p-valor < 0,05 y ** p-valor < 0,01).

Los resultados obtenidos, indicarían que la función de MP como elicitador de defensa también afecta la expresión de genes de respuesta a SA. Por otra parte, la expresión de CP^{T42W} no produjo cambios en la acumulación de hormonas pero fue capaz de modular la expresión de PR-1 y RDR1, reduciendo su expresión. Esto sugiere que la proteína CP^{T42W} podría jugar un rol negativo en la defensa, efecto que en el caso de la expresión de RDR1, superó la inducción por SA en las plantas MPxCP^{T42W}.

A partir de los resultados obtenidos en la caracterización de la defensa mediada por hormonas, es posible concluir que cada proteína viral expresada individualmente mostró ejercer efectos diferentes y a su vez, la co-expresión produjo un resultado que no puede ser explicado por la sumatoria de los efectos individuales. Estos resultados constituyen nuevos aportes a la compleja red de interacción planta-virus.

3.3.6. Evaluación de la respuesta de defensa desarrollada frente a infecciones con ARN desnudo de TMV

Las alteraciones del balance redox y de la activación de genes de defensa en respuesta a la expresión de MP y CP^{T42W} podrían ser responsables de modular diferencialmente la respuesta ante la invasión de las plantas de tabaco con diferentes patógenos. Con el objetivo de explorar los posibles efectos de la expresión individual de CP^{T42W} y MP, así como la co-expresión de ambas proteínas en relación al desarrollo normal de una infección con TMV en tabaco, se inocularon plantas de las cuatro líneas transgénicas y los controles SX con ARN de TMV obtenido mediante transcripción *in vitro*. Se realizó una infección con ARN viral dado que de este modo se puede sobrepasar considerablemente el efecto CP-MR y la replicación viral no se ve afectada.

En dos repeticiones independientes de este experimento, se inocularon 8 plantas de cada línea transgénica y la acumulación viral en tejido sistémico fue cuantificada mediante ELISA a diferentes tiempos post inoculación (6, 8, 10, 15, 20 y 25 dpi) (Fig. 3.7 A). Se monitoreó también el progreso de la infección viral y la severidad de los síntomas (Fig. 3.7 B).

- En plantas de tabaco salvajes (SX), se detectaron partículas virales en tejido sistémico en el 100% de las plantas inoculadas a partir de los 10 dpi, mientras que los niveles de acumulación viral máximos se alcanzaron (dentro del rango evaluado) a 25 dpi.
- Las plantas de la línea CP^{T42W} fueron levemente resistentes a la infección, como ya fue descrito previamente para infecciones con ARN de TMV (Bazzini *et al.*, 2007). Sin embargo, a 25 dpi, se detectaron virus en tejido sistémico en el 80% de las plantas inoculadas, alcanzando niveles moderados de acumulación viral y síntomas leves.
- La línea mp_xcp^{T42W*} fue altamente resistente, solamente en el 60% de las plantas inoculadas se detectaron virus en tejido sistémico en etapas tardías (25 dpi). Además, los niveles de acumulación fueron muy bajos y los síntomas prácticamente imperceptibles.
- Las plantas de la línea MP_xCP^{T42W} fueron ligeramente menos susceptibles a la inoculación con ARN de TMV que las plantas salvajes, contrariamente a lo esperado dada la presencia de la proteína de cápside. Se detectaron virus en tejido sistémico en el 100% de las plantas inoculadas a 10 dpi y los niveles de acumulación alcanzados fueron similares a los de las plantas SX. Sorprendentemente, esos niveles virales fueron los máximos, pues luego de los 10 dpi se observó una caída en la acumulación hasta lograr una recuperación parcial con 80% de plantas infectadas y una reducción significativa de la severidad de los síntomas.

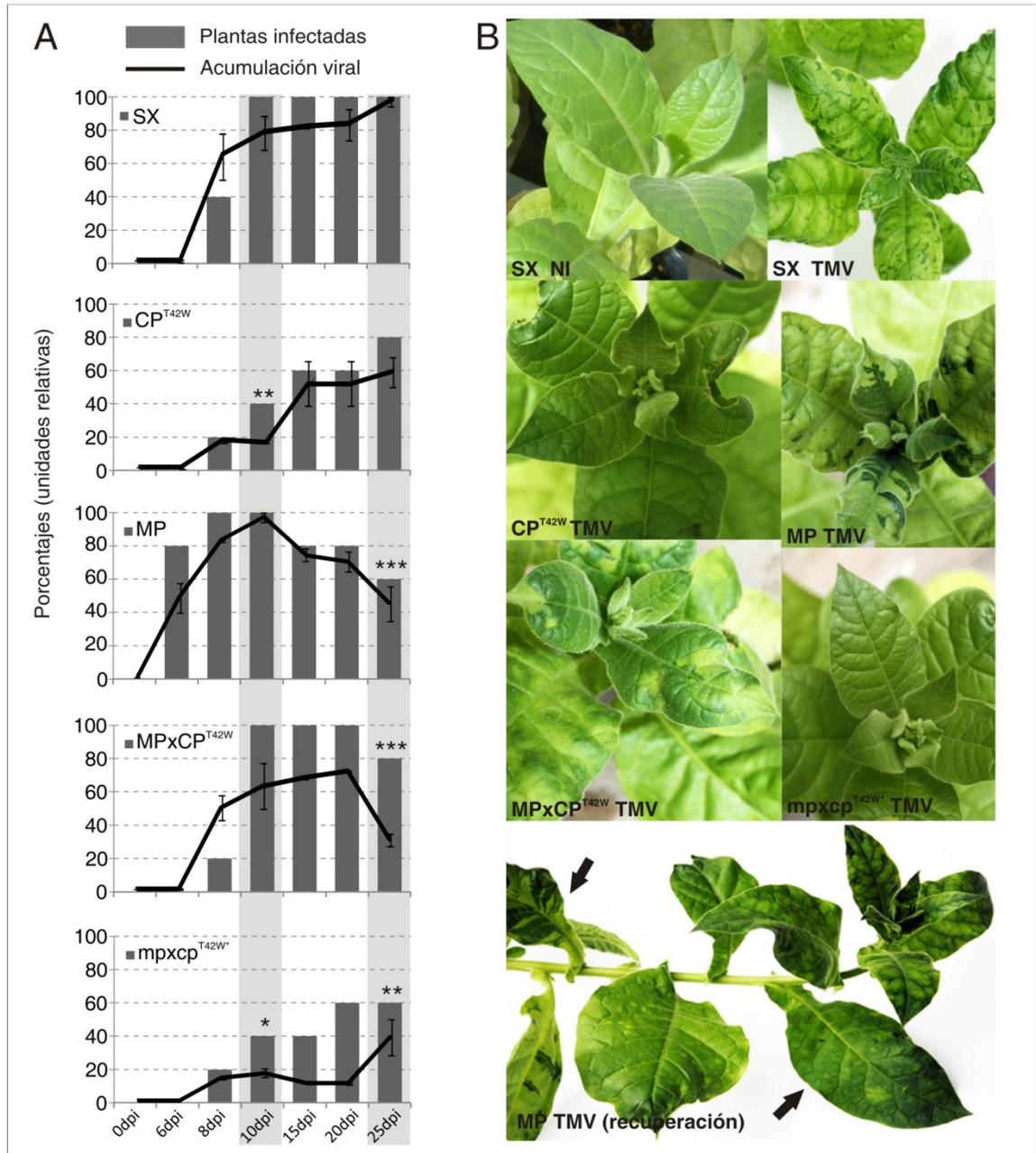


Figura 3.7. Efectos producidos por la infección con ARN desnudo de TMV. A) Los gráficos de barras muestran el porcentaje de plantas infectadas (ELISA positivo) en tiempos sucesivos de la infección. Los gráficos de líneas muestran el nivel de acumulación de CP (valores medios \pm errores estándar de 8 repeticiones por línea) cuantificados por ELISA en muestras tomadas a 0, 6, 8, 10, 15, 20 y 25 dpi. Las sombras grises que destacan los 10 y 25 dpi indican los análisis estadísticos realizados para comparar la acumulación viral entre líneas transgénicas y los controles SX. Los asteriscos indican diferencias significativas * p-valores $< 0,05$ ** p-valores $< 0,01$ y *** p-valores $< 0,005$). B) Síntomas diferenciales desarrollados en las líneas transgénicas y los controles SX a 10 dpi. En el panel inferior se observa la reducción de síntomas (recuperación) en tiempos tardíos (25 dpi) observados en plantas de la línea MP. La flecha en negro de la izquierda indica una hoja de la línea MP con síntomas severos y la flecha de la derecha muestra una hoja con síntomas leves que demuestran la recuperación.

- En plantas de la línea MP se observó un efecto similar, aunque en este caso la susceptibilidad fue mayor, alcanzando niveles de acumulación viral superiores a SX y un

80% de plantas infectadas a 6 dpi. A 10 dpi se detectó la presencia de virus en el total de plantas inoculadas. En etapas tardías, las plantas de la línea MP mostraron una recuperación parcial inclusive superior a la observada en la línea MPxCP^{T42W}. A los 25 dpi el porcentaje de plantas infectadas (medido en los nuevos tejidos sistémicos jóvenes) se redujo desde 100% a 60%. Los títulos virales fueron muy bajos y la severidad de los síntomas se redujo significativamente.

En resumen, las plantas de la línea MPxCP^{T42W} y MP son, de cierto modo, iguales o más susceptibles que las SX al ARN genómico desnudo de TMV en etapas tempranas de la infección y más resistentes en etapas tardías, dada su capacidad de recuperación parcial.

3.3.7. Evaluación de la respuesta de defensa desarrollada frente a infecciones con patógenos hemibiotróficos

Con el objetivo de examinar cómo impacta la expresión de proteínas virales en la respuesta de defensa ante patógenos con diferentes estrategias de invasión, se inocularon plantas con bacterias hemibiotróficas *Pseudomonas syringae pv tabaci* que genera un tipo de interacción planta-patógeno diferente en relación a TMV.

Para las infecciones con *P. syringae pv tabaci* se infiltraron hojas de tabaco con soluciones conteniendo bacterias y se observó el desarrollo de lesiones necróticas en las áreas foliares infiltradas. Se realizaron dos réplicas independientes del experimento de infección y se obtuvieron resultados similares. Se inocularon un total de 8 plantas de cada línea transgénica, CP^{T42W}, MP, MPxCP^{T42W}, mp_{xcp}^{T42W*} y los controles SX. Las lesiones necróticas más severas fueron desarrolladas por las líneas MP y MPxCP^{T42W} (Fig. 3.8 A). Luego de 48 hs, se colectaron discos foliares de las áreas infiltradas y previa homogeneización se incubaron las muestras en medio King's B agar durante 16 hs para realizar el recuento bacteriano a modo de cuantificación de la infección. En coincidencia con la severidad de las lesiones necróticas foliares, los recuentos bacterianos fueron significativamente más elevados en las líneas MP y MPxCP^{T42W} (Fig. 3.8 B). Por lo tanto, las plantas que expresan MP y MPxCP^{T42W} mostraron mayor susceptibilidad frente a infecciones con *P. syringae pv tabaci*.

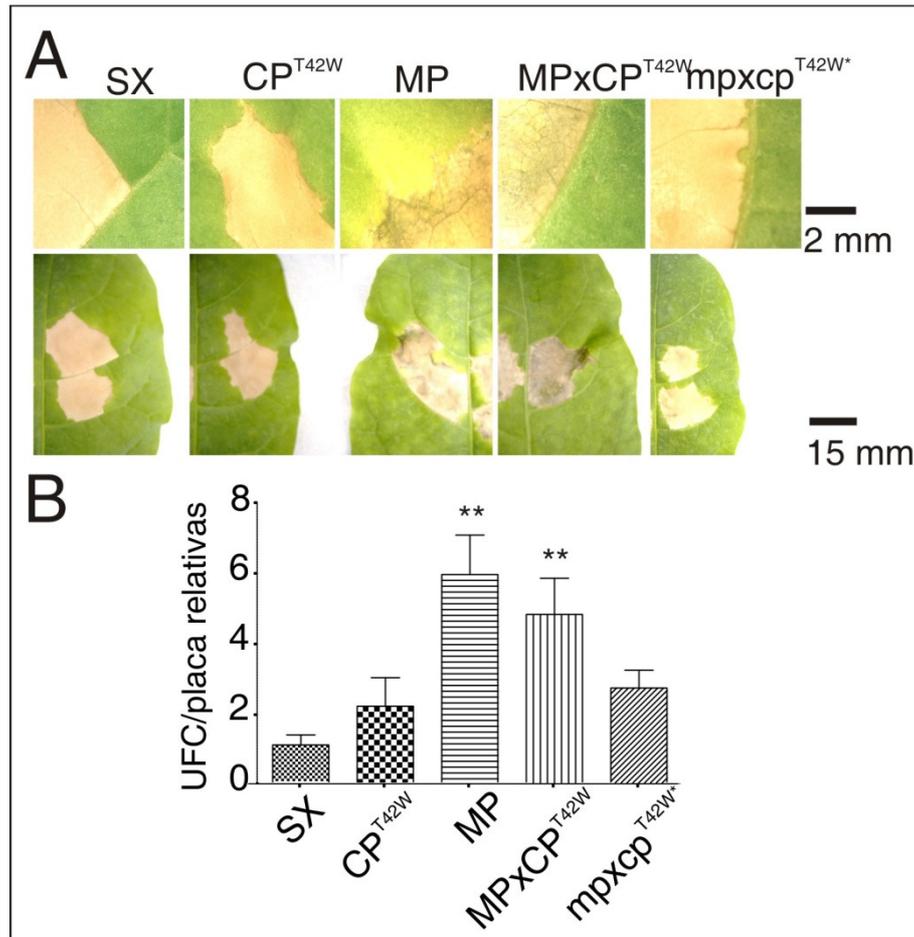


Figura 3.8. Efectos de la infección con *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. A) Lesiones necróticas observadas en las líneas transgénicas y controles SX en tejidos foliares de tabaco luego de 48 hs post inoculación (hpi). B) El gráfico de barras muestra la media ± errores estándar de la cantidad relativizada de unidades formadoras de colonias (UFC) luego del recuento en placas. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran mediante *, que indican p-valores < 0,05.

3.3.8. Evaluación de la respuesta de defensa desarrollada frente a infecciones con patógenos necrotróficos

Con el objetivo de examinar cómo impacta la expresión de proteínas virales en la respuesta de defensa ante patógenos necrotróficos, se utilizó el hongo *Sclerotinia sclerotiorum*, que activa mecanismos de defensa específicos distintos a *Pseudomonas* y a su vez diferentes al virus TMV.

Se evaluó el desarrollo de síntomas en respuesta a infecciones causadas con el hongo necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum* en las plantas transgénicas y los controles SX.

Las infecciones se realizaron depositando discos de ágar de 5 mm de diámetro conteniendo micelios fúngicos sobre la cara adaxial de hojas de tabaco. Se determinó el tamaño de las lesiones necróticas desarrolladas durante 6 días post-infección, en 8 plantas infectadas de cada línea (Fig. 3.9 A). Nuevamente, los resultados de este ensayo son representativos de dos réplicas independientes del experimento. En coincidencia con las observaciones anteriores, *Sclerotinia sclerotiorum* parece producir lesiones necróticas de mayor superficie en las líneas MP y MPxCP^{T42W} (Fig. 3.9 B), mostrando que estas plantas también son más susceptibles a infecciones con hongos necrotróficos.

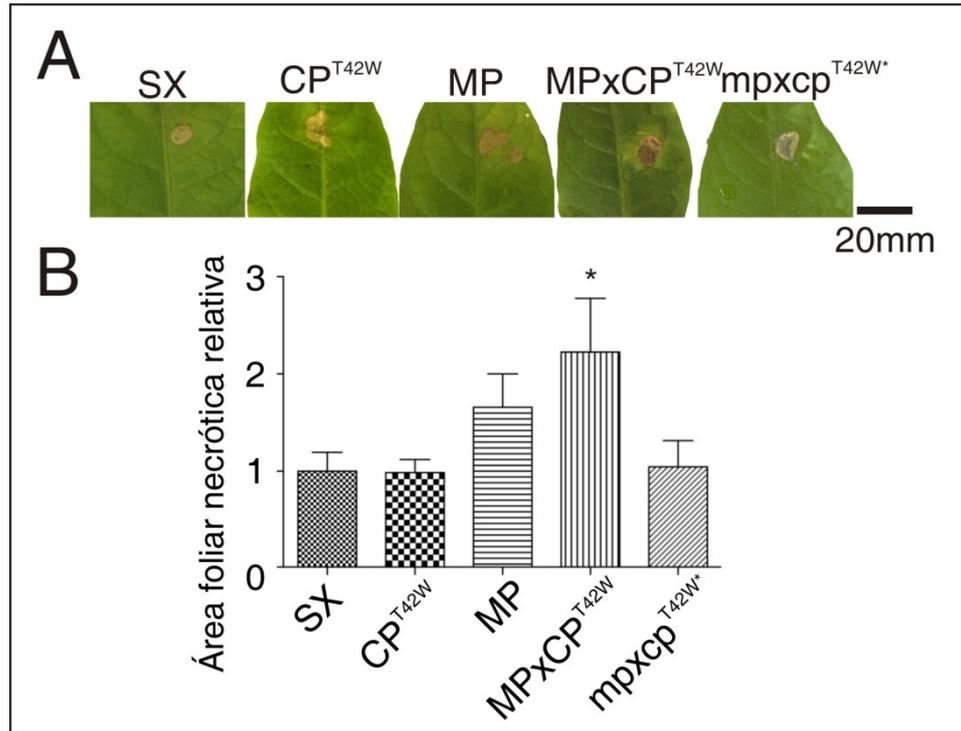


Figura 3.9. Efectos causados por la infección con *Sclerotinia sclerotiorum*. A) Lesiones necróticas producidas en tejidos foliares de tabacos de las líneas transgénicas y los controles luego de 6 días post inoculación (dpi). B) Los gráficos de barras representan la media \pm errores estándar de las cuantificaciones relativas del área foliar necrótica. Los datos corresponden a 10 hojas por cada línea transgénica y controles SX. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran mediante * p-valor $< 0,05$.

3.3.9. Evaluación del fenotipo desarrollado por el silenciamiento de GMP1 mediante la técnica de VIGS en *N. benthamiana*

En base a los resultados obtenidos en el perfil de expresión génica y las posteriores validaciones y cuantificaciones relativas de genes mediante RT-qPCR, se observó que el gen de la enzima GDP manosa pirofosforilasa (GMP1), mostró reducir significativamente su expresión en plantas MPxCP^{T42W}. Esta enzima está implicada en la biosíntesis de ácido ascórbico y al parecer es en gran medida responsable de las disminuciones de ASC y DHA detectados en las plantas doble expresantes. Como ha sido previamente demostrado, las mutantes *vtc-1* de *Arabidopsis* (*knock-down* del gen GMP1) son deficientes en la biosíntesis de ácido ascórbico, muestran retardos en el crecimiento y floración (Conklin *et al.*, 2000; Pastori *et al.*, 2003), acumulan mayores niveles de EROs, exhiben altas tasas de muerte celular, aumentos en la acumulación de SA y expresión de genes PR-1 y PR-5. También se ha demostrado que estas plantas son más resistentes a infecciones con *P. syringae* (Pavet *et al.*, 2005; Colville and Smirnoff, 2008; Mukherjee *et al.*, 2010).

Por todas estas razones, se exploró en detalle la participación de GMP1 en el fenotipo de defensa desarrollado por las plantas que expresan CP^{T42W} y MP de TMV. Se utilizó la técnica de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) y un sistema basado en vectores TRV para reducir la expresión de GMP1 en *Nicotiana benthamiana* tal como fue observado en la línea transgénica de tabaco MPxCP^{T42W}.

Se agroinfiltraron 30 plantas de *N. benthamiana* (15 para cada construcción) con vectores TRV conteniendo una secuencia parcial de GMP1 de 506 bp (Fig. 3.10 A) y se

utilizó como control un vector TRV conteniendo secuencias parciales de GFP. Los resultados obtenidos son representativos de al menos tres repeticiones independientes de los experimentos. Se confirmó el silenciamiento sistémico de GMP1 mediante RT-qPCR (Fig. 3.10 B).

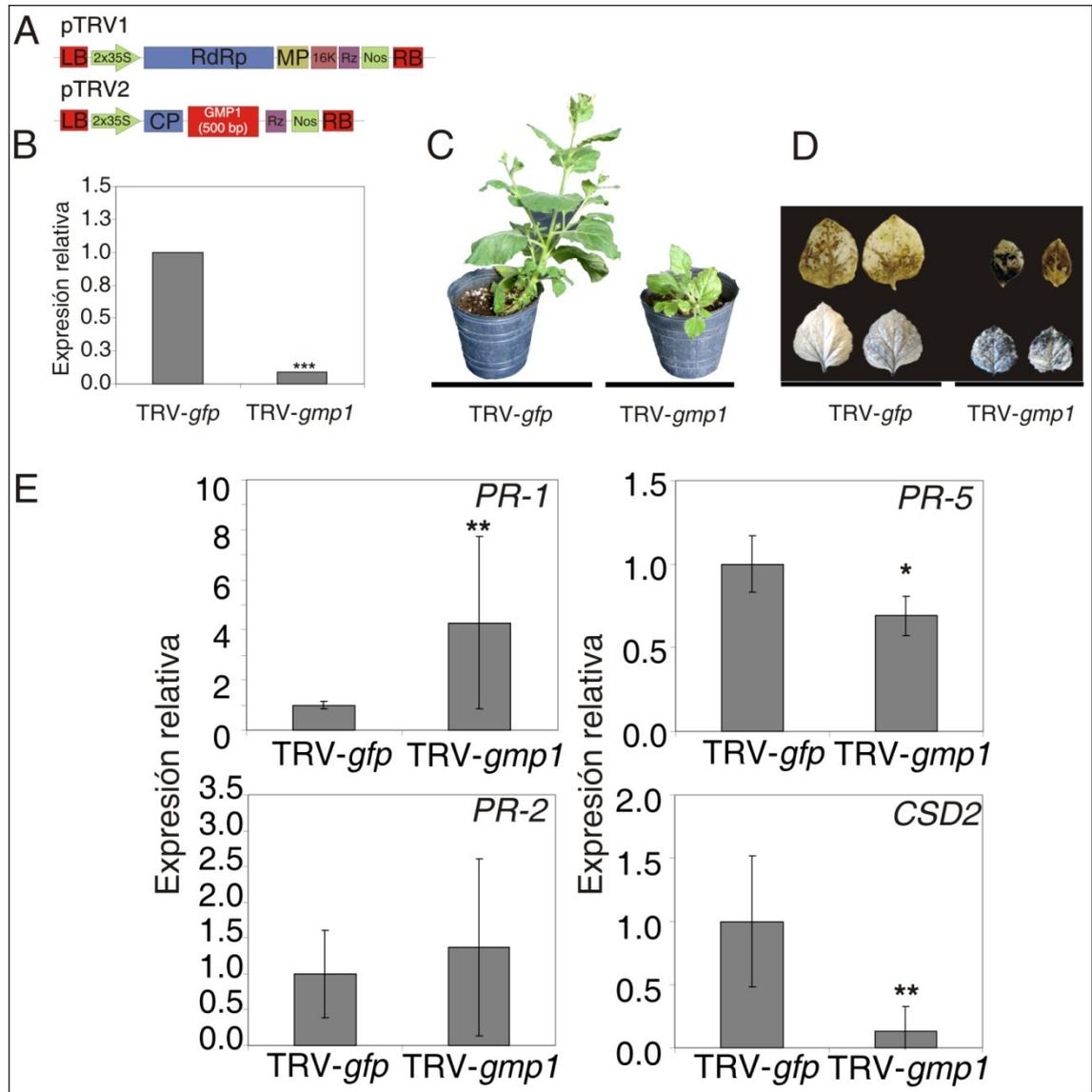


Figura 3.10. Efectos de la silenciamiento de GMP1 mediante VIGS sobre el desarrollo y la regulación redox de *Nicotiana benthamiana*. A) Esquema de las construcciones utilizadas para agroinfiltrar de TRV (pTRV1 y pTRV2-gmp1). B) Verificación del silenciamiento mediante RT-qPCR luego de 2 semanas post agroinfiltración. C) Efectos del silenciamiento de GMP1 en el crecimiento y desarrollo (2 semanas post agroinfiltración). D) Tinción con DAB y NBT para detectar acumulación de ERO en hojas de plantas silenciadas para GMP1 y control TRV-gfp. E) Efectos del silenciamiento de GMP1 en los niveles de expresión relativa de genes implicados en la respuesta a SA: PR-1, PR-2 y PR-5 y en la detoxificación de ERO: CSD2, en plantas agroinfiltradas con TRV-gmp1 y TRV-gfp, determinados por RT-qPCR 2 semanas después de la inoculación. Los gráficos de barras muestran la media \pm errores estándar de 5 réplicas biológicas por tratamiento. Los asteriscos indican diferencias significativas (* indica p-valores $< 0,05$ y ** p-valores $< 0,01$).

Las plantas TRV-*gmp1* redujeron su tasa de crecimiento considerablemente y mostraron mayor acumulación de EROs mediante tinciones histoquímicas con DAB y NBT (Fig. 3.10 C y D). Asimismo, cuando se determinó el nivel de expresión de genes involucrados en la detoxificación de EROs y de respuesta a SA se observaron similitudes parciales con las plantas MPxCP^{T42W}. El gen PR-1 mostró niveles aumentados en respuesta al silenciamiento de GMP1, y el gen CSD2 mostró reducción en su nivel de expresión al igual que las plantas transgénicas de tabaco (Fig. 3.10 E). En resumen, los resultados obtenidos permiten confirmar un rol importante para GMP1 en el fenotipo de defensa desarrollado por las plantas que expresan MP y CP^{T42W}.

3.3.10. Evaluación de la respuesta de defensa frente a TMV luego del silenciamiento de GMP1

Para evaluar la respuesta de defensa desarrollada frente a infecciones con TMV, se inocularon 10 plantas de *N. benthamiana* TRV-*gmp1* y 10 controles TRV-*gfp*. Se cuantificó la acumulación viral mediante ELISA y luego de 15 dpi se observó que las plantas silenciadas para GMP1 fueron significativamente más resistentes al virus (Fig 3.11 A). Este efecto fue también observado para el desarrollo de síntomas (Fig. 3.11 B), sugiriendo que se podría establecer cierto paralelismo en la respuesta a infecciones con TMV cuando GMP1 se silencia en *N. benthamiana* y cuando se expresa MP en tabaco. Por otra parte, se evaluó la respuesta frente a infecciones desarrolladas por *Oilseed-rape mosaic virus* (ORMV), un tobamovirus con elevada similitud de secuencia a TMV y con excelente capacidad de infección en *Arabidopsis thaliana*. Se inocularon *Arabidopsis* mutantes para GMP1 (*vtc-1*) (cedidas gentilmente por la Dra Malena Alvarez de la UNC, Córdoba) y controles Col-0. Se observó que las plantas mutantes fueron más tolerantes a inóculos bajos de ORMV cuando se inocularon plantas de 6 semanas de edad, dado que las infecciones en plantas más jóvenes no mostraron diferencias significativas (Fig. 3.11 C y D). Por lo tanto, el silenciamiento de GMP1 en *N. benthamiana* y en mutantes *vtc-1* de *Arabidopsis*, confiere mayor resistencia a infecciones con tobamovirus, posiblemente debido a la activación temprana de mecanismos de defensa mediados por EROs.

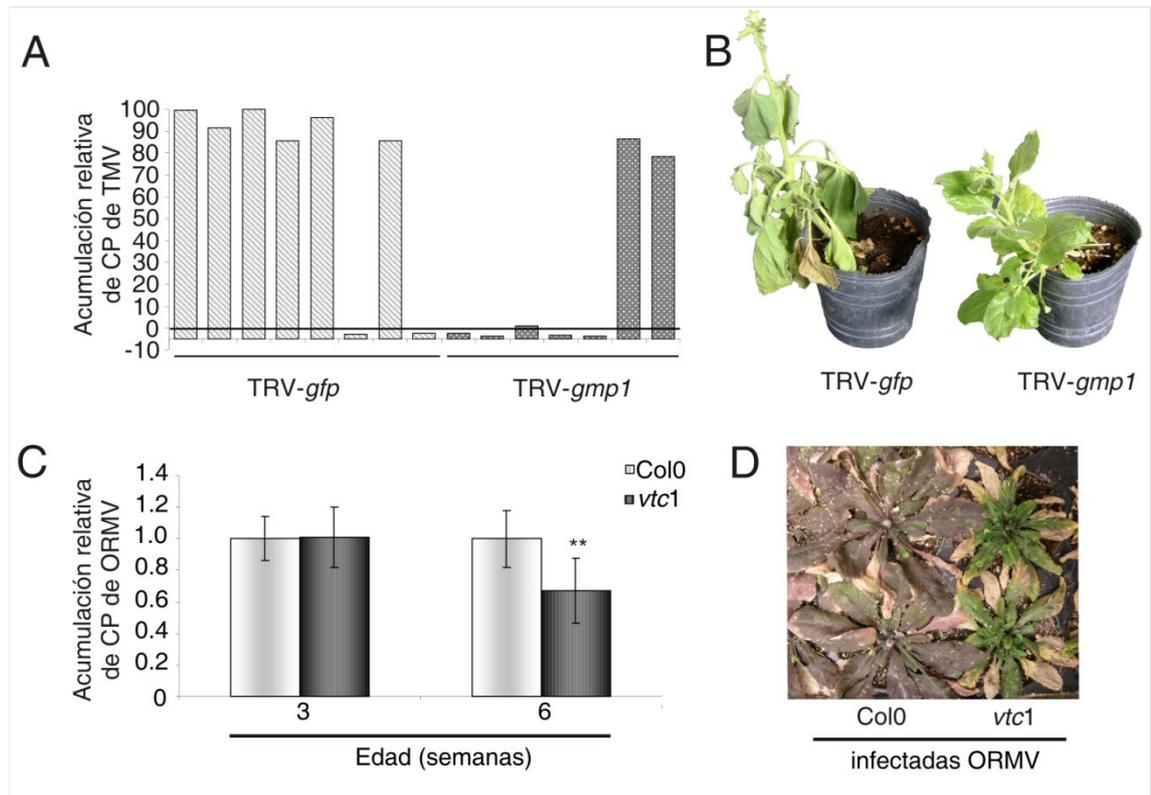


Figura 3.11. Efectos de la silenciamiento de GMP1 en la activación de respuestas de defensa contra tobamovirus (TMV y ORMV) en *N. benthamiana* y *Arabidopsis thaliana*. A) Los gráficos de barras que muestran los niveles relativos de acumulación de CP de TMV en plantas TRV-gmp1 y controles TRV-gfp determinados mediante ELISA. B) Desarrollo diferencial de síntomas de infección con TMV en plantas control TRV-gfp y TRV-gmp1 a 10 dpi. C) La media de los niveles relativos de acumulación de CP de ORMV obtenidos mediante ELISA en *Arabidopsis* mutantes para gmp1 (*vtc1*) y controles Col0 de 3 y 6 semanas de edad, a los 7 dpi. Los valores medios fueron obtenidos de 10 plantas por tratamiento. D) Severidad diferencial de síntomas desarrollados en *Arabidopsis vtc1* y Col0 de 6 semanas de edad luego de 10 dpi con ORMV.

3.4. Discusión

Como fue claramente demostrado en los perfiles de expresión génica (microarreglos y RT-qPCRs), muchos genes necesarios para la detoxificación de ERO y activación de respuestas de defensa mostraron reducida su expresión en las plantas de tabaco de la línea MPxCP^{T42W}. Entre ellos GMP1, CSD2, AOX y RDR1. En conjunto, la modulación de estos genes podría comprometer el crecimiento y desarrollo de las plantas. Como ya fue demostrado, las ERO son factores importantes en la respuesta de las plantas a estreses tanto bióticos como abióticos (Mittler, 2002; Apel y Hirt, 2004). Sin embargo, frente a tales situaciones, las ERO pueden jugar roles cuyos resultados suelen ser muy diferentes. En ciertos casos son necesarias para activar la señalización que induce respuestas de defensa y en otros casos, dependiendo del tipo de estrés en cuestión, pueden inclusive exacerbar el daño oxidativo (Dat *et al.*, 2000; Mittler *et al.*, 2011). Por tal motivo, las concentraciones de ERO deben ser estrictamente reguladas con el propósito de mantener una adecuada homeostasis celular. Por ejemplo, en interacciones compatibles *Cucumis sativus/Cucumber mosaic virus* (CMV) o en el caso de *Cucurbita pepo-Zucchini yellow mosaic virus*, las plantas huésped desarrollan capacidades

antioxidantes para evitar la incidencia de muerte celular mediante inducción de enzimas detoxificantes como superóxido dismutasas, catalasas, ascorbato peroxidases, entre otros (Riedle-Bauer, 2000). Sin embargo, en tejidos foliares de plantas de *N. tabacum* inoculados con TMV, los contenidos de ASC total y la actividad de enzimas detoxificantes sufrieron reducciones leves y transitorias, previas al desarrollo de respuestas hipersensibles (HR) (Fodor *et al.*, 1997; Mittler *et al.*, 1998; Yi *et al.*, 1999). Por lo tanto, la supresión de los sistemas antioxidantes es importante para la inducción local de muerte celular en respuestas de defensa de tipo hipersensible (Mittler *et al.*, 1999; Dat *et al.*, 2003; Lorrain *et al.*, 2003; Yi *et al.*, 2003). No obstante, se deben activar inmediatamente mecanismos compensatorios que regulen la formación de ERO y detengan la señalización inductora de muerte celular (Bajda *et al.*, 2009; Liao *et al.*, 2012). En concordancia con estos datos, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que en etapas tardías de infecciones con TMV se induce la expresión de cAPX1, CSD2, y GMP1. Sin embargo, en plantas transgénicas que expresan MP estos genes permanecen invariables y peor aún, reducen significativamente sus niveles de expresión en la línea MPxCP^{T42W}. En conjunto, la falta de activación de estos genes sería responsable en gran medida de la activación de las respuestas de defensa observadas en estas plantas y a su vez, del fenotipo de estrés desarrollado. Al parecer, los mecanismos compensatorios necesarios para reducir el nivel de daño oxidativo y la toxicidad de los radicales libres de oxígeno no fueron activados en las plantas MP y MPxCP^{T42W}, provocando un desequilibrio redox tal, que en el caso de la línea doble transgénica fue capaz de inducir la formación de micro-focos de muerte celular (Fig. 3.1). Por otra parte, las plantas de la línea MPxCP^{T42W} mostraron defectos en el desarrollo y menor crecimiento (Bazzini *et al.*, 2007). La reducción en los niveles transcripcionales de genes implicados en el sistema de detoxificación podría ser causada de forma directa o indirecta por un aumento de la severidad del efecto de MP cuando esta proteína viral se encuentra formando un complejo con CP^{T42W} (Bazzini *et al.*, 2007; Asurmendi *et al.*, 2004). Una situación similar, con desequilibrios en el sistema de detoxificación de ERO fue descrita en plantas de guisante inoculadas con *Plum pox virus* (PPV) (Diaz-Vivancos *et al.*, 2008). A 3 dpi no se observaron cambios en ninguno de los parámetros generales de estrés oxidativo evaluados, aunque en esta etapa temprana fue posible detectar disminuciones en la actividad enzimática de componentes cloroplásticos (ascorbato peroxidasa y peroxidasa) que provocaron aumentos de acumulación de peróxido de hidrógeno en este compartimiento. Luego, en etapas tardías de la infección (15 dpi), los parámetros de estrés generales aumentaron significativamente, y se detectaron importantes desequilibrios en el sistema de detoxificación.

La modulación de la expresión de genes antioxidantes y enzimas detoxificantes, por otra parte, ha demostrado incrementar los niveles de defensa basal contra patógenos (Mittler *et al.*, 1999; Barth *et al.*, 2004; Pavet *et al.*, 2005) e inducir la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en defensa (Pastori *et al.*, 2003; Pnueli *et al.*, 2003).

Las ERO, en conjunto con otras moléculas señalizadoras como el SA, cumplen funciones regulatorias en la activación de defensa (Alvarez, 2000; Durrant y Dong, 2004). Ya ha sido previamente demostrado que en plantas de tabaco resistentes a infecciones con TMV se producen incrementos de los niveles de acumulación SA, de aproximadamente 20 veces en la hoja inoculada y de 5 veces en tejidos foliares sistémicos. Estos cambios están acompañados por inducción de la expresión de genes PR (Malamy *et al.*, 1990). En concordancia, tratamientos con SA en plantas susceptibles producen reducciones profundas de acumulación de TMV y la activación de estos mecanismos de defensa es dependiente de la producción de ERO, aunque independientes de la aparición de focos de muerte celular, al menos a nivel macroscópico (White *et al.*,

1983; Chivasa *et al.*, 1997). Esto indica que ambos mecanismos de señalización son necesarios, aunque sus niveles deben estar estrictamente regulados.

Los resultados de este trabajo indicarían que la expresión de MP de TMV en plantas de tabaco es suficiente para incrementar significativamente los niveles de acumulación de SA y provocar reducciones drásticas de JA, de modo que esta proteína viral sería responsable de inducir respuestas de defensa y estrés en tabaco. La proteína MP podría ser reconocida por receptores que activan señales de defensa mediadas por SA y ERO. Cuando MP y CP^{T42W} son co-expresadas en plantas, las respuestas generadas no son lineales, ya que en principio, la señalización mediada por SA y ERO parece estar exacerbada y esto puede ser el factor causante de los micro-focos de muerte celular en tejido foliar y de algunas de las alteraciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas MPxCP^{T42W}. Por otra parte, ya ha sido reportado que PR-1 no está involucrado en el mecanismo de resistencia mediado por cápside de TMV ya que no se observó inducción del gen cuando se expresa CP de TMV en tabaco (Carr *et al.*, 1989). En este trabajo, no solamente se confirmó que PR-1 no se induce, sino que se pudo comprobar que el gen redujo significativamente sus niveles transcripcionales en presencia de CP^{T42W}. De igual modo, el transcripto que codifica para RDR1 se encontró disminuido en las plantas que expresan CP^{T42W} y este efecto sobre la expresión de RDR1, también fue evidenciado en la línea MPxCP^{T42W}. Por lo tanto, dados estos resultados, se propuso que CP^{T42W} podría ser un modulador negativo de vías de defensa específicas del huésped. Este efecto negativo en la activación de la defensa descrito para CP^{T42W}, ya fue de cierto modo sugerido cuando se demostró la habilidad de algunas proteínas de cápside de suprimir o evadir respuestas mediante interacciones con factores de la planta huésped (Callaway *et al.*, 2001). Por ejemplo, la CP de TMV facilita el movimiento sistémico del virus mediante su interacción específica con una proteína de *Nicotiana tabacum* (Hilf y Dawson, 1993). Del mismo modo, la proteína NbPCIP1 de *N. benthamiana*, interactúa con la CP de PVX y facilita, directa o indirectamente, la infección viral (Park *et al.*, 2009).

Este mecanismo de modulación negativa propuesto para CP^{T42W} es absolutamente diferente a la respuesta producida por la expresión de MP, no obstante ambos parten de un mismo efecto de *shut off* en la expresión génica del huésped, con especificidades diferenciales que se superponen durante la interacción entre ambas proteínas virales y la regulación de la expresión génica de la planta. Una vez más, el uso de un sistema de expresión de dos proteínas virales individuales y otro donde ambas co-expresan es útil para entender el comportamiento de cada componente del virus mediante la disección de los efectos individuales y la superposición en el complejo que forman ambas proteínas.

Las infecciones con ARN desnudo de TMV desencadenaron respuestas similares en las plantas MP y MPxCP^{T42W}, caracterizadas por una fase inicial de rápida dispersión sistémica del virus y progreso acelerado de la aparición de síntomas. Seguidamente, una segunda etapa de recuperación parcial donde se pudieron detectar reducciones significativas de acumulación viral y síntomas en tejidos sistémicos. En la línea MPxCP^{T42W}, la acumulación viral general es inferior, sugiriendo que el nivel alcanzado corresponde a un balance entre la rápida dispersión viral debida a la presencia de MP y un retraso en la acumulación sistémica que resulta de la expresión de CP^{T42W}. Por el contrario, las plantas SX muestran un incremento sostenido en la acumulación viral y en la progresión de síntomas. Por lo tanto, se puede hipotetizar que en las primeras etapas (donde el virus se acumula a mayor velocidad en MP y MPxCP^{T42W}) la expresión de MP favorece la dispersión del ARN de TMV y consecuentemente la dispersión viral sistémica, como ya fue previamente demostrado (Guenoune-Gelbart *et al.*, 2008; Niehl y Heinlein, 2011).

También se podría sostener que los incrementos en el nivel de expresión de la enzima β 1-3 glucanasa (PR-2) en ambas líneas transgénicas facilitarían el movimiento célula a célula del virus mediante la degradación de las deposiciones de calosa en los plasmodesmos (Beffa *et al.*, 1996; Epel, 2009; Baebler *et al.*, 2011).

En la segunda etapa, (donde la acumulación viral decrece y se observa una recuperación parcial), se podría hipotetizar que esta vez, MP controla la infección por dos vías posibles que actúan en concierto, la primera, mediante el incremento del movimiento de la señal de silenciamiento, como fue previamente propuesto por Vogler (2008) y la segunda, a través de la inducción de respuestas de defensa innatas mediadas por SA y ERO. Es decir que, ambos mecanismos, tanto el incremento del movimiento de la señal de silenciamiento como la activación de respuestas de defensa innatas actuando en combinación, reducirían los niveles de acumulación y dispersión de TMV, permitiendo de ese modo una recuperación parcial de la infección. En concordancia, ya ha sido previamente sugerido que el silenciamiento de ARN y la defensa mediada por SA juegan roles clave en el control de la dispersión del virus de tabaco *Tomato ringspot virus* (ToRSV) (Jovel *et al.*, 2011). Este mecanismo ha sido demostrado también en la defensa antiviral frente a *Plum pox virus* (PPV) en tabaco, donde componentes supresores del silenciamiento como P1/HC-Pro podrían ser responsables de interferir con la defensa mediada por SA (Alamillo *et al.*, 2006).

La expresión de RDR1 es inducida por SA en respuesta a infecciones por numerosos virus y este gen ha sido implicado en la inmunidad antiviral, permitiendo la producción de siRNAs secundarios (Xie *et al.*, 2001; Garcia-Ruiz *et al.*, 2010). Pese a la gran cantidad de evidencias que sostienen una conexión entre la inducción de RDR-1 y respuestas de defensa mediadas por SA, probablemente existan otros mecanismos involucrados. Dado que en las líneas transgénicas que expresan MP y MPxCP^{T42W} los niveles de expresión de RDR1, no solamente permanecen invariables en la primera, sino que disminuyen significativamente en la segunda. Es probable que otros mecanismos, independientes de RDR1, sean responsables de la conexión entre defensa mediada por SA y silenciamiento de ARN.

Las plantas poseen la capacidad de activar mecanismos de defensa específicos en función del tipo de patógeno y su estrategia de invasión. El SA está implicado en la inducción de mecanismos de defensa contra patógenos biotróficos, cuya estrategia de invasión requiere que los tejidos huéspedes permanezcan vivos. El JA, por otra parte, actúa principalmente en respuesta a la invasión por patógenos necrotróficos, quienes requieren de la muerte del tejido hospedante para poder crecer y reproducirse. Estas dos vías no actúan aisladamente, sino que son parte de una amplia red de interacciones que permiten a la planta optimizar sus estrategias de defensa. Sin embargo, en este trabajo se demostró que la expresión de MP y la co-expresión de MP y CP^{T42W} produjeron aumentos de susceptibilidad frente a infecciones con *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Las primeras son bacterias hemibiotróficas, con una fase inicial biotrófica donde la infección se establece, y seguidamente, una fase necrotrófica, en la que el patógeno completa su ciclo de vida. En esta fase, el patógeno provoca la producción de grandes cantidades de ERO que le permiten establecer exitosamente la infección (Able, 2003).

Por otro lado, agentes patógenos necrotróficos, tales como *Sclerotinia sclerotiorum* o *Botrytis cinerea* desencadenan la muerte celular hipersensible para facilitar la colonización de los tejidos en *Arabidopsis* (Govrin y Levine, 2000). Los incrementos de susceptibilidad frente a *Pseudomonas* y *Sclerotinia* demostrada en las líneas transgénicas MP y MPxCP^{T42W} podría deberse a que ambos patógenos han encontrado un ambiente con alta acumulación de ERO que les permitió iniciar

rápidamente la fase necrotrófica. En su defecto, la acentuada susceptibilidad estaría mediada por la activación de respuestas dependientes de SA que probablemente generan una reacción antagónica a las respuestas específicas necesarias para enfrentar patógenos necrotróficos mediadas principalmente por la hormona JA. De modo similar, Faize *et al.* (2011) demostraron que la sobreexpresión de la superóxido dismutasa Cu/Zn citosólica y la ascorbato peroxidasa incrementa la tolerancia contra *Pseudomonas syringae pv tabaci* y *Agrobacterium tumefaciens* en plantas de tabaco.

Por último, con la finalidad de lograr una mejor comprensión de los mecanismos subyacentes al fenotipo de estrés y la activación de defensa detectada en las líneas transgénicas MP y MPxCP^{T42W} desde un enfoque funcional, se analizó el rol de GMP1. Este gen mostró niveles disminuidos en plantas de la línea MPxCP^{T42W}, donde se encontraron las mayores acumulaciones de ERO, muerte celular y reducciones de ASC total. Fenotipos similares, con alta acumulación de ERO fueron descritos en *Arabidopsis* mutantes de GMP1 (*vtc-1*) (Foyer *et al.*, 2007; Pastori *et al.*, 2003; Mukherjee *et al.*, 2010) y en *N. benthamiana*, cuyo gen GMP1 fue silenciado mediante VIGS. Los niveles reducidos de GMP1 parecen ser suficientes para activar la defensa mediada por SA y la expresión de proteínas PR en *Arabidopsis thaliana* (Barth *et al.*, 2004; Pavet *et al.*, 2005). En este trabajo se pudo reproducir parcialmente el fenotipo de defensa descrito en la línea MPxCP^{T42W}, luego de silenciar la expresión de GMP1 en *N. benthamiana* mediante la técnica de VIGS. Adicionalmente, se pudo observar un efecto similar en *Arabidopsis vtc-1* cuando se realizaron desafíos contra ORMV.

En resumen, la activación de mecanismos de defensa en todas las plantas estudiadas: *N. benthamiana* cuyo gen GMP1 fue silenciado mediante VIGS, *Arabidopsis vtc1*, *N. tabacum* de las líneas transgénicas MPxCP^{T42W}, sugieren que las plantas están pre-activadas para la defensa contra virus (al menos contra tobamovirus) mediante un mecanismo, directa o indirectamente dependiente de GMP1. Sin embargo, la interacción es más compleja, a juzgar por las diferencias observadas en las respuestas de defensa desencadenadas frente a *Pseudomonas syringae*. Por lo tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos, se pueden activar mecanismos de defensa diferentes partiendo de desequilibrios redox y señalización por hormonas similares. En concordancia con la idea previamente expuesta por Mittler *et al.* (2011), donde los autores sugieren que la señalización mediada por ERO produce señales (probablemente un conjunto de factores que actúan en combinación) que proporcionan la especificidad para activar diferentes respuestas.

3.5. Conclusiones

Los resultados de este capítulo demuestran que la expresión constitutiva de las proteínas virales de TMV, tanto MP como la versión mutada de CP (CP^{T42W}), producen fenotipos de estrés y defensa específicos y son capaces de modular las respuestas de defensa de un modo complejo.

Es evidente que los mecanismos que subyacen la susceptibilidad a enfermedades y la tolerancia o resistencia dependen de una red de regulación compleja, y los virus son capaces de alterar estos ajustes finos. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen al entendimiento de la complejidad de estas interacciones mediante el estudio del efecto de las proteínas virales individuales y el efecto combinado de ambas, sin considerar la cinética de expresión de cada una durante el desarrollo de una infección.

MP parecería actuar como un inductor de defensa, alterando los niveles de ERO y SA, siendo el componente viral responsable de producir susceptibilidad frente a patógenos hemibiotróficos y necrotróficos. CP parecería jugar un rol negativo en la defensa del huésped mediante la reducción del nivel de expresión de transcritos como

PR-1 y RDR1. Por otro lado, CP parece exacerbar los efectos de MP cuando ambas proteínas virales se encuentran co-expresadas, probablemente debido a la formación de complejos macromoleculares. Estos efectos individuales reflejan la capacidad del virus para controlar su propia virulencia, dado que cuando esta es muy elevada, los recursos del huésped serían agotados rápidamente.

CAPÍTULO 4

Estudio del efecto de MP y CP^{T42W} sobre la vía de silenciamiento antiviral y mecanismos de degradación de ARN

4.1. Introducción

A partir de los resultados obtenidos en el análisis de expresión génica global expuesto en el Capítulo 2 de este trabajo, se demostró la existencia de una depresión específica de los niveles transcripcionales de algunos genes en la línea MPxCP^{T42W} con respecto a los controles mp_{xcp}^{T42W*}. Por este motivo, en el capítulo 3 se profundizó en el análisis de vías metabólicas cuyos genes mostraron reducciones en sus niveles de expresión, en particular aquellos ligados a la defensa innata de las plantas. Se consiguió demostrar que las proteínas virales CP^{T42W} y MP modulan diferencialmente las respuestas de defensa de un modo complejo. Por otra parte, resulta interesante considerar que el análisis de expresión global de genes permitió detectar un subgrupo de genes cuya expresión se encontró aumentada. Este subgrupo comprende transcriptos involucrados en vías de procesamiento y degradación de ARN. Por otra parte, considerando que las proteínas virales CP^{T42W} y MP no poseen actividad supresora del silenciamiento y que cuando son co-expresadas generan numerosas alteraciones morfológicas y cambios en la acumulación de miARNs, se podría postular que este mecanismo implica, directa o indirectamente, una nueva fuente de modificación en la regulación de siARNs en general, no relacionados a la presencia de supresores del silenciamiento y por ende, quizás una explicación para la generación de síntomas. El estudio de las bases moleculares de la producción de síntomas virales es un tema de suma importancia, ya que permitirá comprender la interacción virus-planta en mayor profundidad.

Por este motivo, en este capítulo se caracterizaron funcionalmente un conjunto de genes involucrados en la maquinaria de degradación de ARN. Este mecanismo involucra diferentes etapas, comenzando por la deadenilación, luego una vía de degradación en sentido 5'-3' que está precedida por un proceso de *decapping* (eliminación de la caperuza 5') y otra etapa de degradación en sentido 3'-5', ejecutada por un complejo enzimático denominado ARN exosoma. A su vez, se caracterizó funcionalmente el impacto de la expresión de CP^{T42W} y MP en el funcionamiento de la maquinaria de silenciamiento génico y degradación de ARN en tabaco mediante ensayos de expresión transitoria de GFP y un supresor del silenciamiento (p19). Por otra parte, se caracterizaron funcionalmente tres componentes del ARN exosoma (Rrp41, Rrp42 y Rrp43) mediante la técnica de VIGS en *Nicotiana benthamiana* y se estudió el impacto en el fenotipo de las plantas y en los niveles de acumulación de un conjunto miARNs.

4.2. Material y métodos

4.2.1. RT-qPCR para detectar miARNs

Para las cuantificaciones relativas de los niveles de acumulación de miARNs, los experimentos se llevaron a cabo utilizando cinco réplicas biológicas. Las RT-qPCRs se desarrollaron de acuerdo a las normas MIQE (Bustin *et al.*, 2009). La información detallada se encuentra en la Tabla 3 del Capítulo 2 con algunas modificaciones. Por ejemplo, el ADNc se sintetizó con Superscript III (Invitrogen), partiendo de 100 ng de ARN total y se utilizaron oligonucleótidos específicos para la confección de ADNc y para el análisis de acumulación miARNs (Chen *et al.*, 2005; Schmittgen *et al.*, 2008; Benes and Castoldi, 2010) que se detallan en la Tabla 5. Las condiciones para la reacción reversa fueron de 30 min a 16°C, 60 ciclos de 30 seg a 30°C, 30 seg a 42°C y 30 seg a 50°C, finalizando con la inactivación de la transcriptasa reversa 5 min a 85°C.

Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos diseñados para la confección de ADNc de miARNs y para la evaluación de su expresión por RT-qPCR

Nombre	A. thaliana	Secuencias	
		ADNc	RT-qPCR
miR15E		GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCSAGGTA ⁻ CGCCTE ⁻ GGA ⁻ ACGA ⁻ CGTGC	TCGCSTGACAGAAGAGAGT
miR39E		GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCSAGGTA ⁻ CGCCTE ⁻ GGA ⁻ ACGA ⁻ CGGGG	TCGCSTGACAGAAGAGAGT
miR18E		GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCSAGGTA ⁻ CGCCTE ⁻ GGA ⁻ ACGA ⁻ CGGGG	TCGCSTGACAGAAGAGAGT
miR184		GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCSAGGTA ⁻ CGCCTE ⁻ GGA ⁻ ACGA ⁻ CTCCACG	TCGCSTGACAGAAGAGAGT
miR172		GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCSAGGTA ⁻ CGCCTE ⁻ GGA ⁻ ACGA ⁻ CTECA	TCGCSTGACAGAAGAGAGT
Oligo Universal			G ⁻ GCAGGGTCCGAGGT

4.2.2. Agroinfiltración foliar de *Nicotiana benthamiana*

Para las agroinfiltraciones se cultivaron las células transformadas con el plásmido de interés a 28°C durante 16 horas en 20 ml de LB con rifampicina (25 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml) y gentamicina (50 µg/ml). El cultivo se centrifugó a 4000 rpm 10 min a temperatura ambiente y el pellet se resuspendió en MES 10mM con acetosiringona (100mM). Alcanzada una densidad óptica (OD) a 600 nm de 0,5 la suspensión se incubó 4 horas a temperatura ambiente y se infiltró en la cara abaxial de las hojas con jeringas sin aguja de 5 ml. La señal de GFP fue fotografiada entre los 2 y 4 días luego de la infección, en un microscopio con sistema de detección de fluorescencia Nikon ECLIPSE TS100. Este tipo de experimentos se realizó en invernaderos a temperaturas que oscilan entre 24° a 26°C.

4.2.3. Extracción de proteínas a partir de tejidos vegetales

Las muestras de tejido de *N. tabacum* fueron molidas en morteros con N₂ líquido hasta obtener un fino polvo. Al material así obtenido se le agregó buffer de extracción de proteínas (100 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 400 mM Sacarosa; 100 mM TrisHCl pH 8; 10% glicerol; 10 mM β-Mercaptoetanol; 2 mM PMSF (Isogai *et al.*, 1998) en una proporción de 300 µl por cada 100 mg de tejido. La mezcla se incubó en hielo durante 10 a 30 minutos y se centrifugó 12.000 rpm durante 20 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante.

4.2.4. Detección fluorimétrica de GFP en tejidos vegetales

Se determinó la concentración total proteica de cada muestra utilizando el kit *Quick Start Bradford Protein Assay* (BioRad). Para la detección de fluorescencia se utilizaron 5 µg de proteínas totales. La fluorescencia se determinó empleando un espectrofluorímetro SpectraMax® GEMINI EM (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA), excitando la muestra a 485 nm y detectando su emisión a 538 nm). Los datos fueron analizados estadísticamente mediante el programa GraphPad Prism 5.0 (test- t de comparación de a pares).

4.2.5. Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) en *N. benthamiana*

Clonado de fragmentos de Rrp41, Rrp42 y Rrp43 y construcción de vectores para VIGS: para amplificar los fragmentos de ADNc de aproximadamente 300 a 500 pb se utilizaron los oligonucleótidos detallados en la Tabla 6.

Tabla 6. Secuencias de oligonucleótidos diseñados para el clonado de Rrp41, Rrp42 y Rrp43.

Rrp41	SGN-U422206	Izq: 5'-TGCAAAGCAGTGGAAAGCCA - 3' Der: 5'-CGGATTAACCTCAGCCCACACTA - 3'
Rrp42	SGN-U431343	Izq: 5'-GGCGAAACCCTCAAACCGA - 3' Der: 5'-TCAAACGATGGCTCTGCTGTG - 3'
Rrp43	SGN-U442301	Izq: 5'-GCAATTCCCCCTAAATATTGGC - 3' Der: 5'-TGCCCATACATCAGTTATCCAGG - 3'

Se obtuvieron fragmentos de ADNc de 352 pb, 357 pb y 291 pb para Rrp41, Rrp42 y Rrp43 respectivamente que fueron inmediatamente clonados en un vector pCR[®]8/GW/TOPO[®] (Invitrogen) y posteriormente verificados mediante secuenciación. Los fragmentos fueron posteriormente transferidos a vectores pTRV2-GW (Liu *et al.*, 2002) de acuerdo a las instrucciones detalladas en el ítem 3.2.8

Agroinfiltración y confirmación del silenciamiento: para las agroinfiltraciones se siguieron las mismas instrucciones que el ítem 3.2.8 y se utilizaron para el chequeo del silenciamiento de Rrp42 los siguientes oligonucleótidos: Izq 5'-ACACCAGCG GAATAC- 3' y Der 5'-TGCTCGCTTACATGT-3'

4.2.6. Extracción de ARN total, confección de ADNc y diseño de oligonucleótidos para RT-qPCR (ver ítem 2.2.4 y 2.2.5). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7. Secuencias de oligonucleótidos diseñados para evaluación de expresión por RT-qPCR.

Unigen de tabaco	Nombres putativos	Secuencia de oligonucleótidos Izquierdo y Derecho
SGN-U422206	Rrp41	ATCAAGAAGAGGCGT AATTCGCCAGACAAT
SGN-U431343	Rrp42	ACACCAGCGGAATAC TGGAGAAGGAGCCTG
SGN-U442301	Rrp43	TGGAGAAGGAGCCTG GAACTGGGTCCCACCTG
SGN-U431860	RDR1	GCATTGAACACGCCTTGGA GCAGAACCCGATTGGATACG
SGN-U437134	RDR6	CTCAGCTTGGGGACCTCA CAGCCTCCAGAATCCTCAC
SGN-U441360	DCL1	TGTGGGTGATGCAGTATTAGA TGAAACCTGGTTTTGATAGTT
SGN-U449216	AGO1	ATGATGATGGACCTGGTGGT AGACAACCACTGGGTGAAGG
SGN-U427782	DCP1	GGCACCTTGAATACGCACC TCTCAACCGCGTTTTAGTTT
SGN-U440412	DCP2	GGGGCCATCATCCTTGATGAA GCCGCACTCTTTGCTGTCCA
SGN-U426119	VCS	AATGGCTCGAGAATGTCGCGC CGATGATGATGACGGCCAGA
SGN-U424720	XRN3	TGATGACAGACCCAAACTCGCC

Tabla 7 Continuación

SGN-U443677	XRN4	TCGTGCTTCTTCCTCCGTCAAGG TGGAAAGCGTTTTGCATGGCA TTGTTTTCCCTGGGGGCACCTT
SGN-U426732	SGS3	GCCTCTGCCGTGGGATACATTG TCTGCTTCGCTGGATTTCACA GCAGTCATTATTGCCAGGGATCC
SGN-U435399	SPL2	TGAAACAGTCTCAGGCTCGGATG CCACTTGACATCTCAGCATCCGC CCGTGCAACCATGAGAAATAGCA
SGN-U439906	AtHB8	TCCTGATGGCAAGACACATGGAG CGTGAACCACAAGTGCTCTTCCA

4.2.7. Análisis de expresión de ARNm por RT-qPCR (ver ítem 2.2.7).

4.3. Resultados

4.3.1. Evaluación de los niveles relativos de acumulación de un set de miARNs

Para verificar los resultados obtenidos por Bazzini *et al* (2007), donde se detectaron alteraciones en los niveles de acumulación de un grupo de miARNs en plantas de la línea transgénica MPxCP^{T42W}, se repitieron dichos análisis mediante la técnica de RT-qPCR (Fig. 4.1 y Tabla 8). Se confirmó el incremento significativo en el nivel de acumulación del miR156. Este miARN está involucrado en la regulación de los factores de transcripción *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE* (SPL), que a su vez están implicados en la regulación de numerosos procesos del desarrollo incluyendo la inducción de la floración en *Arabidopsis thaliana* (Schwarz *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2011).

En concordancia también encontró que los niveles de acumulación del grupo miR165/66 mostraron un mínimo aumento aunque no significativo. Este grupo está implicado en la regulación pos-transcripcional de los factores de transcripción *HD-ZIP* de Clase III, (ATHB-9/PHV, ATHB-14/PHB y ATHB-15) en *Arabidopsis*, importantes reguladores del desarrollo incluyendo la formación de meristemas apicales y radicales, polaridad foliar y desarrollo vascular (Jung y Park, 2007; Miyashima *et al.*, 2011). El miR164 no mostró alteraciones significativas de su acumulación mediante esta técnica aunque los datos obtenidos por Bazzini *et al.*, (2007), mostraron alteraciones muy leves mediante *Northern blot*. miR164 es un regulador negativo de factores transcripcionales con dominios NAC, como los genes *CUP SHAPED COTYLEDON 1 y 2* (CUC1 y 2), implicados en la organogénesis embrionaria, vegetativa y floral de *Arabidopsis thaliana* (Mallory *et al.*, 2004; Sieber *et al.*, 2007; Raman *et al.*, 2008).

Se analizó adicionalmente la expresión relativa de dos genes MIR, miR172, miR390 y miR398, que no habían sido previamente estudiados por Bazzini *et al.*, (2007). MiR172 y miR398 mostraron alteraciones en sus niveles de acumulación. En el caso del miR172, las plantas de la línea MP mostraron reducida significativamente su expresión. Este miARN ha sido fuertemente asociado a la regulación del desarrollo floral en plantas mediante la regulación de los factores de transcripción *APETALA* y *PISTILLATA* (Mlotshwa *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2007; Wollmann *et al.*, 2010; Zhu y Helliwell, 2011). Por otra parte, se detectaron aumentos significativos en los niveles de acumulación del miR398 en plantas transgénicas MPxCP^{T42W} y también en plantas de tabaco durante etapas tardías de infección con TMV (18 dpi). Este miARN está implicado en la

regulación negativa de dos Cu/Zn superóxido dismutasas (CSD1 citosólica y CSD2 cloroplástica) importantes reguladoras de estrés oxidativo mediante la detoxificación de radicales superóxido (Sunkar *et al.*, 2006) y también de la homeostasis de cobre en plantas (Yamasaki *et al.*, 2007; Yamasaki *et al.*, 2008; Mendoza-Soto *et al.*, 2012).

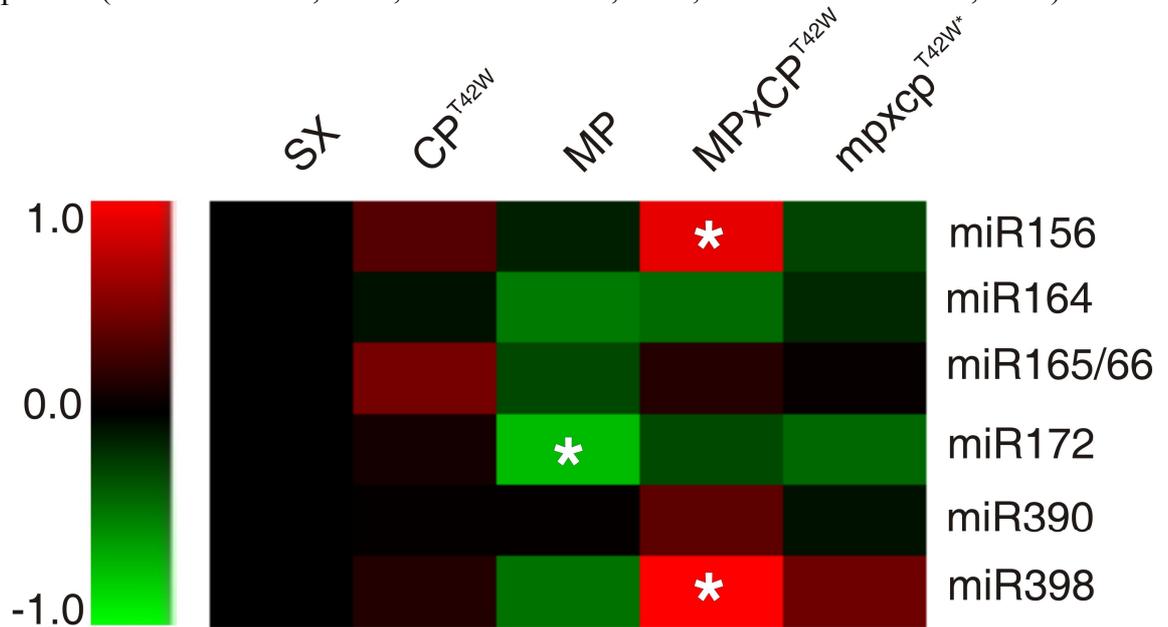


Figura 4.1. Gráfico representativo de los niveles relativos de acumulación de miARNs en plantas transgénicas de las líneas CP^{T42W}, MP, MPxCP^{T42W}, mpxcp^{T42W*} en relación a las plantas control SX, obtenidos por RT-qPCR. El esquema obtenido mediante la herramienta MultiExperimentViewer v.4.2.01, asocia la coloración roja con aumentos de expresión y el color verde con reducciones de expresión teniendo como referencia la escala numérica a la derecha. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas con respecto a las plantas control, considerando un total de siete réplicas biológicas por línea evaluada (* p-valores < 0,1 y ** p-valores < 0,05).

Tabla 8. Valores obtenidos luego de los análisis de datos de las RT-qPCRs de miARNs, (Log-2) utilizados posteriormente para confeccionar la figura 4.1.

Relación	CP ^{T42W}	MP	MPxCP ^{T42W}	mpxcp ^{T42W*}
miR156	0,34±0,37	-0,12±0,38	0,91±0,40	-0,27±0,40
miR164	-0,07±0,32	-0,48±0,35	-0,42±0,42	-0,16±0,35
miR165/66	0,46±0,39	-0,28±0,43	0,15±0,36	0,03±0,36
miR172	0,09±0,30	-0,74±0,32	-0,29±0,36	-0,41±0,35
miR390	0,02±0,29	0,02±0,30	0,37±0,33	0,07±0,34
miR398	0,14±0,40	-0,45±0,54	1,28±0,49	0,44±0,43
p-valor				
miR156	0,2090	0,3869	0,0186	0,2593
miR164	0,4238	0,1255	0,1485	0,3398
miR165/66	0,1963	0,3011	0,3669	0,4790
miR172	0,4077	0,0362	0,2155	0,1964
miR390	0,4677	0,4635	0,1268	0,4233
miR398	0,3832	0,1776	0,0085	0,1571

Los resultados obtenidos permitieron comparar información previa mediante una nueva tecnología y ampliar el conocimiento de las alteraciones de miARNs inducidas por la presencia de las proteínas virales CP^{T42W} y MP.

4.3.2. Detección de alteraciones en el silenciamiento génico de ARN por la co-expresión de CP^{T42W} y MP

Como ya fue previamente demostrado en el trabajo de Bazzini *et al* (2007), las proteínas MP, CP^{T42W} individuales y la co-expresión de ambas no muestran actividad supresora del silenciamiento cuando son co-agroinfiltradas con construcciones inductoras del silenciamiento génico específico como 35S-GFP y una repetición invertida de GFP (35S-GFPdc) en *Nicotiana benthamiana*. Es decir, que cuando estas construcciones son co-agroinfiltradas con las proteínas virales, la expresión de GFP no puede ser restaurada frente al silenciamiento por acción de PTGS, como ocurre usualmente cuando una proteína supresora del silenciamiento está presente. Esta estrategia fue ampliamente utilizada para detectar proteínas supresoras del silenciamiento, y consiste en el uso de GFP como reportera de nivel de fluorescencia, acumulación de ARN mensajero (mGFP) y de RNA de bajo peso molecular de 21 a 24 nucleótidos (sGFP) en presencia de la proteína en estudio (Voinnet *et al.*, 1999). Aumentos en el nivel de fluorescencia/acumulación de mGFP son indicativos de supresión de silenciamiento.

La expresión de GFP (absorción 460-500 nm/emisión 510-560 nm) puede detectarse en plantas iluminadas con luz ultravioleta (luz UV). Cuando una planta que no expresa GFP es iluminada con luz UV se ve de color rojo a simple vista debido a la emisión de fluorescencia de la clorofila (a y b) (absorción 450-500nm/emisión 650-700 nm) al ser excitada con esta calidad de luz, mientras que la excitación de la proteína GFP con luz UV produce una emisión verde (505-535 nm) (eGFP pico en 516 nm) claramente distinguible en los tejidos vegetales que la expresan.

Las evaluaciones de actividad supresora del silenciamiento efectuadas en el trabajo de Bazzini *et al.*, (2007) fueron llevadas a cabo en hojas de *Nicotiana benthamiana* mediante expresión transitoria de las proteínas virales CP^{T42W} y MP y los resultados demuestran que el complejo formado no es capaz de suprimir el silenciamiento de GFP, es decir que no posee función supresora. Sin embargo, cuando la expresión de proteínas virales en la planta es estable, sistémica y durante la ontogenia completa, los efectos son diferentes. Entre estos, se han detectado mediante los análisis de microarreglos (capítulo 2), diferentes alteraciones inducidas por la expresión de las proteínas virales que podrían tener un rol en el silenciamiento génico (inducción de genes con participación en el procesamiento de ARN). Para probar si estas alteraciones génicas inducidas tienen algún rol en el silenciamiento se realizaron ensayos de agroinfiltración foliar en las diferentes líneas transgénicas de tabaco, CP^{T42W}, MP, MPxCP^{T42W} y mpxcp^{T42W*} con distintas combinaciones de construcciones de prueba:

- (1) 35S-GFP
- (2) 35SGFP + p19
- (3) 35S-GFP + 35S-GFPdc
- (4) 35S-GFP + miRGFP
- (5) *Agrobacterium* GV3101

La expresión de GFP (1) fue más elevada en las plantas de la línea MPxCP^{T42W} (Fig. 4.2) en comparación a los controles mpxcp^{T42W*}, sugiriendo la existencia de una alteración en el mecanismo de silenciamiento endógeno dirigido contra transgenes. Es decir que de algún modo la señal de silenciamiento o la amplificación de la misma están reducidas o actúan menos eficientemente. Con el objetivo de evaluar si este efecto, es

similar o coincide en algún mecanismo con la acción de los supresores de silenciamiento se co-agroinfiltraron construcciones con GFP y un supresor del silenciamiento muy caracterizado y poderoso como p19 **(2)** (Qu y Morris, 2002; Qiu *et al.*, 2002) en todas las líneas transgénicas y los controles. Nuevamente, las plantas de la línea MPxCP^{T42W} mostraron que la expresión transitoria de GFP + p19 fue significativamente más elevada (Fig. 4.2) Los resultados indican que el efecto observado no estaría mediado por inhibición del PTGS ya establecido, sino por algún mecanismo alternativo. Para confirmar esto, se realizaron co-agroinfiltraciones con GFPdc **(3)** y miRGFP **(4)**. Se observó que cuando los ARNs de doble cadena, ya sean provenientes de un siARN o de un miARN contra GFP, el silenciamiento fue efectivo, alcanzando los mismos niveles en ambas líneas MPxCP^{T42W} y controles mpxcpc^{T42W*} evaluadas.

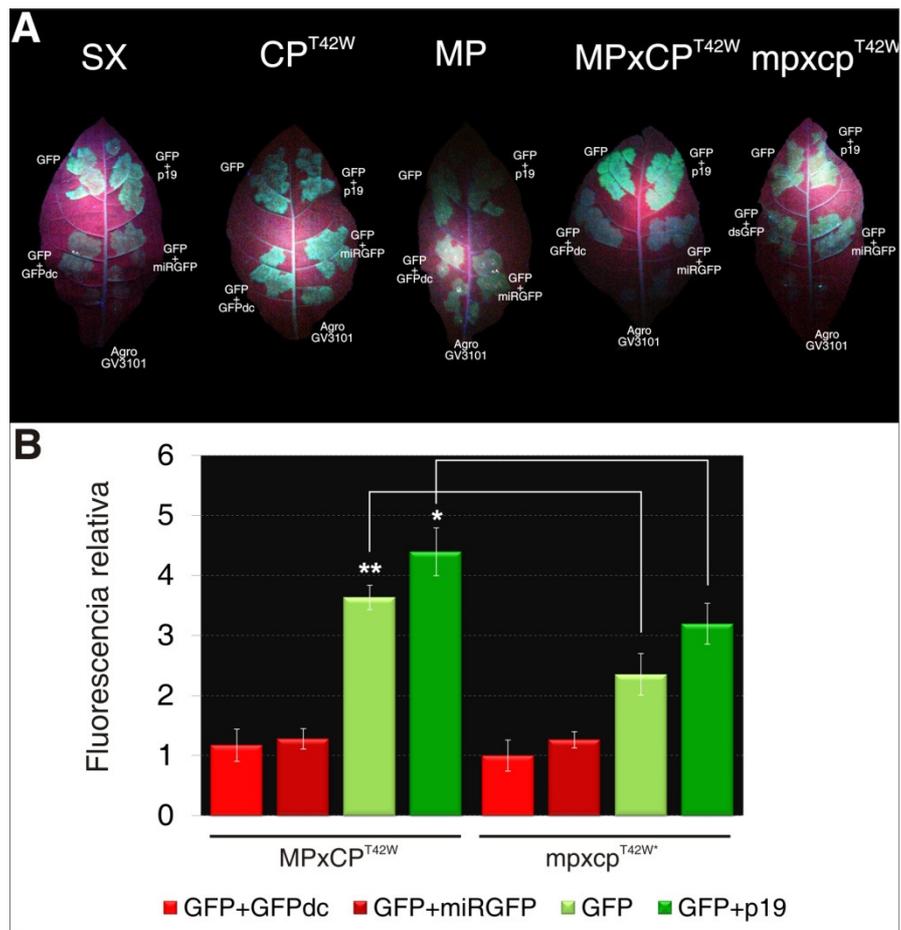


Figura 4.2. Niveles de expresión transitoria de GFP luego de agroinfiltraciones foliares en tabaco. A) Evaluación de la actividad supresora del silenciamiento mediante detección de la fluorescencia emitida por GFP (510-530 nm) en tejido foliar de plantas de las líneas transgénicas CP^{T42W}, MP, MPxCP^{T42W}, mpxcpc^{T42W*} en comparación con los controles SX. Las construcciones agroinfiltradas fueron **(1)** GFP, **(2)** GFP + p19, **(3)** GFP + GFPdc y **(4)** GFP + miRGFP. B) En el gráfico de barras se observan los niveles relativos de fluorescencia verde detectados mediante espectrofluorimetría en plantas de las líneas MPxCP^{T42W} y mpxcpc^{T42W*}. Las barras de error corresponden al error estándar de las mediciones obtenidas a partir de 8 réplicas biológicas de cada experimento. Los asteriscos indican diferencias significativas en los niveles de fluorescencia realizando comparaciones de a pares, mediante test-t. * p-valor < 0,05 y ** p-valor < 0,01.

Por otra parte, para determinar si estos aumentos de fluorescencia de GFP se correlacionan con incrementos en los niveles de transcritos se cuantificó mediante RT-qPCR la acumulación de mGFP (Fig. 4.3) y se consiguió corroborar el mismo efecto a nivel transcripcional.

En su conjunto, los resultados obtenidos sugieren la existencia de una alteración en el mecanismo endógeno de producción/generación de silenciamiento, derivado directa o indirectamente de la expresión de CP^{T42W} y MP.

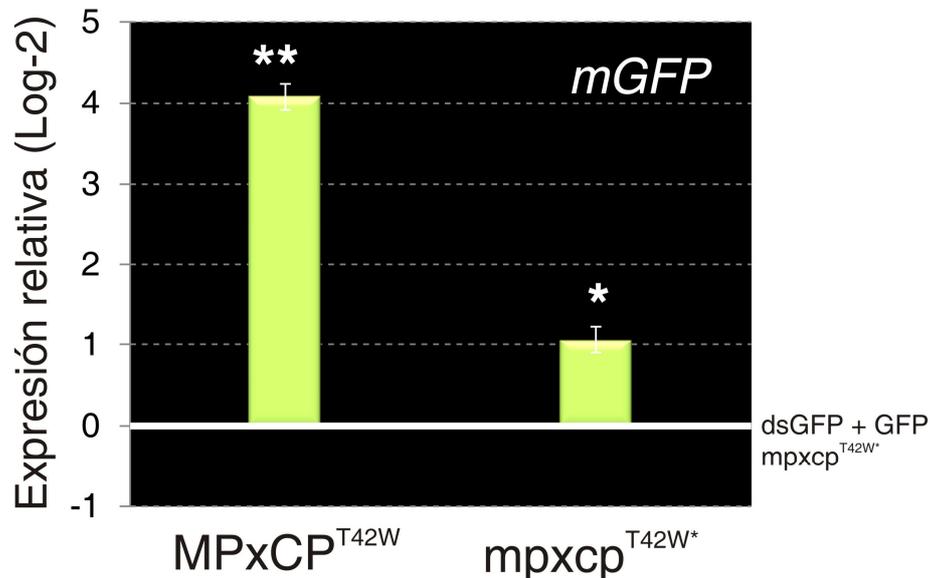


Figura 4.3. Niveles de expresión relativa (Log-2) del ARN mensajero de GFP (mGFP) en las líneas transgénicas MPxCP^{T42W} y mpxc^{T42W}* agroinfiltradas con construcciones transitorias para GFP, determinados por RT-qPCR. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles (plantas mpxc^{T42W}* agroinfiltradas GFP + dsGFP), considerando un total de siete réplicas biológicas por línea evaluada (* p-valores < 0,05 y ** p-valores < 0,01).

4.3.3. Determinación de niveles de expresión de genes involucrados en procesos de silenciamiento génico, degradación de ARNs y genes blanco de miARNs

De acuerdo al conjunto de evidencias obtenidas en los estudios previos:

- 1) Los resultados del perfil de expresión génica mediante la técnica de microarreglos permitieron detectar que las plantas de la línea MPxCP^{T42W} sobre-expresan un subgrupo de genes implicados en la maquinaria de procesamiento y degradación de ARNs.
- 2) Las plantas de la línea MPxCP^{T42W} mostraron alteraciones en la acumulación de un conjunto de miARNs, detectados mediante la técnica de *Northern blot* (Bazzini *et al.*, 2007), comparado y ampliado mediante RT-qPCR en este trabajo.
- 3) La expresión transitoria de GFP está incrementada en la línea MPxCP^{T42W}, sugiriendo la existencia de una alteración en el mecanismo endógeno de producción/ generación de silenciamiento o su amplificación, derivados directa o indirectamente de la expresión de CP^{T42W} y MP.

Se planteó la hipótesis de que este mecanismo podría involucrar vías relacionadas a la maquinaria de degradación de ARNs (*RNA decay*). Para evaluar esta posibilidad, previamente se realizaron exhaustivas búsquedas de secuencias putativas correspondientes a cada uno de los genes candidatos en *Nicotiana tabacum*, partiendo de *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum* y *Nicotiana benthamiana*. Se utilizaron las herramientas BLASTX y BLASTN se buscaron unigenes ortólogos en tabaco utilizando

las bases de datos de *Sol Genomics Network* (<http://solgenomics.net/>), NCBI, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>). Los datos de identidad de secuencia, valores-E se detallan en la Tabla 9.

Tabla 9. Alineamiento de genes de la vía de ARN *decay*, PTGS y blancos de miARNs de *Nicotiana tabacum* y *Arabidopsis thaliana*.

Proceso Biológico	Gen	<i>A. thaliana</i>	<i>N. tabacum</i>	Puntaje	E-value	Cobertura	Identidad Max
ARN exosoma	Rrp41	AT3G61620	SGN-U422206	413	1,00E-113	60%	91%
	Rrp42	AT3G07750	SGN-U431343	412	3,00E-113	67%	77%
	Rrp43	AT1G60080	SGN-U442301	193	3,00E-55	51%	88%
Amplificación	RDR1	AT1G14790	SGN-U431860	2225	0	93%	99%
PTGS	RDR6	AT3G49500	SGN-U437134	2358	0	96%	99%
PTGS	DCL1	AT1G01040	SGN-U441360	397	4,00E-109	97%	71%
	AGO1	AT1G48410	SGN-U449216	1089	0	84%	99%
<i>Decapping</i>	DCP1	AT1G08370	SGN-U427782	298	1,00E-79	91%	95%
	DCP2	AT5G13570	SGN-U440412	288	8,00E-76	30%	93%
	VCS	AT3G13300	SGN-U426119	233	8,00E-62	81%	56%
Degradación 5'-3' y <i>si-bodies</i>	XRN3	AT1G75660	SGN-U424720	671	0	62%	74%
	XRN4	AT1G54490	SGN-U443677	354	2,00E-95	32%	90%
	SGS3	AT5G23570	SGN-U426732	439	1,00E-180	47%	85%
Blancos de miARNs	SPL2	AT5G43270	SGN-U435399	193	3,00E-49	63%	35%
	AtHB8	AT4G32880	SGN-U439906	453	1,00E-127	97%	76%
	CSD2	AT2G28190	SGN-U424966	337	9,00E-91	65%	84%

Posteriormente, se diseñaron oligonucleótidos específicos para determinar los niveles de expresión relativa de cada secuencia mediante RT-qPCR. Se evaluó la acumulación relativa de genes relacionados a la maquinaria de ARN *decay* en plantas de las líneas transgénicas CP^{T42W}, MP, MPxCP^{T42W}, mp^{xcp}^{T42W}, controles SX y plantas SX infectadas con TMV a 6 y 18 dpi. Todas ellas de aproximadamente 6 semanas de edad. Se tomaron muestras de 7 réplicas biológicas de cada línea evaluada. Los resultados obtenidos demostraron que, efectivamente, numerosos genes involucrados en estas vías se encontraron alterados en sus niveles de acumulación en relación a los controles no transgénicos (Fig 4.4). Los datos que permitieron la confección de la figura se encuentran en la Tabla 10.

- En el caso de la maquinaria ARN exosoma, resultó interesante observar que los niveles de expresión de Rrp41 y Rrp43 se encontraron significativamente aumentados en la línea MPxCP^{T42W}, al igual que en etapas tardías de la infección con TMV, sugiriendo que este mecanismo es activo en la infección viral y se dispara inclusive cuando el supresor del silenciamiento de TMV (replicasa viral) está ausente.

- Por el contrario, los genes implicados en la maquinaria de silenciamiento génico mediado por PTGS y activos en la biogénesis y función de miARNs (DCL1 y AGO1 respectivamente) permanecieron invariables en las líneas transgénicas pero resultaron fuertemente aumentados en etapas tardías de la infección con TMV.

- Los genes RDR1 y RDR6, mostraron aumentos de su expresión relativa en etapas tardías de la infección con TMV. RDR6 no mostró cambios en las líneas transgénicas pero resultó muy interesante la reducción drástica en los niveles de expresión de RDR1 en las líneas CP^{T42W} y MPxCP^{T42W}, como ya fue discutido en el capítulo 3, dado que este gen está fuertemente relacionado a la defensa antiviral mediada por ácido salicílico. Por otra parte, SGS3 resultó inducido en las líneas CP^{T42W} y MPxCP^{T42W}, sugiriendo un efecto de la proteína de cápside en la regulación de este transcrito. Este transcrito no fue evaluado en plantas infectadas con TMV.

- Los genes implicados en las maquinarias de *decapping* (DCP1 y VCS) y degradación de ARN en sentido 5'-3' (XRN3 y XRN4) no fueron evaluados en plantas infectadas con TMV a 6 y 18 dpi, aunque en plantas transgénicas no mostraron cambios en sus niveles de acumulación, con excepción de DCP1 y XRN4, que resultaron inducidos en la línea MPxCP^{T42W}.

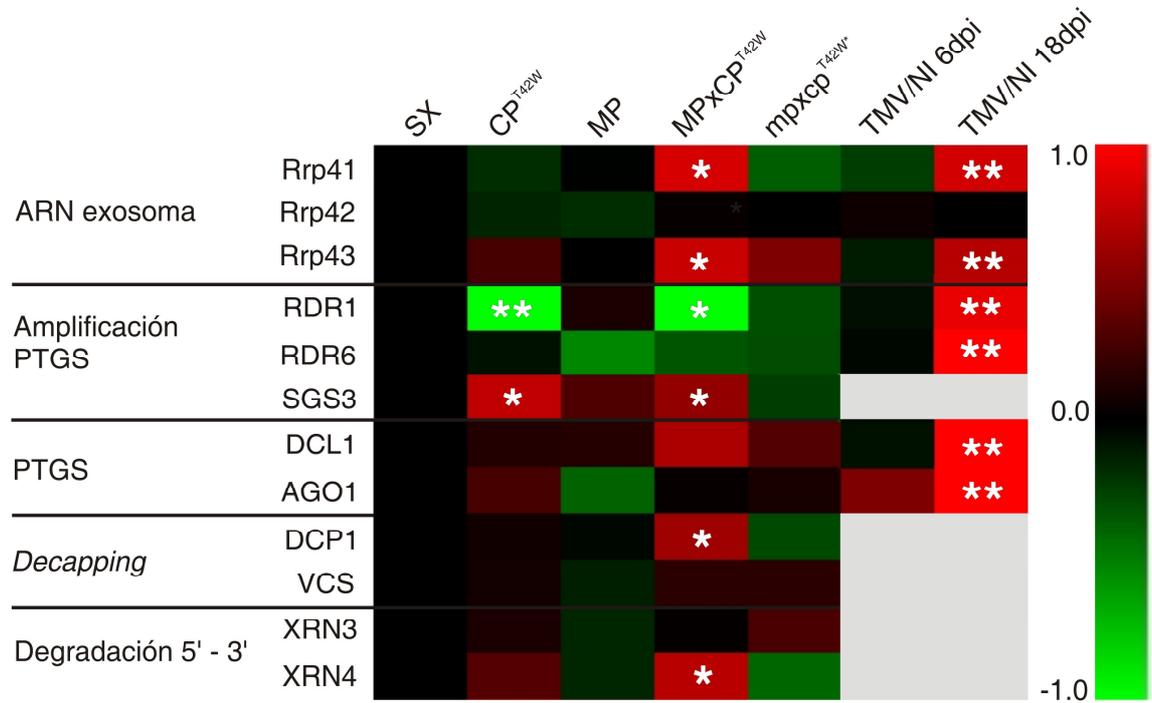


Figura 4.4. Niveles de expresión relativa (Log-2) de genes implicados en la maquinaria de ARN *decay* y PTGS en las líneas transgénicas CP^{T42W}, MP, MPxCP^{T42W}, mpxcp^{T42W}, y plantas SX infectadas con TMV a 6 y 18 dpi, determinados por RT-qPCR. El esquema obtenido mediante la herramienta MultiExperimentViewer v.4.2.01, asocia la coloración roja con aumentos de expresión y el color verde con reducciones de expresión teniendo como referencia la escala numérica a la derecha. La coloración gris indica ausencia de datos. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas con respecto a las plantas control, considerando un total de siete réplicas biológicas por línea evaluada (* p-valores < 0,05 y ** p-valores < 0,01).

Tabla 10. Valores obtenidos luego de los análisis de datos de las RT-qPCRs, (Log-2) utilizados posteriormente para confeccionar la figura 4.3.

Relación	ARN exosoma			Amplificación PTGS			PTGS			Decapping			Degradación 5'-3' y si.bodles		
	Rrp41	Rrp42	Rrp43	RDR1	RDR6	DCL1	ago-01	DCPI	DCP2	VCS	XRN3	XRN4	SGS3		
CP ^{1:2} W	-0,18±0,49	-0,14±0,46	0,28±0,52	-2,00±0,48	-0,07±0,59	0,14±0,47	0,28±0,41	0,07±0,29	-0,83±0,21	-0,41±0,23	0,11±0,47	-0,45±0,35	0,76±0,29		
MP	-0,01±0,32	-0,18±0,37	0,01±0,38	0,11±0,68	-0,53±0,73	0,15±0,78	-0,39±0,49	-0,03±0,29	-0,57±0,43	0,06±0,25	-0,15±0,57	-0,28±0,35	0,31±0,27		
MPxCP ^{1:2} W	0,85±0,51	0,03±0,37	0,79±0,41	-1,02±0,37	-0,34±0,53	0,68±0,72	0,03±0,40	0,63±0,41	-0,19±0,43	0,00±0,74	0,02±0,49	-0,20±0,53	0,58±0,26		
m px cp ^{1:2} W*	-0,37±0,30	0,00±0,27	0,50±0,40	-0,31±0,53	-0,30±0,41	0,33±0,47	0,10±0,30	-0,29±0,36	0,03±0,39	0,17±0,26	0,30±0,44	0,21±0,27	-0,24±0,22		
TMV/NI 6 dfa	-0,24±0,52	0,06±0,52	-0,11±0,43	-0,06±0,50	-0,03±0,67	-0,07±0,56	0,50±0,63	-	-	-	-	-	-		
TMV/NI 18 dfa	0,83±0,51	0,01±0,54	0,72±0,66	0,92±0,39	1,87±0,40	1,67±0,92	1,60±0,91	-	-	-	-	-	-		
p-valor															
CP ^{1:2} W	0,3130	0,2951	0,2143	0,0080	0,4388	0,3028	0,1795	0,4082	0,0097	0,0210	0,3264	0,0377	0,4694		
MP	0,4911	0,1918	0,4940	0,4300	0,1651	0,4231	0,2458	0,4694	0,0544	0,3673	0,3653	0,1265	0,1711		
MPxCP ^{1:2} W	0,0112	0,4486	0,0223	0,0470	0,2443	0,1660	0,4665	0,0366	0,2562	0,4965	0,4741	0,2412	0,1964		
m px cp ^{1:2} W*	0,1455	0,4843	0,0673	0,2870	0,1593	0,1574	0,3453	0,1692	0,4614	0,1700	0,1932	0,1957	0,0622		
TMV/NI 6 dfa	0,3210	0,4494	0,3448	0,4400	0,4700	0,4428	0,1863	-	-	-	-	-	-		
TMV/NI 18 dfa	0,0315	0,4863	0,0763	0,0100	0,0100	0,0287	0,0362	-	-	-	-	-	-		

Finalmente, se evaluaron los niveles de acumulación de tres genes blanco de miARNs en tabaco (SPL2, ATHB8 y CSD2) (Fig. 4.4) y los datos utilizados semuestran en la Tabla 11. Su condición de genes blanco de miARNs fue previamente validada mediante una modificación de la técnica RLM-RACE (Llave *et al.*, 2002) y los resultados de estas validaciones forman parte de un trabajo publicado por nuestro grupo (Bazzini *et al.*, 2011). SPL2, validado como blanco del miR156 no mostró cambios en sus niveles de expresión en las líneas transgénicas, pese a los aumentos de su miARN regulador. ATHB8, blanco del grupo miR165/66 tampoco resulto alterado, en concordancia con la ausencia de cambio observada en su miARN regulador. CSD2, blanco del miR398, aumentó significativamente sus niveles de expresión en plantas infectadas con TMV (etapas tardías) y una fuerte reducción en la línea MPxCP^{T42W}. Al parecer el miR398 estaría actuando de forma opuesta en la infección con TMV y en las plantas MPxCP^{T42W}. Este comportamiento tiene su contraparte en la regulación de CSD2, su gen blanco.

- **Tabla 11.** Valores obtenidos luego de los análisis de datos de las RT-qPCRs, utilizados posteriormente para confeccionar la figura 4.4.

Relación	ARNm blancos de miARNs		
	SPL2-miR156	AtHB8-miR166	CSD2-miR398
CP ^{T42W}	0,30±0,26	0,01±0,36	-0,23±0,43
MP	-0,20±0,26	-0,34±0,45	-0,55±0,67
MPxCP ^{T42W}	0,39±0,35	0,00±0,35	-1,73±0,73
mpxcp ^{T42W*}	-0,28±0,35	-0,35±0,37	0,05±0,38
TMV/NI 6dpi	-	-	-0,08±0,51
TMV/NI 18dpi	-	-	2,61±1,02
p-valor			
CP ^{T42W}	0,1552	0,1692	0,2900
MP	0,1964	0,2168	0,1500
MPxCP ^{T42W}	0,0786	0,2131	0,0100
mpxcp ^{T42W*}	0,2131	0,1292	0,4500
TMV/NI 6dpi	-	-	0,4700
TMV/NI 18dpi	-	-	0,0300

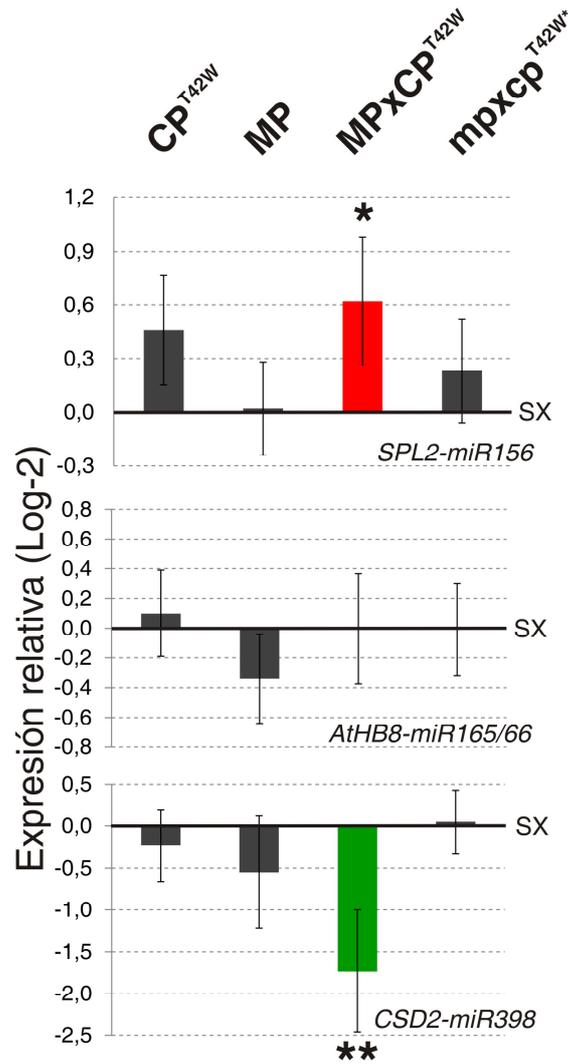


Figura 4.5. Niveles de expresión relativa (Log-2) de genes blanco de miARNs en las líneas transgénicas CP^{T42W}, MP, MPxCP^{T42W}, mpxc^{T42W}, y plantas SX infectadas con TMV a 6 y 18 dpi, determinados por RT-qPCR. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas con respecto a las plantas control, considerando un total de siete réplicas biológicas por línea evaluada (* p-valores < 0,05 y ** p-valores < 0,01).

4.3.4. Estudio del impacto del silenciamiento de Rrp42 mediante la técnica de VIGS sobre el fenotipo de *N. benthamiana*

En base a los resultados obtenidos en el perfil de expresión génica (Capítulo 2) y de acuerdo a las posteriores evidencias (expresión transitoria de GFP y análisis de expresión de genes de ARN *decay*), se podría hipotetizar que la expresión de MP y CP^{T42W} estaría causando alteraciones en los componentes del ARN exosoma o quizás en el funcionamiento del propio complejo enzimático de degradación 3'-5' y esto podría correlacionar con los cambios en la acumulación de miARNs y a su vez con la generación de síntomas de la infección con TMV. Para verificar esta hipótesis, se realizaron ensayos funcionales con el fin de explorar en detalle la participación del componente Rrp42 del núcleo del complejo ARN exosoma en el fenotipo desarrollado por la línea MPxCP^{T42W} y su asociación a la producción de síntomas de TMV. Se utilizó la técnica de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) y un sistema basado en vectores TRV para reducir la expresión de Rrp42 en *Nicotiana benthamiana*. Se agroinfiltraron 20

plantas de *N. benthamiana* (10 para cada construcción) con vectores TRV conteniendo una secuencia parcial de Rrp42 de 570 pb (Fig. 4.5 A) y se utilizó como control un vector TRV conteniendo secuencias parciales de GFP. Se confirmó el silenciamiento sistémico de Rrp42 mediante RT-qPCR (Fig. 4.5 C, barras verdes) tomando como control plantas agroinfiltradas con vectores *trv*-GFP. Los datos que permitieron la confección de los gráficos de expresión relativa se muestran en la Tabla 12. Adicionalmente, se evaluaron los niveles de expresión de Rrp41 y Rrp43 para verificar que la disrupción de la expresión de un componente individual no afecte a los demás componentes del complejo ARN exosoma (barras verdes) (Fig 4.5 C) y por otra parte, se consideró un control adicional, en donde se chequeó la ausencia de alteraciones de estos genes cuando GMP1 (un gen completamente ajeno al sistema de ARN *decay*) es silenciado sistémicamente mediante VIGS (barras grises) (Fig 4.5 C). Una vez efectuados todos los controles necesarios, se observó que las plantas *trvRrp42* redujeron drásticamente su tasa de crecimiento, mostraron numerosas alteraciones morfológicas en sus órganos vegetativos y fueron incapaces de dar inicio a la floración, resultando en un fenotipo 100% estéril (Fig. 4.5 B). Estos efectos fenotípicos producidos luego del silenciamiento de Rrp42 mediante VIGS resultan interesantes dado su parcial paralelismo a las alteraciones observadas en las líneas MPxCP^{T42W}.

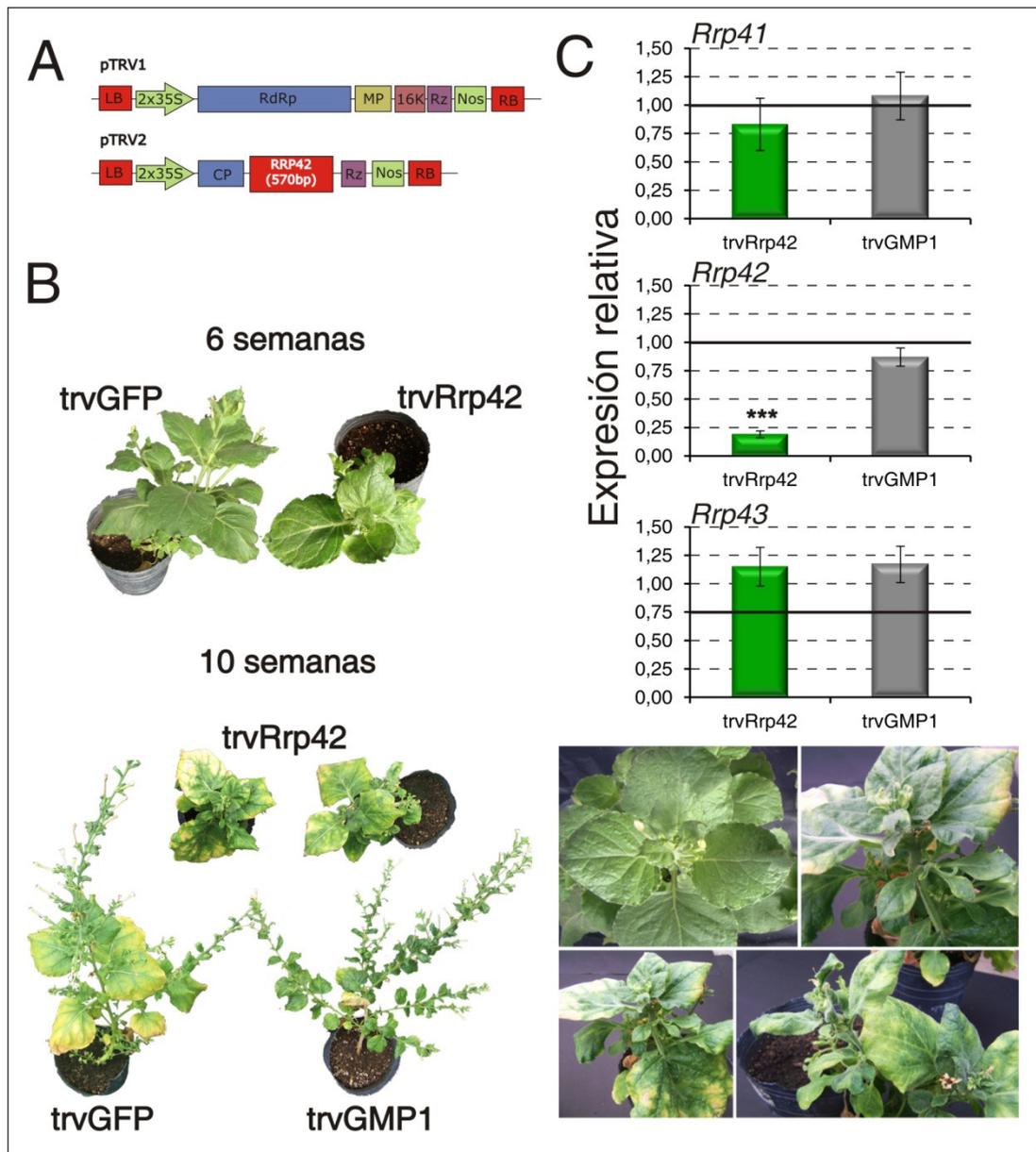


Figura 4.6. Efecto del silenciamiento de Rrp42 en el desarrollo y la morfogénesis de *N. benthamiana*. A) Esquema de las construcciones (plásmidos pTRV1 y pTRV2-Rrp42) utilizadas para realizar las infecciones con TRV mediante agroinfiltración. B) Efectos fenotípicos causados por el silenciamiento de Rrp42 luego de dos semanas transcurrida la agroinfiltración. C) Confirmación del silenciamiento de Rrp42 endógeno y verificación de la ausencia de alteraciones en los niveles de Rrp41 y Rrp43 mediante RT-qPCR. Los asteriscos indican las diferencias significativas de expresión en relación a los controles (***) indica p-valor < 0,005).

Tabla 12. Valores obtenidos luego de los análisis de datos de las RT-qPCRs, utilizados posteriormente para confeccionar la figura 4.5 C.

Relación	Rrp41	Rrp42	Rrp43
trvRrp42	0,83±0,23	0,19±0,03	1,15±0,17
trvGMP1	1,08±0,21	0,87±0,08	1,17±0,16
p-valor			
trvRrp42	0,2426	0,0006	0,2309
trvGMP1	0,3857	0,2712	0,2450

4.3.5. Impacto del silenciamiento de Rrp42 en la acumulación de genes involucrados en silenciamiento y en un conjunto de miARNs de *N. benthamiana*

Para verificar si la reducción sistémica de la expresión de Rrp42 produce algún impacto en la expresión de genes involucrados en PTGS y en la biogénesis de miARNs, así como en la propia acumulación de miARNs, se cuantificaron los niveles de expresión de DCL1, AGO1, RDR2 y RDR6 así como los genes miR156, miR164 y miR165/66. Se evaluaron los niveles de expresión de estos genes en plantas de *Nicotiana benthamiana* cuyos genes Rrp42 y GMP1 fueron silenciados sistémicamente mediante VIGS. Se utilizó como control el gen GMP1 nuevamente, para discriminar cualquier tipo de efecto producido por el silenciamiento de un gen endógeno no relacionado. Los datos que permitieron la confección de los gráficos de expresión relativa se muestran en la Tabla 13. Los resultados obtenidos, mostraron que el silenciamiento de Rrp42 produce reducciones significativas en la acumulación de DCL1 y RDR6, dato muy novedoso dado que no había sido anteriormente reportada una relación directa entre la regulación del complejo ARN exosoma y la vía de PTGS. A su vez, las determinaciones de los niveles de expresión de miARNs mostraron que en las plantas *trvRrp42* disminuyeron significativamente la acumulación de miR156, miR164 y miR165/66. Estos resultados muestran un efecto directo de la acción del complejo ARN exosoma en la acumulación de miARNs, tal vez mediado por DCL1 y RDR6 y constituye una evidencia contundente que permitiría explicar los cambios en la acumulación de miARNs y las alteraciones morfológicas en las plantas de tabaco MPxCP^{T42W}, en una forma absolutamente independiente de la acción de proteínas supresoras del silenciamiento de origen viral, pero inducidas por el complejo que forman CP^{T42W} y MP en la regulación transcripcional de la planta huésped.

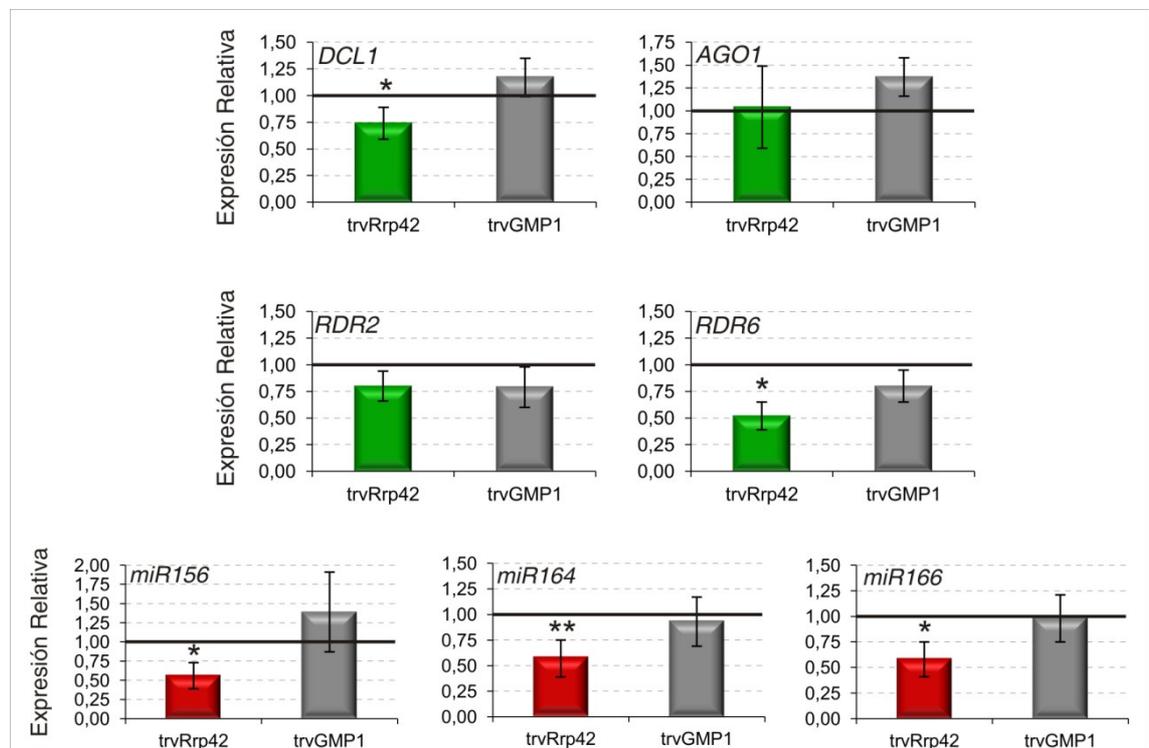


Figura 4.7. Niveles de expresión relativa de genes implicados en la maquinaria de PTGS en las líneas de *N. benthamiana* silenciadas para Rrp42 y GMP1 mediante VIGS, en relación a los controles *trv-GFP*, determinados por RT-qPCR. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas con respecto a las plantas control, considerando un total de 6 réplicas biológicas por línea evaluada (para los mARNs * p-

valores < 0,05 y ** p-valores < 0,01 y para el análisis de miARNs se consideraron * p-valores < 0,1 y ** p-valores < 0,05).

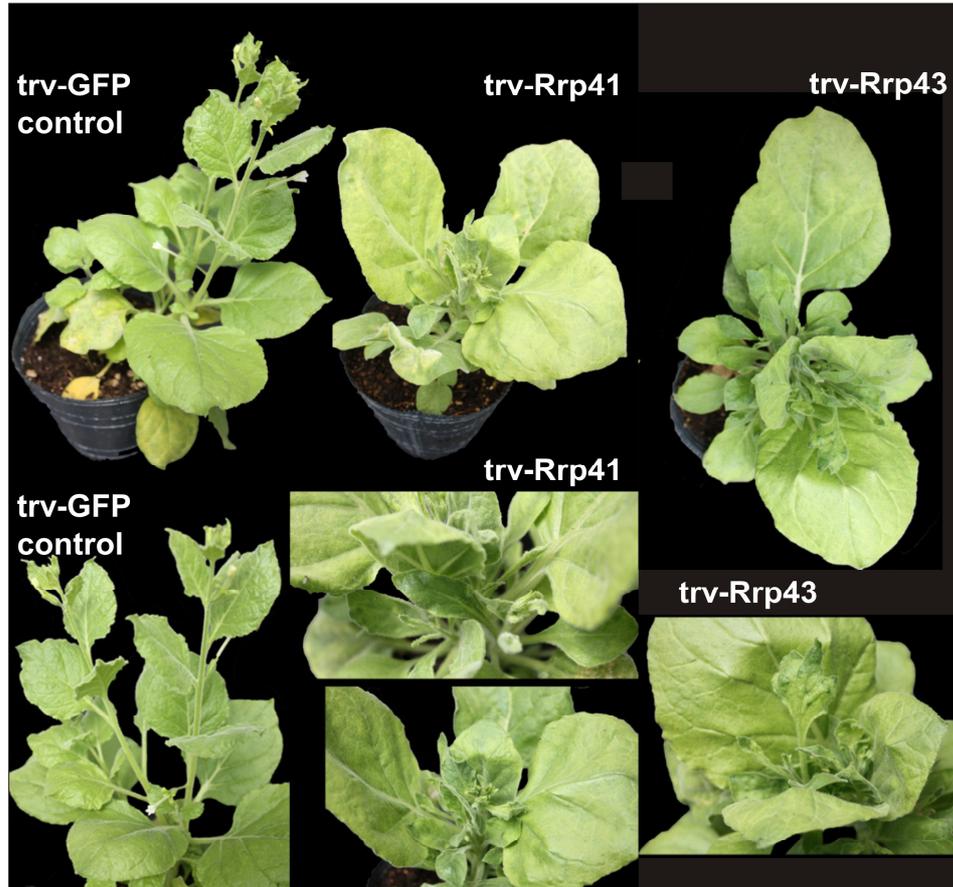
Tabla 13. Valores obtenidos luego de los análisis de datos de las RT-qPCRs, utilizados posteriormente para confeccionar la figura 4.6.

Relación	DCL1	AGO1	RDR2	RDR6	miR156	miR164	miR165
trvRrp42	0,74±0,15	1,04±0,45	0,8±0,14	0,52±0,13	0,56±0,17	0,57±0,18	0,58±0,17
trvGMP1	1,17±0,18	1,37±0,21	0,79±0,19	0,80±0,15	1,39±0,52	0,93±0,24	0,98±0,23
p-valor							
trvRrp42	0,0487	0,4204	0,0667	0,0112	0,0948	0,0237	0,0605
trvGMP1	0,2049	0,0871	0,0884	0,2240	0,1569	0,3788	0,4831

4.3.6. Estudio del impacto del silenciamiento de Rrp41 y Rrp43 mediante la técnica de VIGS sobre el fenotipo de *N. benthamiana*

Dado el efecto observado en el fenotipo y en la expresión de genes relacionados a PTGS y en la acumulación de miARNs luego del silenciamiento de Rrp42, se procedió a evaluar el efecto fenotípico resultante del silenciamiento de los putativos componentes del ARN exosoma Rrp41 y Rrp43, que mostraron niveles aumentados en la línea MPxCP^{T42W} y en infecciones virales a tiempos tardíos (18 dpi). Se utilizó nuevamente la técnica de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) y un sistema basado en vectores TRV para reducir la expresión de estos dos genes en *Nicotiana benthamiana*. Se agroinfiltraron plantas con soluciones de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa GV3101) conteniendo vectores TRV transformados, en el primer caso con una secuencia parcial de Rrp41 de 450 pb (trv-Rrp41) y en el segundo caso, con otro vector TRV conteniendo una secuencia parcial de Rrp43 de 350 pb (trv-Rrp43). Como control se utilizó nuevamente un vector TRV conteniendo secuencias parciales de GFP. Luego de dos semanas de transcurrida la infección se observó que las plantas redujeron su tasa de crecimiento en relación a los controles infectados con el vector trv-GFP y resultó muy interesante el fenotipo alterado que desarrollaron en la morfogénesis de las hojas, cuya manifestación fue más evidente luego de tres a cuatro semanas post agroinfiltración (Fig. 4.7A). También resultó interesante observar que en la superficies foliares se manifestaron mosaicos en la pigmentación, similares a los síntomas de la enfermedad viral con TMV. Las alteraciones observadas fueron similares en ambos casos (trv-Rrp41 y trv-Rrp43) pero muy diferentes a los fenotipos desarrollados por el silenciamiento de Rrp42. Se procedió a confirmar el silenciamiento de Rrp41 y Rrp43 endógenos mediante RT-qPCR (Fig 4.7B) y se verificará en el futuro si existe algún tipo de regulación conjunta con respecto a otros genes relacionados a PTGS, ARN *decay* que podrían estar alterados como consecuencia del silenciamiento de estos componentes del ARN exosoma. A través de estos análisis y extrapolando los resultados obtenidos, se podrían determinar puntos clave en la regulación de las alteraciones observadas en las plantas transgénicas de tabaco que expresan las proteínas virales CP^{T42W} y MP que puedan explicarse por alteraciones en miARNs. Finalmente, estas extrapolaciones deberán ser verificadas en las plantas de tabaco.

A



B

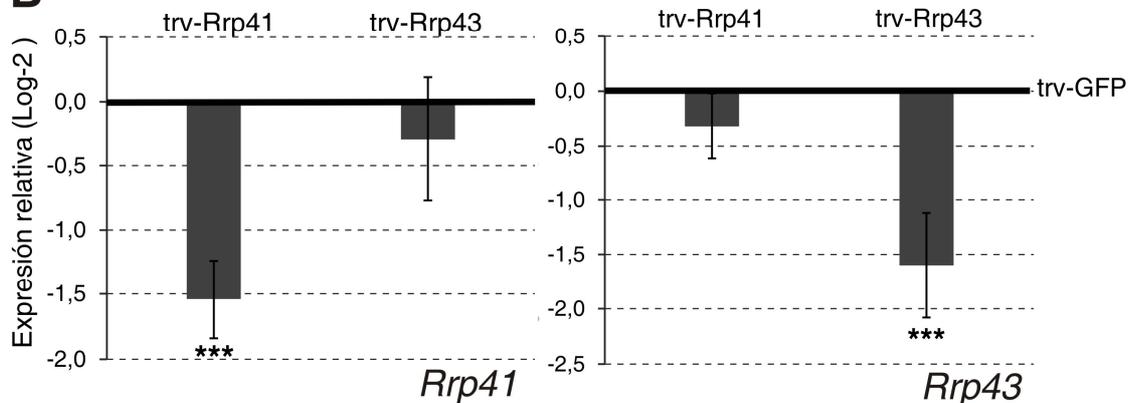


Figura 4.8. Efecto del silenciamiento de Rrp41 y Rrp43 en el desarrollo y la morfogénesis de *N. benthamiana*. A) Reducción en la tasa de crecimiento y defectos en el desarrollo observados en las plantas de *N. benthamiana* luego de cuatro semanas post agroinfiltración con los vectores trv-Rrp41 y trv-Rrp43 en relación a los controles trvGFP. B) Confirmación del silenciamiento de Rrp41 y Rrp43 endógenos mediante RT-qPCR.

4.3.7. Estudio del impacto del silenciamiento de Rrp41 y Rrp43 en la acumulación de miARNs en *N. benthamiana*

Para verificar si la reducción sistémica de la expresión de Rrp41 y Rrp43 produce, al igual que en el caso de Rrp42, alteraciones en la acumulación de miARNs se cuantificaron los niveles de expresión de un panel de miARNs en plantas de *Nicotiana benthamiana* cuyos genes Rrp41 y Rrp43 fueron silenciados sistémicamente mediante

VIGS (Fig. 4.8). Se utilizaron como control plantas trv-GFP, para discriminar los efectos producidos por la replicación del virus TRV. Los datos que permitieron la confección de los gráficos de expresión relativa se muestran en la Tabla 14. Los resultados obtenidos, mostraron que tanto el silenciamiento de Rrp41 como Rrp43 produjeron reducciones significativas en la acumulación de miR167 y miR172 y aumentos en la acumulación de miR398. A su vez, las plantas trvRrp43 disminuyeron significativamente la acumulación de miR164 y miR165/66. Estos resultados muestran un efecto directo de la acción del complejo ARN exosoma en la acumulación de miARNs y constituye una vez más, una evidencia contundente que permitiría explicar los cambios en la acumulación de miARNs y las alteraciones morfológicas en las plantas de tabaco MPxCP^{T42W}.

Tabla 14. Valores obtenidos luego de los análisis de datos de las RT-qPCRs, utilizados posteriormente para confeccionar la figura 4.8.

Relación	miR156	miR164	miR165/66	miR167	miR172	miR390	miR398
trvRrp41	0,33±0,49	0,45±0,43	-0,07±0,45	-0,85±0,68	-0,97±0,49	-0,25±0,38	2,45±0,81
trvRrp43	-0,05±0,66	-0,88±0,59	-0,70±0,55	-1,84±0,91	-1,32±0,56	-0,13±0,50	1,64±0,92
p-valor							
trvRrp41	0,2711	0,1097	0,4232	0,0112	0,0875	0,2290	0,0235
trvRrp43	0,4619	0,0155	0,0337	0,0240	0,0220	0,3568	0,0632

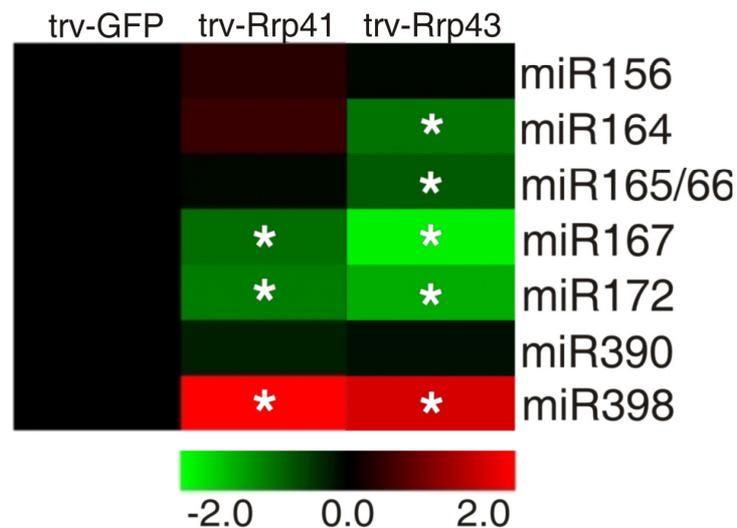


Figura 4.9. Niveles de expresión relativa de miARNs maduros en las líneas de *N. benthamiana* silenciadas para Rrp41 y Rrp43 mediante VIGS, en relación a los controles trv-GFP, determinados por RT-qPCR. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas con respecto a las plantas control, considerando un total de 6 réplicas biológicas por línea evaluada (* p-valor < 0,1). El esquema obtenido mediante la herramienta MultiExperimentViewer v.4.2.01, asocia la coloración roja con aumentos de expresión y el color verde con reducciones de expresión teniendo como referencia la escala numérica a la derecha

4.4. Discusión

De acuerdo a los resultados obtenidos por Bazzini *et al.*, (2007), donde se demuestra que las alteraciones en la acumulación de un panel de miARNs en las plantas transgénicas en estudio no guarda relación con la presencia de proteínas supresoras del silenciamiento de TMV, en esta tesis se confirmó el mismo efecto mediante la tecnología de RT-qPCR para miARNs. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada con el fin de detectar la expresión diferencial de miARNs en *N. tabacum* y otras especies (Frazier *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2011) y posee ciertas ventajas con respecto al *Northern blot*, por ejemplo, que no requiere el uso de grandes cantidades de ARN para confeccionar el ADNc, la obtención de resultados puede ser más rápida y su cuantificación es más precisa y adecuada que en el caso de la técnica de *Northern blot* y la reproducibilidad es alta dado que pueden incluirse en el análisis un elevado número de réplicas biológicas. Los resultados obtenidos en la figura 4.1 confirman casi en su totalidad los obtenidos en Bazzini *et al.*, (2007) que indican que las plantas MPxCP^{T42W} muestran un set de miARNs alterados y a su vez amplían el panel de miARNs analizados.

En el caso del miR156, ambas técnicas mostraron incrementos en su expresión en las plantas de tabaco de la línea MPxCP^{T42W}. La reducción del nivel de este miARN es necesaria para que se produzcan los cambios de fase vegetativa juvenil a adulta en *N. benthamiana* (Yang *et al.*, 2011). En *Arabidopsis thaliana*, la sobreexpresión del miR156 mostró un retraso moderado en la floración y una severa pérdida de dominancia apical (Schwab *et al.*, 2005). Se demostró también que plantas doble mutantes para los genes SPL9 y SPL15 (genes blanco de la acción del miR156) mostraron fenotipos similares a las plantas sobreexpresantes de miR156b (Schwarz *et al.*, 2008), con alteraciones en la transición vegetativa juvenil a adulta. También se demostró que el miR156 y uno de sus genes blanco (SPL3) en conjunto con el factor FT (*FLOWERING LOCUS T*) son necesarios para la regulación de la floración en respuesta a la temperatura ambiente (Kim *et al.*, 2012). Con toda esta información, resulta interesante hipotetizar que los aumentos observados en la acumulación de miR156 podrían estar asociados a las alteraciones en la regulación del desarrollo de la línea MPxCP^{T42W}, que muestra un leve retraso con respecto a los controles (Bazzini *et al.*, 2007). Esta hipótesis estaría apoyada por el trabajo de Amin *et al.*, (2012), donde se demuestra que la acumulación de miR156 también se encuentra alterada diferencialmente en respuesta a infecciones virales, en este caso con un panel de begomovirus. Cabe destacar que a pesar de haber detectado aumentos en la acumulación del miR156 maduro en plantas MPxCP^{T42W} el gen blanco cuyos niveles de expresión se evaluaron en este trabajo (SPL2) no mostró alteraciones significativas (Fig. 4.4), siendo posible que el efecto de este miARN regule otros de los ya descritos genes blanco de la familia SPL (Wu y Poethig, 2006) o participe en una regulación tipo *feedback* donde el nivel de transcripción y el miRNA llegan a un nuevo equilibrio.

Los niveles de acumulación del miR164 no mostraron alteraciones en las plantas de la línea MPxCP^{T42W} en las determinaciones por RT-qPCR, aunque los resultados de *Northern blot* obtenidos por Bazzini *et al.*, (2007) solo mostraron alteraciones leves en estas plantas y cambios significativos únicamente en las infecciones con TMV. Se demostró también en un trabajo realizado por nuestro grupo que la transcripción del miR164a se eleva en infecciones con TMV-Cg y ORMV en *Arabidopsis* (Bazzini *et al.*, 2009). Los aumentos en los niveles de transcripción del miR164 se relacionan con cambios hormonales ligados a procesos del desarrollo, siendo auxinas y giberelinas dos hormonas disparadoras de la actividad transcripcional de este gen MIR (Bazzini *et al.*, 2009). Por otra parte, los resultados obtenidos en un segundo trabajo desarrollado por nuestro grupo, donde se cuantifican los niveles de expresión de un panel de miARNs

mediante un análisis de microarreglo y posteriores validaciones por RT-qPCR demuestran que miR164 se induce en etapas tardías de infecciones con TMV y disminuye levemente en etapas tempranas, donde el virus no ha alcanzado el tejido sistémico analizado (en consecuencia, el supresor del silenciamiento de TMV está ausente) (Bazzini *et al.*, 2011). Por lo tanto, es esperable que en plantas transgénicas que expresan CP^{T42W} y MP, donde la función supresora del silenciamiento viral no se detecta, las alteraciones en la acumulación del miR164 sean muy leves.

La acumulación del grupo miR165/66 no mostró aumentos significativos en sus niveles de expresión a diferencia de los datos obtenidos mediante *Northern blot*, donde se demuestra que miR165 aumenta su expresión en la línea MPxCP^{T42W} (Bazzini *et al.*, 2007). Estos resultados pueden diferir dado que existe una variación técnica en la especificidad entre la sonda de *Northern blot* (detecta exclusivamente el miR165) y la amplificación por PCR, cuyos oligonucleótidos no pueden diferenciar entre miR165 y miR166, cuantificando el conjunto. Por otra parte, los niveles de acumulación de miR165/66 se encontraron reducidos en plantas de tabaco infectadas con TMV y SHMV en etapas tempranas (Bazzini *et al.*, 2011) con lo cual es probable que su alteración dependa de efectos sistémicos mediados por la replicasa o de la propia replicación viral, ya que la expresión de MP y CP^{T42W} tampoco alteran miR165/66. Esto puede confirmarse también considerando que el nivel de expresión de AtHB8, uno de los genes blanco de miR165 validados no presentó cambios en las plantas transgénicas estudiadas, aunque sí lo hizo a etapas tempranas de la infección con TMV (Bazzini *et al.*, 2011), indicando un panorama muy complejo en la regulación de este grupo en respuesta infecciones virales.

Resulta interesante observar que los niveles de expresión del miR172 y miR398 mostraron alteraciones en las plantas transgénicas, aunque estos datos carecen de contraparte en los análisis de *Northern blot*. En el caso de miR172 este gen mostró reducciones significativas en plantas de la línea MP, dato que resultó notable porque estas plantas no muestran alteraciones ni en el patrón ni en los tiempos de floración. Por otro lado, la acumulación de miR172 no manifestó cambios en las plantas MPxCP^{T42W}, donde la floración se encuentra sustancialmente alterada. Este aspecto podría reflejar algún tipo de efecto amortiguador dado que ambos, miR156 y miR172 actúan formando un nodo que regula las transiciones de fases vegetativas juvenil y adulta y la inducción y morfogénesis floral (Zhu y Helliwell, 2011; Rubio-Somoza y Weigel, 2011). Los niveles de expresión del miR398 mostraron cambios significativos tanto en plantas MPxCP^{T42W} como en caso de las infecciones virales. En concordancia con estas alteraciones, uno de los genes blanco de este miARN, la CSD2, resultó disminuido en las plantas MPxCP^{T42W} e inducido en etapas tardías de infecciones con TMV. Este resultado es muy interesante, ya que sugiere que la expresión de MP y CP^{T42W} indujo la expresión de miR398 y provocó la reducción en la expresión de uno de sus genes blanco, CSD2 demostrando una relación directa con el desequilibrio oxidativo que presentan las plantas MPxCP^{T42W}. A su vez, se ha demostrado en trabajos previos que el miR398 reduce su expresión en respuesta a diversos estreses bióticos y abióticos con el consecuente aumento de la expresión de sus genes blanco (Jagadeeswaran *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2011).

De acuerdo a los resultados obtenidos en las evaluaciones de la actividad supresora del silenciamiento mediante agroinfiltraciones con GFP y p19 se sugirió la existencia de un mecanismo de alteración endógeno del silenciamiento. Esta alteración no fue afectada por la presencia del supresor p19 lo que indicaría que el mencionado mecanismo de alteración actuaría río arriba de la formación del complejo RISC (cargado de AGO1), teniendo en cuenta el modo de acción de p19. Como ya fue ampliamente descrito, p19 es la proteína supresora del silenciamiento de tombusvirus y actúa mediante el secuestro de siARNs de 21 pb impidiendo la carga normal de AGO1 (Ye *et*

al., 2003; Vargason *et al.*, 2003). Para confirmar si complejo formado por MP y CP^{T42W} actúa en la biogénesis de los sRNAs, se deberían efectuar co-agroinfiltraciones con otros supresores, que actúen a diferentes niveles. Existen diversos VSRs que actúan en distintas etapas del silenciamiento antiviral, por ejemplo en la etapa efectora, como lo es el cargado de AGO. Esta etapa es inhibida por el supresor 2b de *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Zhang *et al.*, 2006). En conjunto, existen numerosos VSRs que actúan en diferentes etapas como por ejemplo el p38 de *Turnip crinckle virus* (TCV) que actúa inhibiendo Dicer paso previo a la producción de sARNs (Ding y Voinnet, 2007) y otros, cuya acción había sido descrita en el secuestro de siARNs como los supresores p21 de *Beet yellows virus* (BYV), HcPro de los potivirus, p15 de *Peanut clump virus* (PCV), que están actualmente siendo re considerados (Schott *et al.*, 2012). La hipótesis planteada en este trabajo de tesis que sugiere la existencia de otros mecanismos de supresión endógena del silenciamiento está en concordancia con lo ya propuesto para otros sistemas virales, donde se demuestra la interacción de los supresores con factores endógenos del huésped (Ding y Voinnet, 2007). Por ejemplo, el supresor AC2 de los begomovirus es un activador de la transcripción, su localización es nuclear y posee dominios de unión a ADN. Cuando esta proteína se expresa transgénicamente induce la transcripción de aproximadamente 30 genes necesarios para ejercer su función supresora, entre ellos un posible supresor celular del silenciamiento (Trinks *et al.*, 2005). Del mismo modo, el supresor HcPro interactúa con una proteína relacionada a calmodulina (rgs-CaM) que suprime el silenciamiento cuando es sobreexpresada (Anandalakshmi *et al.*, 2000). La supresión del silenciamiento mediada por AL2, el parólogo de AC2 en los curtovirus (otro género de los geminivirus) subyace en la interacción proteína-proteína directa con una adenosina-quinasa, inhibiendo su función en la metilación de episomas virales dependiente de DCL3 (Wang y Metzloff, 2005; Buchmann *et al.*, 2009).

A su vez, algunos componentes de la maquinaria de ARN *decay* están implicados en la defensa antiviral y son fuente de alteración de miARNs. La exorribonucleasa 5'-3' XRN4 incrementa la degradación del ARN viral de *Cucumber necrosis mosaic virus* (CNV) cuando es sobreexpresado en Arabidopsis, al igual que su ortólogo XRN1p de levaduras (Cheng *et al.*, 2007). Se ha demostrado también que las plantas de *N. benthamiana* que silencian XRN4 acumulan un 50% más de ARN genómico del virus *Tomato bushy stunt tobravirus* (TBSV) e incrementan drásticamente la emergencia de nuevos ARNs virales recombinantes y parcialmente degradados (Jaag y Nagy, 2009). Del mismo modo, el silenciamiento de XRN4 mediante VIGS en *N. benthamiana* facilita la infección local y sistémica de TMV (Peng *et al.*, 2011). Por otra parte, componentes de la maquinaria de ARN *decay* implicados en el proceso de *decapping*, específicamente DCP2, es necesario para evitar el silenciamiento y degradación de transgenes en Arabidopsis. Cuando este gen se silencia se produce la acumulación de ARNm con caperuzas aberrantes que desencadenan PTGS y promueven el silenciamiento del transgen (Thran *et al.*, 2011). A su vez, DCP1 y VCS, componentes de la maquinaria de *decapping* parecen estar implicados en el procesamiento de pri-miARNs y consecuentemente en la biogénesis de miARNs, por lo tanto, los fenotipos letales que presentan las mutantes de estos genes podrían estar asociados a los defectos en el procesamiento de precursores de miARNs (Motomura *et al.*, 2012). Todas estas evidencias sugieren que la maquinaria de ARN *decay* mediada por acción de exorribonucleasas 3'-5' componentes del ARN exosoma podría estar también implicadas en la defensa antiviral o por el contrario, ser manipulada por el virus para contrarrestar la defensa y a su vez ser partícipe de la alteración de miARNs de las plantas MPxCP^{T42W}. Por esta razón y dada la letalidad de los genotipos mutantes para los componentes de ARN *decay*, la técnica de VIGS es adecuada para el estudio de estas vías. No existen en

la literatura trabajos donde se hayan utilizado genotipos mutantes. En el trabajo de Chekanova *et al.*, (2007), se han realizado estudios de *knock-down* mediante sistemas de RNAi inducibles y se han identificado de esta forma numerosos sustratos de la degradación del exosoma, entre ellos un set de ARNs pequeños nucleares y nucleolares, ARNs de transferencia y mensajeros, sumados a una amplia variedad de ARNs mensajeros que no completaron su correcto procesamiento 3', miARNs primarios y otros transcritos no codificantes nunca antes descritos, asociados a repeticiones en tándem de regiones centroméricas y pericentroméricas. Todos estos sustratos sugieren que el exosoma es una maquinaria de fundamental importancia en el control de la expresión génica en plantas. Estos resultados apoyan fuertemente la segunda hipótesis de este trabajo, donde se plantea que existen mecanismos alternativos de alteración de miARNs y que tal vez estos involucran efectos directos o indirectos de la acción del complejo ARN exosoma. Es decir, que los resultados obtenidos mostraron que la expresión de MP y CP^{T42W} produce alteraciones en la acumulación de miARNs y concomitantemente defectos en el desarrollo y morfología similares a síntomas. A su vez, en estas plantas algunos componentes del exosoma están alterados y cuando se indujeron cambios en la expresión de estos componentes mediante VIGS en *N. benthamiana* se observó que algunos miARNs también mostraron afectados sus niveles de acumulación y se produjeron nuevamente alteraciones morfológicas parecidas a síntomas. En conjunto, los resultados de este trabajo y los previamente publicados permiten suponer la existencia de una fuerte conexión entre la alteración de los componentes del exosoma mediada por las proteínas virales y alteraciones en la acumulación de miARNs, que a su vez correlacionarían con los síntomas de TMV.

4.5. Conclusiones

En conclusión, los resultados obtenidos en este capítulo han demostrado que:

- Existe un panel de miARNs alterados por la expresión conjunta de MPxCP^{T42W}.
- La expresión transgénica de CP^{T42W} y MP forma un complejo que incrementa los niveles de expresión transitoria de GFP en tejidos foliares y este efecto no es afectado por la acción del supresor del silenciamiento p19.
- La línea MPxCP^{T42W} y plantas de tabaco infectadas con TMV en etapas tardías, muestran numerosas alteraciones en la expresión de genes componentes de la maquinaria de ARN *decay*.
- Los aumentos observados en la expresión de las exorribonucleasas 3'-5' componentes del ARN exosoma en plantas de la línea MPxCP^{T42W} y en las infecciones con TMV mostró ser un mecanismo activo en la infección viral y se dispara inclusive en ausencia del supresor del silenciamiento de TMV.
- Los ensayos funcionales mediante VIGS de los componentes Rrp41, Rrp42 y Rrp43 mostraron drásticas alteraciones en el desarrollo similares a síntomas o a los efectos de los supresores virales cuando estos son expresados en plantas. A su vez, el silenciamiento inducido por VIGS de Rrp41, Rrp42 y Rrp43 produjo cambios en la acumulación de un conjunto de miARNs y de algunos de sus genes, confirmando la acción directa de la maquinaria ARN exosoma sobre el control de los niveles de miARNs maduros.

En conjunto, todas estas evidencias permiten sugerir que los componentes del ARN exosoma podrían ser alterados por el complejo formado por CP^{T42W} y MP y causar directa o indirectamente tanto alteraciones morfológicas y del desarrollo de las plantas MPxCP^{T42W} como cambios en la acumulación de miARNs. Por otro lado, en este trabajo se obtuvieron evidencias de mecanismos adicionales de generación de síntomas de TMV, independientes a los que resultan de la replicación viral y de la acción del supresor del silenciamiento.

CAPÍTULO 5
CONCLUSIONES GENERALES

El uso de plantas transgénicas que expresan proteínas virales del TMV bajo promotores constitutivos o inducibles está ampliamente extendido en el estudio de las funciones individuales de las diferentes proteínas virales durante la interacción planta-virus. Estos sistemas de expresión permitieron determinar por ejemplo, en caso de la CP de TMV, su función en la encapsidación y desencapsidación viral y en el movimiento sistémico del virus. Asimismo, se determinó que la expresión de MP de TMV posee un rol definido en el movimiento célula-célula del virus mediante su interacción con los plasmodesmos y también un efecto facilitador del movimiento de la señal de silenciamiento antiviral. Por otra parte, la expresión de la replicasa de TMV está implicada en la producción de alteraciones morfológicas en las plantas y también genera aumentos de susceptibilidad frente a infecciones con otros virus, datos acordes con la función de supresión del silenciamiento de esta proteína. Estos sistemas de expresión de proteínas virales han sido ampliamente utilizados en el laboratorio y son útiles para reducir la complejidad de la interacción planta-virus permitiendo profundizar su estudio. Nuestro laboratorio dispone de diferentes líneas de tabaco que expresan una versión mutada de CP (CP^{T42W}) y de MP, y produjo a su vez una línea doble expresante, MPxCP^{T42W}. Cuando estas proteínas co-expresan, constituyen un complejo macromolecular y son responsables de generar alteraciones en la morfología y en la expresión génica del huésped, como ya fue demostrado por el grupo. Con el objetivo de entender las alteraciones transcripcionales producidas por la expresión de estas proteínas virales y su vínculo con la enfermedad, se realizaron estudios de transcriptómica diferencial. Los resultados provenientes de los perfiles globales de expresión génica, donde se detectaron transcritos alterados por la co-expresión de CP^{T42W} y MP en plantas de tabaco, involucran genes pertenecientes a vías metabólicas relacionadas con estrés oxidativo, respuesta a hormonas, señalización, regulación de la transcripción, procesamiento de ARN, metabolismo y fotosíntesis (Tabla 3). Los genes implicados en estrés oxidativo y respuesta hormonas mostraron niveles de expresión disminuidos, sugiriendo una reducción específica (*shut off*) de la expresión génica independiente de la replicación viral medida por estas proteínas virales. Por otro lado, los aumentos de expresión de genes implicados en vías de procesamiento y degradación de ARN sugieren la activación de mecanismos de defensa del huésped o tal vez un efecto de contradefensa.

Las hipótesis planteadas en este trabajo generadas como resultado de los análisis de expresión diferencial génica fueron corroboradas satisfactoriamente:

- Se demostró que la expresión constitutiva de las proteínas virales de TMV, tanto MP como la versión mutada de CP (CP^{T42W}), producen fenotipos de estrés y defensa específicos y son capaces de modular las respuestas de defensa de un modo complejo.
 - (a) La expresión individual de MP generó respuestas inductoras de defensa, mediante la producción de ERO y hormonas de defensa (SA) (Figs. 3.1; 3.2; 3.4; 3.5 y 3.6). Por otra parte, fue responsable de modular la activación de respuestas de defensa frente a patógenos con diferentes estrategias de infección (biotróficas, hemibiotróficas o necrotróficas). MP generó aumentos de susceptibilidad frente a *Pseudomonas syringae pv tabaci* (Fig. 3.8) y *Sclerotinia sclerotiorum* (Fig 3.9) y un efecto de recuperación frente a infecciones con ARN desnudo de TMV (Fig. 3.7).
 - (b) Por el contrario, la función de CP en este mismo contexto sería opuesta, dado que reduce la expresión de algunos genes involucrados en la activación de defensa inmune como PR-1 y RDR1 (Fig. 3.6).
 - (c) Cuando ambas proteínas co-expresan, CP incrementa los efectos de MP, probablemente debido a la formación de complejos macromoleculares que exacerban la función de esta última.

- La segunda hipótesis de este trabajo plantea la existencia de un mecanismo de alteración de miARNs y de generación de síntomas independiente de la acción de supresores del silenciamiento de origen viral. Los resultados obtenidos permitieron arrojar luz y proponer una nueva alternativa de alteración del nivel de acumulación de miARNs mediada por la maquinaria endógena de ARN *decay*. Se demostró que la co-expresión de CP^{T42W} y MP genera aumentos en los niveles de expresión de genes componentes del ARN exosoma (Fig. 4.4) y más aún, ensayos de agroinfiltración con GFP mostraron aumentos en los niveles de acumulación de transcritos de GFP en plantas MPxCP^{T42W}, sugiriendo un efecto supresor del silenciamiento endógeno (Figs. 4.2 y 4.3). Por otra parte, en ensayos funcionales mediante VIGS, se demostró que el silenciamiento de los componentes del exosoma Rrp41, Rrp42 y Rrp43 generó alteraciones morfológicas similares a síntomas (Fig. 4.6 y 4.8) y alteraciones en los niveles de acumulación de miARNs (Fig. 4.7 y 4.9). Todos estos resultados sugieren un rol de la vía de ARN *decay* en las alteraciones observadas en las plantas MPxCP^{T42W} y probablemente en las infecciones virales con TMV.

En este trabajo de tesis se estudiaron dos mecanismos: defensa inmune innata y ARN *decay*. Ninguno de estos aspectos había sido ampliamente estudiado en conjunto en relación a infecciones virales en trabajos previos, dado que habitualmente se considera que el silenciamiento génico antiviral es el actor principal, tanto en la activación de la defensa antiviral como en la generación de síntomas. Los resultados obtenidos en este trabajo ofrecen una visión diferente y muy enriquecedora de la interacción planta-virus, que demuestra claramente la existencia de otros factores que cumplen roles fundamentales en la defensa y la sintomatología de las infecciones. Y a pesar de que defensa inmune y ARN *decay* no parecen ser dos mecanismos estrechamente relacionados, tal vez en la interacción planta-virus, la activación del primero genera alteraciones en el segundo y/o viceversa, es decir que por ejemplo, el efecto *shut off* de genes de detoxificación de ERO podría ser consecuencia de los incrementos en el *decay* de ARNs endógenos.

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que en el contexto de una infección viral, las proteínas CP y MP cumplen roles de fundamental relevancia en la expresión génica y en la fisiología del huésped, tanto mediante la modulación de las respuestas de defensa innata como a través de la alteración de la maquinaria de ARN *decay*. Estos efectos combinados, sumados a las alteraciones en la fisiología del huésped mediadas por la replicación activa del virus, probablemente constituyen factores determinantes de la aparición de síntomas. A su vez, las funciones de cada proteína individual en la modulación de la defensa del huésped sugieren la existencia de un equilibrio preestablecido entre defensa y contradefensa, de modo tal que durante el transcurso de una infección, la virulencia permanezca controlada y los niveles máximos de severidad potencial no sean alcanzados. De esta forma, el balance de la progresión de los síntomas no agotaría tempranamente los recursos del huésped y prolongaría su subsistencia.

Este trabajo constituye un nuevo aporte al conocimiento de la interacción virus-planta y sienta bases para estudiar:

- El rol activo de la inmunidad innata en la defensa antiviral durante interacciones planta-virus compatibles y la interacción entre el sistema de defensa y el silenciamiento génico antiviral. Datos previos que vinculan la señalización mediada por SA con componentes de la vía de silenciamiento como RDR1 junto con datos obtenidos en este trabajo, que demostraron la regulación negativa de RDR1 por la proteína viral CP, apoyan la idea de la existencia de un sistema de defensa integrado, donde el silenciamiento es un componente más de una maquinaria compleja.

- La influencia de las alteraciones generadas por una infección viral en la defensa contra otros patógenos, situación de infecciones mixtas que se presenta habitualmente a campo.
- Un nuevo mecanismo alternativo de alteración de miARNs y consecuentemente de generación de síntomas, que actuaría simultáneamente a la acción de los supresores del silenciamiento virales y estaría mediado por la modulación de genes endógenos. Queda aún por responder si el origen de esta alteración representa la activación de un mecanismo de defensa antiviral por parte de la planta o si responde a la activación de mecanismos de contradefensa del virus.

Los resultados obtenidos constituyen un importante aporte al entendimiento de las bases moleculares de la defensa antiviral y del desarrollo de síntomas y proveen herramientas para el diseño de nuevas estrategias biotecnológicas de control de virosis en cultivos de interés agronómico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Able, A. J. (2003). Role of reactive oxygen species in the response of barley to necrotrophic pathogens. *Protoplasma* 221(1-2): 137-143.
- Alamillo, J. M., Saenz, P. & Garcia, J. A. (2006). Salicylic acid-mediated and RNA-silencing defense mechanisms cooperate in the restriction of systemic spread of plum pox virus in tobacco. *Plant J* 48(2): 217-227.
- Almon, E., Horowitz, M., Wang, H. L., Lucas, W. J., Zamski, E. & Wolf, S. (1997). Phloem-Specific Expression of the Tobacco Mosaic Virus Movement Protein Alters Carbon Metabolism and Partitioning in Transgenic Potato Plants. *Plant Physiol* 115(4): 1599-1607.
- Alvarez, M. E. (2000). Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol Biol* 44(3): 429-442.
- Allan, A. C., Lapidot, M., Culver, J. N. & Fluhr, R. (2001). An early tobacco mosaic virus-induced oxidative burst in tobacco indicates extracellular perception of the virus coat protein. *Plant Physiol* 126(1): 97-108.
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A. M., Sung, G. H., Spatafora, J. W. & Carrington, J. C. (2004). Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* 36(12): 1282-1290.
- Amin, I., Patil, B. L., Briddon, R. W., Mansoor, S. & Fauquet, C. M. (2012). A common set of developmental miRNAs are upregulated in *Nicotiana benthamiana* by diverse begomoviruses. *Virology* 438: 143.
- Anandalakshmi, R., Marathe, R., Ge, X., Herr, J. M., Jr., Mau, C., Mallory, A., Pruss, G., Bowman, L. & Vance, V. B. (2000). A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 290(5489): 142-144.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G. J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A. C., Smith, T. H. & Vance, V. B. (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(22): 13079-13084.
- Andersen, C. L., Jensen, J. L. & Orntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64(15): 5245-5250.
- Anderson, J. P., Badruzsaufari, E., Schenk, P. M., Manners, J. M., Desmond, O. J., Ehlert, C., Maclean, D. J., Ebert, P. R. & Kazan, K. (2004). Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16(12): 3460-3479.
- Anderson, J. S. & Parker, R. P. (1998). The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J* 17(5): 1497-1506.
- Apel, K. & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373-399.
- Aranda, M. & Maule, A. (1998). Virus-induced host gene shutoff in animals and plants. *Virology* 243(2): 261-267.
- Aranda, M. A., Escaler, M., Wang, D. & Maule, A. J. (1996). Induction of HSP70 and polyubiquitin expression associated with plant virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(26): 15289-15293.
- Ares, X., Calamante, G., Cabral, S., Lodge, J., Hemenway, P., Beachy, R. N. & Mentaberry, A. (1998). Transgenic plants expressing potato virus X ORF2

- protein (p24) are resistant to tobacco mosaic virus and Ob tobamoviruses. *J Virol* 72(1): 731-738.
- Asurmendi, S., Berg, R. H., Koo, J. C. & Beachy, R. N. (2004). Coat protein regulates formation of replication complexes during tobacco mosaic virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(5): 1415-1420.
- Asurmendi, S., Berg, R. H., Smith, T. J., Bendahmane, M. & Beachy, R. N. (2007). Aggregation of TMV CP plays a role in CP functions and in coat-protein-mediated resistance. *Virology* 366(1): 98-106.
- Atkins, D., Hull, R., Wells, B., Roberts, K., Moore, P. & Beachy, R. N. (1991). The tobacco mosaic virus 30K movement protein in transgenic tobacco plants is localized to plasmodesmata. *J Gen Virol* 72 (Pt 1): 209-211.
- Baebler, S., Stare, K., Kovac, M., Blejec, A., Prezelj, N., Stare, T., Kogovsek, P., Pompe-Novak, M., Rosahl, S., Ravnkar, M. & Gruden, K. (2011). Dynamics of responses in compatible potato-Potato virus Y interaction are modulated by salicylic acid. *PLoS One* 6(12): e29009.
- Bajda, A., Konopka-Postupolska, D., Krzymowska, M., Hennig, J., Skorupinska-Tudek, K., Surmacz, L., Wojcik, J., Matysiak, Z., Chojnacki, T., Skorzynska-Polit, E., Drazkiewicz, M., Patrzylas, P., Tomaszewska, M., Kania, M., Swist, M., Danikiewicz, W., Piotrowska, W. & Swiezewska, E. (2009). Role of polyisoprenoids in tobacco resistance against biotic stresses. *Physiol Plant* 135(4): 351-364.
- Balachandran, S., Hull, R. J., Martins, R. A., Vaadia, Y. & Lucas, W. J. (1997). Influence of Environmental Stress on Biomass Partitioning in Transgenic Tobacco Plants Expressing the Movement Protein of Tobacco Mosaic Virus. *Plant Physiol* 114(2): 475-481.
- Balagopal, V. & Parker, R. (2009). Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. *Curr Opin Cell Biol* 21(3): 403-408.
- Bari, R. & Jones, J. D. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol* 69(4): 473-488.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116(2): 281-297.
- Barth, C., Moeder, W., Klessig, D. F. & Conklin, P. L. (2004). The timing of senescence and response to pathogens is altered in the ascorbate-deficient Arabidopsis mutant vitamin c-1. *Plant Physiol* 134(4): 1784-1792.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* 431(7006): 356-363.
- Baulcombe, D. (2005). RNA silencing. *Trends Biochem Sci* 30(6): 290-293.
- Bazzini, A. A., Almasia, N. I., Manacorda, C. A., Mongelli, V. C., Conti, G., Maroniche, G. A., Rodriguez, M. C., Distefano, A. J., Hopp, H. E., del Vas, M. & Asurmendi, S. (2009). Virus infection elevates transcriptional activity of miR164a promoter in plants. *BMC Plant Biol* 9: 152.
- Bazzini, A. A., Asurmendi, S., Hopp, H. E. & Beachy, R. N. (2006). Tobacco mosaic virus (TMV) and potato virus X (PVX) coat proteins confer heterologous interference to PVX and TMV infection, respectively. *J Gen Virol* 87(Pt 4): 1005-1012.
- Bazzini, A. A., Hopp, H. E., Beachy, R. N. & Asurmendi, S. (2007). Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(29): 12157-12162.
- Bazzini, A. A., Manacorda, C. A., Tohge, T., Conti, G., Rodriguez, M. C., Nunes-Nesi, A., Villanueva, S., Fernie, A. R., Carrari, F. & Asurmendi, S. (2011). Metabolic

- and miRNA profiling of TMV infected plants reveals biphasic temporal changes. *PLoS One* 6(12): e28466.
- Beclin, C., Berthome, R., Palauqui, J. C., Tepfer, M. & Vaucheret, H. (1998). Infection of tobacco or Arabidopsis plants by CMV counteracts systemic post-transcriptional silencing of nonviral (trans)genes. *Virology* 252(2): 313-317.
- Beffa, R. S., Hofer, R. M., Thomas, M. & Meins, F., Jr. (1996). Decreased Susceptibility to Viral Disease of [beta]-1,3-Glucanase-Deficient Plants Generated by Antisense Transformation. *Plant Cell* 8(6): 1001-1011.
- Belostotsky, D. A. & Sieburth, L. E. (2009). Kill the messenger: mRNA decay and plant development. *Curr Opin Plant Biol* 12(1): 96-102.
- Bendahmane, M., Chen, I., Asurmendi, S., Bazzini, A. A., Szecsi, J. & Beachy, R. N. (2007). Coat protein-mediated resistance to TMV infection of *Nicotiana tabacum* involves multiple modes of interference by coat protein. *Virology* 366(1): 107-116.
- Bendahmane, M., Fitchen, J. H., Zhang, G. & Beachy, R. N. (1997). Studies of coat protein-mediated resistance to tobacco mosaic tobamovirus: correlation between assembly of mutant coat proteins and resistance. *J Virol* 71(10): 7942-7950.
- Bendahmane, M., Szecsi, J., Chen, I., Berg, R. H. & Beachy, R. N. (2002). Characterization of mutant tobacco mosaic virus coat protein that interferes with virus cell-to-cell movement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(6): 3645-3650.
- Benes, V. & Castoldi, M. (2010). Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods* 50(4): 244-249.
- Benjamini, Y. a. H., Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B*, (57): 289-300.
- Boller, T. & He, S. Y. (2009). Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* 324(5928): 742-744.
- Braut, V., Pfeffer, S., Erdinger, M., Mutterer, J. & Ziegler-Graff, V. (2002). Virus-induced gene silencing in transgenic plants expressing the minor capsid protein of Beet western yellows virus. *Mol Plant Microbe Interact* 15(8): 799-807.
- Braun, C. J. & Hemenway, C. L. (1992). Expression of Amino-Terminal Portions or Full-Length Viral Replicase Genes in Transgenic Plants Confers Resistance to Potato Virus X Infection. *Plant Cell* 4(6): 735-744.
- Brazma, A., Hingamp, P., Quackenbush, J., Sherlock, G., Spellman, P., Stoeckert, C., Aach, J., Ansorge, W., Ball, C. A., Causton, H. C., Gaasterland, T., Glenisson, P., Holstege, F. C., Kim, I. F., Markowitz, V., Matese, J. C., Parkinson, H., Robinson, A., Sarkans, U., Schulze-Kremer, S., Stewart, J., Taylor, R., Vilo, J. & Vingron, M. (2001). Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* 29(4): 365-371.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W. X., Ji, L. H., Ding, S. W. & Baulcombe, D. C. (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J* 17(22): 6739-6746.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y. Y., Sieburth, L. & Voinnet, O. (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320(5880): 1185-1190.
- Buchmann, R. C., Asad, S., Wolf, J. N., Mohannath, G. & Bisaro, D. M. (2009). Geminivirus AL2 and L2 proteins suppress transcriptional gene silencing and cause genome-wide reductions in cytosine methylation. *J Virol* 83(10): 5005-5013.

- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J. & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55(4): 611-622.
- Callaway, A., Giesman-Cookmeyer, D., Gillock, E. T., Sit, T. L. & Lommel, S. A. (2001). The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annu Rev Phytopathol* 39: 419-460.
- Carr, J. P., Beachy, R. N. & Klessig, D. F. (1989). Are the PR1 proteins of tobacco involved in genetically engineered resistance to TMV? *Virology* 169(2): 470-473.
- Cecchini, E., Gong, Z., Geri, C., Covey, S. N. & Milner, J. J. (1997). Transgenic Arabidopsis lines expressing gene VI from cauliflower mosaic virus variants exhibit a range of symptom-like phenotypes and accumulate inclusion bodies. *Mol Plant Microbe Interact* 10(9): 1094-1101.
- Citovsky, V., Knorr, D., Schuster, G. & Zambryski, P. (1990). The P30 movement protein of tobacco mosaic virus is a single-strand nucleic acid binding protein. *Cell* 60(4): 637-647.
- Colville, L. & Smirnoff, N. (2008). Antioxidant status, peroxidase activity, and PR protein transcript levels in ascorbate-deficient Arabidopsis thaliana vtc mutants. *J Exp Bot* 59(14): 3857-3868.
- Conklin, P. L., Saracco, S. A., Norris, S. R. & Last, R. L. (2000). Identification of ascorbic acid-deficient Arabidopsis thaliana mutants. *Genetics* 154(2): 847-856.
- Cuozzo, M., O'Connell, K., Kaniewski, W., Fang, R., Chua, N. & Tumer, N. (1988). Viral protection in transgenic plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. *Biotechnology* 6: 549-557.
- Curaba, J. & Chen, X. (2008). Biochemical activities of Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase 6. *J Biol Chem* 283(6): 3059-3066.
- Cutt, J. R., Harpster, M. H., Dixon, D. C., Carr, J. P., Dunsmuir, P. & Klessig, D. F. (1989). Disease response to tobacco mosaic virus in transgenic tobacco plants that constitutively express the pathogenesis-related PR1b gene. *Virology* 173(1): 89-97.
- Chapman, E. J., Prokhnevsky, A. I., Gopinath, K., Dolja, V. V. & Carrington, J. C. (2004). Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev* 18(10): 1179-1186.
- Chekanova, J. A., Dutko, J. A., Mian, I. S. & Belostotsky, D. A. (2002). Arabidopsis thaliana exosome subunit AtRrp4p is a hydrolytic 3'→5' exonuclease containing S1 and KH RNA-binding domains. *Nucleic Acids Res* 30(3): 695-700.
- Chekanova, J. A., Gregory, B. D., Reverdatto, S. V., Chen, H., Kumar, R., Hooker, T., Yazaki, J., Li, P., Skiba, N., Peng, Q., Alonso, J., Brukhin, V., Grossniklaus, U., Ecker, J. R. & Belostotsky, D. A. (2007). Genome-wide high-resolution mapping of exosome substrates reveals hidden features in the Arabidopsis transcriptome. *Cell* 131(7): 1340-1353.
- Chekanova, J. A., Shaw, R. J., Wills, M. A. & Belostotsky, D. A. (2000). Poly(A) tail-dependent exonuclease AtRrp41p from Arabidopsis thaliana rescues 5.8 S rRNA processing and mRNA decay defects of the yeast ski6 mutant and is found in an exosome-sized complex in plant and yeast cells. *J Biol Chem* 275(42): 33158-33166.
- Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Barbisin, M., Xu, N. L., Mahuvakar, V. R., Andersen, M. R., Lao, K. Q., Livak, K. J. & Guegler, K. J. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33(20): e179.

- Cheng, C. P., Jaag, H. M., Jonczyk, M., Serviene, E. & Nagy, P. D. (2007). Expression of the Arabidopsis Xrn4p 5'-3' exoribonuclease facilitates degradation of tombusvirus RNA and promotes rapid emergence of viral variants in plants. *Virology* 368(2): 238-248.
- Chiba, Y. & Green, P. (2009). mRNA Degradation Machinery in Plants. *J. Plant Biol.* 52: 114-124.
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B. & Staskawicz, B. J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124(4): 803-814.
- Chivasa, S., Murphy, A. M., Naylor, M. & Carr, J. P. (1997). Salicylic Acid Interferes with Tobacco Mosaic Virus Replication via a Novel Salicylhydroxamic Acid-Sensitive Mechanism. *Plant Cell* 9(4): 547-557.
- Christie, M., Brosnan, C. A., Rothnagel, J. A. & Carroll, B. J. (2011). RNA decay and RNA silencing in plants: competition or collaboration? *Front Plant Sci* 2: 99.
- Dallas, P. B., Gottardo, N. G., Firth, M. J., Beesley, A. H., Hoffmann, K., Terry, P. A., Freitas, J. R., Boag, J. M., Cummings, A. J. & Kees, U. R. (2005). Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR -- how well do they correlate? *BMC Genomics* 6: 59.
- Dat, J., Vandenamele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D. & Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* 57(5): 779-795.
- Dat, J. F., Pellinen, R., Beeckman, T., Van De Cotte, B., Langebartels, C., Kangasjarvi, J., Inze, D. & Van Breusegem, F. (2003). Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *Plant J* 33(4): 621-632.
- Deom, C. M., Oliver, M. J. & Beachy, R. N. (1987). The 30-kilodalton gene product of tobacco mosaic virus potentiates virus movement. *Science* 237(4813): 389-394.
- Deom, C. M., Schubert, K. R., Wolf, S., Holt, C. A., Lucas, W. J. & Beachy, R. N. (1990). Molecular characterization and biological function of the movement protein of tobacco mosaic virus in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(9): 3284-3288.
- Diaz-Vivancos, P., Clemente-Moreno, M. J., Rubio, M., Olmos, E., Garcia, J. A., Martinez-Gomez, P. & Hernandez, J. A. (2008). Alteration in the chloroplastic metabolism leads to ROS accumulation in pea plants in response to plum pox virus. *J Exp Bot* 59(8): 2147-2160.
- Diliberto et al, E. H., GD; Daniels AJ (1983). Characterization of ascorbic acid transport by adrenomedullary chromaffin cells. *J Biol Chem* 258: 12886-12894
- Ding, S. W. & Voinnet, O. (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130(3): 413-426.
- Dong, X. (2004). NPR1, all things considered. *Curr Opin Plant Biol* 7(5): 547-552.
- Duan, Y. P., Powell, C. A., Purcifull, D. E., Broglio, P. & Hiebert, E. (1997). Phenotypic variation in transgenic tobacco expressing mutated geminivirus movement/pathogenicity (BC1) proteins. *Mol Plant Microbe Interact* 10(9): 1065-1074.
- Durgbanshi, A., Arbona, V., Pozo, O., Miersch, O., Sancho, J. V. & Gomez-Cadenas, A. (2005). Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 53(22): 8437-8442.
- Durrant, W. E. & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* 42: 185-209.

- Edreva, A. (2005). Pathogenesis-Related Proteins: Research Progress in the Last 15 Years. *Gen. Appl. Plant Physiology* 31(1-2): 105-124.
- Epel, B. L. (2009). Plant viruses spread by diffusion on ER-associated movement-protein-rafts through plasmodesmata gated by viral induced host beta-1,3-glucanases. *Semin Cell Dev Biol* 20(9): 1074-1081.
- Faize, M. B., L.; Faize L., Petri C., Barba-Espin, G.; Díaz-Vivancos, P.; Clemente-Moreno, M. J.; Alburquerque, N. and Hernandez, J. A. (2011). Modulation of tobacco bacterial disease resistance using cytosolic ascorbate peroxidase and Cu,Zn-superoxide dismutase. *Plant Pathology* Early view (online version).
- Farriol, M. &Orta, X. (2005). Influence of reagent formulation on mRNA quantification by RT-PCR using imported external standard curves. *Acta Biochim Pol* 52(4): 845-848.
- Fernández Valiela, M. V. (1995). Los virus patógenos de las plantas y su control 1. *Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria* 4ta ed(Bs As): 701 pp.
- Fodor, J., Gullner, G., Adam, A. L., Barna, B., Komives, T. &Kiraly, Z. (1997). Local and Systemic Responses of Antioxidants to Tobacco Mosaic Virus Infection and to Salicylic Acid in Tobacco (Role in Systemic Acquired Resistance). *Plant Physiol* 114(4): 1443-1451.
- Foyer, C. H., Kiddle, G. &Verrier, P. (2007). Transcriptional profiling approaches to understanding how plants regulate growth and defence: a case study illustrated by analysis of the role of vitamin C. *EXS* 97: 55-86.
- Frazier, T. P., Xie, F., Freistaedter, A., Burklew, C. E. &Zhang, B. (2010). Identification and characterization of microRNAs and their target genes in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Planta* 232(6): 1289-1308.
- Garcia-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E. J., Sullivan, C. M., Fahlgren, N., Bremmelis, K. J. &Carrington, J. C. (2010). Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection. *Plant Cell* 22(2): 481-496.
- Gazzani, S., Lawrenson, T., Woodward, C., Headon, D. &Sablowski, R. (2004). A link between mRNA turnover and RNA interference in Arabidopsis. *Science* 306(5698): 1046-1048.
- German, M. A., Pillay, M., Jeong, D. H., Hetawal, A., Luo, S., Janardhanan, P., Kannan, V., Rymarquis, L. A., Nobuta, K., German, R., De Paoli, E., Lu, C., Schroth, G., Meyers, B. C. &Green, P. J. (2008). Global identification of microRNA-target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends. *Nat Biotechnol* 26(8): 941-946.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 43: 205-227.
- Godoy, G., Steadman, J. R., Dickman, M. B. &Dam, R. (1990). Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiol Mol Plant Pathol* 37: 179-191.
- Goeres, D. C., Van Norman, J. M., Zhang, W., Fauver, N. A., Spencer, M. L. &Sieburth, L. E. (2007). Components of the Arabidopsis mRNA decapping complex are required for early seedling development. *Plant Cell* 19(5): 1549-1564.
- Gohre, V. &Robatzek, S. (2008). Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu Rev Phytopathol* 46: 189-215.
- Golem, S. &Culver, J. N. (2003). Tobacco mosaic virus induced alterations in the gene expression profile of Arabidopsis thaliana. *Mol Plant Microbe Interact* 16(8): 681-688.
- Govrin, E. M. &Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr Biol* 10(13): 751-757.

- Grant, M. & Lamb, C. (2006). Systemic immunity. *Curr Opin Plant Biol* 9(4): 414-420.
- Guenin, S., Mauriat, M., Pelloux, J., Van Wuytswinkel, O., Bellini, C. & Gutierrez, L. (2009). Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *J Exp Bot* 60(2): 487-493.
- Guenoune-Gelbart, D., Elbaum, M., Sagi, G., Levy, A. & Epel, B. L. (2008). Tobacco mosaic virus (TMV) replicase and movement protein function synergistically in facilitating TMV spread by lateral diffusion in the plasmodesmal desmotubule of *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Microbe Interact* 21(3): 335-345.
- Guo, H., Kan, Y. & Liu, W. (2011). Differential expression of miRNAs in response to topping in flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum*) roots. *PLoS One* 6(12): e28565.
- Gy, I., Gascioli, V., Lauressergues, D., Morel, J. B., Gombert, J., Proux, F., Proux, C., Vaucheret, H. & Mallory, A. C. (2007). Arabidopsis FIERY1, XRN2, and XRN3 are endogenous RNA silencing suppressors. *Plant Cell* 19(11): 3451-3461.
- Harries, P. A., Palanichelvam, K., Bhat, S. & Nelson, R. S. (2008). Tobacco mosaic virus 126-kDa protein increases the susceptibility of *Nicotiana tabacum* to other viruses and its dosage affects virus-induced gene silencing. *Mol Plant Microbe Interact* 21(12): 1539-1548.
- Havelda, Z. & Maule, A. J. (2000). Complex spatial responses to cucumber mosaic virus infection in susceptible *Cucurbita pepo* cotyledons. *Plant Cell* 12(10): 1975-1986.
- Havelda, Z., Varallyay, E., Valoczi, A. & Burgyan, J. (2008). Plant virus infection-induced persistent host gene downregulation in systemically infected leaves. *Plant J* 55(2): 278-288.
- Heinlein, M., Epel, B. L., Padgett, H. S. & Beachy, R. N. (1995). Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton. *Science* 270(5244): 1983-1985.
- Heinlein, M., Padgett, H. S., Gens, J. S., Pickard, B. G., Casper, S. J., Epel, B. L. & Beachy, R. N. (1998). Changing patterns of localization of the tobacco mosaic virus movement protein and replicase to the endoplasmic reticulum and microtubules during infection. *Plant Cell* 10(7): 1107-1120.
- Hemenway, C., Fang, R. X., Kaniewski, W. K., Chua, N. H. & Tumer, N. E. (1988). Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. *EMBO J* 7(5): 1273-1280.
- Herr, A. J. & Baulcombe, D. C. (2004). RNA silencing pathways in plants. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 69: 363-370.
- Hilf, M. E. & Dawson, W. O. (1993). The tobamovirus capsid protein functions as a host-specific determinant of long-distance movement. *Virology* 193(1): 106-114.
- Hillung, J., Cuevas, J. M. & Elena, S. F. (2012). Transcript Profiling of Different *Arabidopsis thaliana* Ecotypes in Response to Tobacco etch potyvirus Infection. *Front Microbiol* 3: 229.
- Hooker, T. S., Lam, P., Zheng, H. & Kunst, L. (2007). A core subunit of the RNA-processing/degrading exosome specifically influences cuticular wax biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19(3): 904-913.
- Hou, S., Yang, Y. & Zhou, J. M. (2009). The multilevel and dynamic interplay between plant and pathogen. *Plant Signal Behav* 4(4): 283-293.
- Huang, Z., Yeakley, J. M., Garcia, E. W., Holdridge, J. D., Fan, J. B. & Whitham, S. A. (2005). Salicylic acid-dependent expression of host genes in compatible *Arabidopsis*-virus interactions. *Plant Physiol* 137(3): 1147-1159.

- Huntzinger, E. & Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* 12(2): 99-110.
- Irizarry, R. A., Bolstad, B. M., Collin, F., Cope, L. M., Hobbs, B. & Speed, T. P. (2003). Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 31(4): e15.
- Isogai, M., Uyeda, I. & Lee, B. C. (1998). Detection and assignment of proteins encoded by rice black streaked dwarf fijivirus S7, S8, S9 and S10. *J Gen Virol* 79 (Pt 6): 1487-1494.
- Iwasaki, S., Takeda, A., Motose, H. & Watanabe, Y. (2007). Characterization of Arabidopsis decapping proteins AtDCP1 and AtDCP2, which are essential for post-embryonic development. *FEBS Lett* 581(13): 2455-2459.
- Jaag, H. M. & Nagy, P. D. (2009). Silencing of *Nicotiana benthamiana* Xrn4p exoribonuclease promotes tombusvirus RNA accumulation and recombination. *Virology* 386(2): 344-352.
- Jagadeeswaran, G., Saini, A. & Sunkar, R. (2009). Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in Arabidopsis. *Planta* 229(4): 1009-1014.
- Jain, M., Tyagi, A. K. & Khurana, J. P. (2008). Differential gene expression of rice two-component signaling elements during reproductive development and regulation by abiotic stress. *Funct Integr Genomics* 8(2): 175-180.
- Jensen, T. H. (2010). RNA exosome. Preface. *Adv Exp Med Biol* 702: v-vi.
- Jockusch, H., Wiegand, C., Mersch, B. & Rajes, D. (2001). Mutants of tobacco mosaic virus with temperature-sensitive coat proteins induce heat shock response in tobacco leaves. *Mol Plant Microbe Interact* 14(7): 914-917.
- Jones, J. D. & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444(7117): 323-329.
- Joshua-Tor, L. (2006). The Argonauts. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71: 67-72.
- Jovel, J., Walker, M. & Sanfacion, H. (2011). Salicylic acid-dependent restriction of Tomato ringspot virus spread in tobacco is accompanied by a hypersensitive response, local RNA silencing, and moderate systemic resistance. *Mol Plant Microbe Interact* 24(6): 706-718.
- Jung, J. H. & Park, C. M. (2007). MIR166/165 genes exhibit dynamic expression patterns in regulating shoot apical meristem and floral development in Arabidopsis. *Planta* 225(6): 1327-1338.
- Kim, J. J., Lee, J. H., Kim, W., Jung, H. S., Huijser, P. & Ahn, J. H. (2012). The microRNA156-SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE3 module regulates ambient temperature-responsive flowering via FLOWERING LOCUS T in Arabidopsis. *Plant Physiol* 159(1): 461-478.
- Kobayashi, K., Cabral, S., Calamante, G., Maldonado, S. & Mentaberry, A. (2001). Transgenic tobacco plants expressing the potato virus X open reading frame 3 gene develop specific resistance and necrotic ring symptoms after infection with the homologous virus. *Mol Plant Microbe Interact* 14(11): 1274-1285.
- Koornneef, A., Leon-Reyes, A., Ritsema, T., Verhage, A., Den Otter, F. C., Van Loon, L. C. & Pieterse, C. M. (2008). Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiol* 147(3): 1358-1368.
- Krecic-Stres et al, H. V., C.; Ravnkar, M. and Kovac, M. (2005). Systemic Potato virus Y NTN infection and levels of salicylic and gentisic acids in different potato genotypes. *Plant Pathology* 54(441-447).
- Lenardon et al, S. L., March, G.J., Nome, S.F. & Ornaghi, J.A. (1998). Recent outbreak of "Mal de Río Cuarto virus" on corn in Argentina. *Plant Disease* 82(4): 448.

- Lenardon et al., S. L., Vallone P., Marcellino J., Giolitti F., De Breuil S., Salomón A. (2007). Comportamiento de híbridos comerciales de maíz frente al virus del mal de Río Cuarto en el área endémica 2006/2007. . *Informe de Actualización Técnica Maíz. EEA INTA Marcos Juárez, Argentina.* 5.
- Leon-Reyes, A., Van der Does, D., De Lange, E. S., Delker, C., Wasternack, C., Van Wees, S. C., Ritsema, T. & Pieterse, C. M. (2010). Salicylate-mediated suppression of jasmonate-responsive gene expression in Arabidopsis is targeted downstream of the jasmonate biosynthesis pathway. *Planta* 232(6): 1423-1432.
- Li, A. L., Wang, M. L., Zhou, R. H., Kong, X. Y., Huo, N. X., Wang, W. S. & Jia, J. Z. (2005). Comparative analysis of early H₂O₂ accumulation in compatible and incompatible wheat–powdery mildew interactions. *Plant Pathology* 54: 308-316.
- Li et al, A. L. W., M. L.; Zhou, R. H.; Kong, X. Y.; Huo, N. X.; Wang, W. S. and Jia, J. Z. (2005). Comparative analysis of early H₂O₂ accumulation in compatible and incompatible wheat–powdery mildew interactions. *Plant Pathology* 54: 308-316.
- Li, F. & Ding, S. W. (2006). Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu Rev Microbiol* 60: 503-531.
- Liao, Y. W., Shi, K., Fu, L. J., Zhang, S., Li, X., Dong, D. K., Jiang, Y. P., Zhou, Y. H., Xia, X. J., Liang, W. S. & Yu, J. Q. (2012). The reduction of reactive oxygen species formation by mitochondrial alternative respiration in tomato basal defense against TMV infection. *Planta* 235(2): 225-238.
- Lilly, S. T., Drummond, R. S., Pearson, M. N. & MacDiarmid, R. M. (2011). Identification and validation of reference genes for normalization of transcripts from virus-infected Arabidopsis thaliana. *Mol Plant Microbe Interact* 24(3): 294-304.
- Linthorst, H. J., Meuwissen, R. L., Kauffmann, S. & Bol, J. F. (1989). Constitutive expression of pathogenesis-related proteins PR-1, GRP, and PR-S in tobacco has no effect on virus infection. *Plant Cell* 1(3): 285-291.
- Liu, W. & Saint, D. A. (2002). Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochem Biophys Res Commun* 294(2): 347-353.
- Liu, Y., Schiff, M. & Dinesh-Kumar, S. P. (2002). Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J* 31(6): 777-786.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4): 402-408.
- Loesch-Fries, L., Merlo, D., Zinnen, t., Burhop, L., Hill, K., Krahn, K., Jarvis, N., Nelson, S. & Halk, E. (1987). Expression of Alfalfa Mosaic Virus RNA 4 in transgenic plants confers virus resistance. *EMBO J* 6: 1845-1851.
- Lorrain, S., Vailleau, F., Balague, C. & Roby, D. (2003). Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends Plant Sci* 8(6): 263-271.
- Love, A. J., Yun, B. W., Laval, V., Loake, G. J. & Milner, J. J. (2005). Cauliflower mosaic virus, a compatible pathogen of Arabidopsis, engages three distinct defense-signaling pathways and activates rapid systemic generation of reactive oxygen species. *Plant Physiol* 139(2): 935-948.
- Lowell, J. E., Rudner, D. Z. & Sachs, A. B. (1992). 3'-UTR-dependent deadenylation by the yeast poly(A) nuclease. *Genes Dev* 6(11): 2088-2099.
- Lu, J., Du, Z. X., Kong, J., Chen, L. N., Qiu, Y. H., Li, G. F., Meng, X. H. & Zhu, S. F. (2012). Transcriptome Analysis of Nicotiana tabacum Infected by Cucumber mosaic virus during Systemic Symptom Development. *PLoS One* 7(8): e43447.

- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K. D. & Carrington, J. C. (2002). Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science* 297(5589): 2053-2056.
- Maier, F., Zwicker, S., Huckelhoven, A., Meissner, M., Funk, J., Pfitzner, A. J. & Pfitzner, U. M. (2011). NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED PROTEINS1 (NPR1) and some NPR1-related proteins are sensitive to salicylic acid. *Mol Plant Pathol* 12(1): 73-91.
- Malamy, J., Carr, J. P., Klessig, D. F. & Raskin, I. (1990). Salicylic Acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250(4983): 1002-1004.
- Malyshenko, S. I., Kondakova, O. A., Nazarova Ju, V., Kaplan, I. B., Taliansky, M. E. & Atabekov, J. G. (1993). Reduction of tobacco mosaic virus accumulation in transgenic plants producing non-functional viral transport proteins. *J Gen Virol* 74 (Pt 6): 1149-1156.
- Mallory, A. C., Dugas, D. V., Bartel, D. P. & Bartel, B. (2004). MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Curr Biol* 14(12): 1035-1046.
- Mallory, A. C. & Vaucheret, H. (2004). MicroRNAs: something important between the genes. *Curr Opin Plant Biol* 7(2): 120-125.
- Mansilla, C., Aguilar, I., Martinez-Herrera, D., Sanchez, F. & Ponz, F. (2006). Physiological effects of constitutive expression of Oilseed Rape Mosaic Tobamovirus (ORMV) movement protein in Arabidopsis thaliana. *Transgenic Res* 15(6): 761-770.
- Mascia, T., Santovito, E., Gallitelli, D. & Cillo, F. (2010). Evaluation of reference genes for quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction normalization in infected tomato plants. *Mol Plant Pathol* 11(6): 805-816.
- Maule, A., Leh, V. & Lederer, C. (2002). The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. *Curr Opin Plant Biol* 5(4): 279-284.
- Maule, A. J., Caranta, C. & Boulton, M. I. (2007). Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. *Mol Plant Pathol* 8(2): 223-231.
- Mayer, M. P. (2005). Recruitment of Hsp70 chaperones: a crucial part of viral survival strategies. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 153: 1-46.
- Mendoza-Soto, A. B., Sanchez, F. & Hernandez, G. (2012). MicroRNAs as regulators in plant metal toxicity response. *Front Plant Sci* 3: 105.
- Milne, R. G. (1990). INTA. *Revista de Investigación Agropecuaria. Bs As* vol. 22: p. 206.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M. & Tollervey, D. (1997). The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell* 91(4): 457-466.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7(9): 405-410.
- Mittler, R., Feng, X. & Cohen, M. (1998). Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Plant Cell* 10(3): 461-473.
- Mittler, R., Herr, E. H., Orvar, B. L., van Camp, W., Willekens, H., Inze, D. & Ellis, B. E. (1999). Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(24): 14165-14170.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V. & Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci* 16(6): 300-309.

- Miyashima, S., Koi, S., Hashimoto, T. & Nakajima, K. (2011). Non-cell-autonomous microRNA165 acts in a dose-dependent manner to regulate multiple differentiation status in the Arabidopsis root. *Development* 138(11): 2303-2313.
- Mlotshwa, S., Pruss, G. J. & Vance, V. (2008). Small RNAs in viral infection and host defense. *Trends Plant Sci* 13(7): 375-382.
- Mlotshwa, S., Yang, Z., Kim, Y. & Chen, X. (2006). Floral patterning defects induced by Arabidopsis APETALA2 and microRNA172 expression in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Mol Biol* 61(4-5): 781-793.
- Motomura, K., Le, Q. T., Kumakura, N., Fukaya, T., Takeda, A. & Watanabe, Y. (2012). The role of decapping proteins in the miRNA accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *RNA Biol* 9(5).
- Muhlrad, D. & Parker, R. (1994). Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature* 370(6490): 578-581.
- Mukherjee, M., Larrimore, K. E., Ahmed, N. J., Bedick, T. S., Barghouthi, N. T., Traw, M. B. & Barth, C. (2010). Ascorbic acid deficiency in arabidopsis induces constitutive priming that is dependent on hydrogen peroxide, salicylic acid, and the NPR1 gene. *Mol Plant Microbe Interact* 23(3): 340-351.
- Mukhtar, M. S., Nishimura, M. T. & Dangl, J. (2009). NPR1 in Plant Defense: It's Not over 'til It's Turned over. *Cell* 137(5): 804-806.
- Mur, L. A., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O. & Wasternack, C. (2006). The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol* 140(1): 249-262.
- Murphy, A. M. & Carr, J. P. (2002). Salicylic acid has cell-specific effects on tobacco mosaic virus replication and cell-to-cell movement. *Plant Physiol* 128(2): 552-563.
- Nawrath, C. & Metraux, J. P. (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* 11(8): 1393-1404.
- Naylor, M., Murphy, A. M., Berry, J. O. & Carr, J. P. (1998). Salicylic Acid Can Induce Resistance to Plant Virus Movement. *MPMI* 11(9): 860-868.
- Nicot, N., Hausman, J. F., Hoffmann, L. & Evers, D. (2005). Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J Exp Bot* 56(421): 2907-2914.
- Nie, X. (2006). Salicylic Acid Suppresses Potato virus Y Isolate N:O-Induced Symptoms in Tobacco Plants. *Phytopathology* 96(3): 255-263.
- Niehl, A. & Heinlein, M. (2011). Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma* 248(1): 75-99.
- Nome et al, S. F., S.L. Lenardón, B.C. Raju, I.G. Laguna, S.K. Lowe & D.M. Docampo (1981). Association of reovirus-like particles with "Enfermedad de Río Cuarto" of maize in Argentina. *Phytopathologie Zhurnal* 101: 7-15.
- Nomura, K., Melotto, M. & He, S. Y. (2005). Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. *Curr Opin Plant Biol* 8(4): 361-368.
- Nurnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B. & Piater, L. (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* 198: 249-266.
- Olmedo, G., Guo, H., Gregory, B. D., Nourizadeh, S. D., Aguilar-Henonin, L., Li, H., An, F., Guzman, P. & Ecker, J. R. (2006). ETHYLENE-INSENSITIVE5 encodes a 5'→3' exoribonuclease required for regulation of the EIN3-targeting F-box proteins EBF1/2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(36): 13286-13293.

- Ovstebo, R., Foss Haug, K. B., Lande, K. & Kierluf, P. (2003). PCR-based calibration curves for studies of quantitative gene expression in human monocytes: development and evaluation. *Clin Chem* 49(3): 425-432.
- Palatnik, J. F., Tognetti, V. B., Poli, H. O., Rodriguez, R. E., Blanco, N., Gattuso, M., Hajirezaei, M. R., Sonnewald, U., Valle, E. M. & Carrillo, N. (2003). Transgenic tobacco plants expressing antisense ferredoxin-NADP(H) reductase transcripts display increased susceptibility to photo-oxidative damage. *Plant J* 35(3): 332-341.
- Palukaitis, P., Carr, J. P. & Schoelz, J. E. (2008). Plant-virus interactions. *Methods Mol Biol* 451: 3-19.
- Pallas, V. & Garcia, J. A. (2011). How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *J Gen Virol* 92(Pt 12): 2691-2705.
- Park, M. R., Park, S. H., Cho, S. Y. & Kim, K. H. (2009). Nicotiana benthamiana protein, NbPCIP1, interacting with Potato virus X coat protein plays a role as susceptible factor for viral infection. *Virology* 386(2): 257-269.
- Pastori, G. M., Kiddle, G., Antoniow, J., Bernard, S., Veljovic-Jovanovic, S., Verrier, P. J., Noctor, G. & Foyer, C. H. (2003). Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *Plant Cell* 15(4): 939-951.
- Pavet, V., Olmos, E., Kiddle, G., Mowla, S., Kumar, S., Antoniow, J., Alvarez, M. E. & Foyer, C. H. (2005). Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in Arabidopsis. *Plant Physiol* 139(3): 1291-1303.
- Peng, J., Yang, J., Yan, F., Lu, Y., Jiang, S., Lin, L., Zheng, H., Chen, H. & Chen, J. (2011). Silencing of NbXrn4 facilitates the systemic infection of Tobacco mosaic virus in Nicotiana benthamiana. *Virus Res* 158(1-2): 268-270.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9): e45.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30(9): e36.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C. & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26(6): 509-515.
- Pieterse, C. M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S. & Van Wees, S. C. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* 5(5): 308-316.
- Pnueli, L., Liang, H., Rozenberg, M. & Mittler, R. (2003). Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (Apx1)-deficient Arabidopsis plants. *Plant J* 34(2): 187-203.
- Postnikova, O. A. & Nemchinov, L. G. (2012). Comparative analysis of microarray data in Arabidopsis transcriptome during compatible interactions with plant viruses. *Virology* 439: 101.
- Powell, P. A., Sanders, P. R., Tumer, N., Fraley, R. T. & Beachy, R. N. (1990). Protection against tobacco mosaic virus infection in transgenic plants requires accumulation of coat protein rather than coat protein RNA sequences. *Virology* 175(1): 124-130.
- Powell, P. A., Stark, D. M., Sanders, P. R. & Beachy, R. N. (1989). Protection against tobacco mosaic virus in transgenic plants that express tobacco mosaic virus antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(18): 6949-6952.

- Qin, L. X., Beyer, R. P., Hudson, F. N., Linford, N. J., Morris, D. E. & Kerr, K. F. (2006). Evaluation of methods for oligonucleotide array data via quantitative real-time PCR. *BMC Bioinformatics* 7: 23.
- Qiu, W., Park, J. W. & Scholthof, H. B. (2002). Tombusvirus P19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact* 15(3): 269-280.
- Qu, F. & Morris, T. J. (2002). Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by Tomato bushy stunt virus is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing. *Mol Plant Microbe Interact* 15(3): 193-202.
- Qu, F. & Morris, T. J. (2005). Suppressors of RNA silencing encoded by plant viruses and their role in viral infections. *FEBS Lett* 579(26): 5958-5964.
- Qu, F., Ye, X., Hou, G., Sato, S., Clemente, T. E. & Morris, T. J. (2005). RDR6 has a broad-spectrum but temperature-dependent antiviral defense role in *Nicotiana benthamiana*. *J Virol* 79(24): 15209-15217.
- Rajeevan, M. S., Vernon, S. D., Taysavang, N. & Unger, E. R. (2001). Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. *J Mol Diagn* 3(1): 26-31.
- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H. & Moorman, A. F. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* 339(1): 62-66.
- Raman, S., Greb, T., Peaucelle, A., Blein, T., Laufs, P. & Theres, K. (2008). Interplay of miR164, CUP-SHAPED COTYLEDON genes and LATERAL SUPPRESSOR controls axillary meristem formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 55(1): 65-76.
- Rasmussen, R., Meuer, S., Wittwer, C. & Nakagawara, K. (2001). Quantification on the LightCycler. In: *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications*. Springer Press, Heidelberg: 21-34.
- Register, J. C., 3rd & Beachy, R. N. (1988). Resistance to TMV in transgenic plants results from interference with an early event in infection. *Virology* 166(2): 524-532.
- Rensink, W. A., Lee, Y., Liu, J., Iobst, S., Ouyang, S. & Buell, C. R. (2005). Comparative analyses of six solanaceous transcriptomes reveal a high degree of sequence conservation and species-specific transcripts. *BMC Genomics* 6: 124.
- Reuber, T. L., Plotnikova, J. M., Dewdney, J., Rogers, E. E., Wood, W. & Ausubel, F. M. (1998). Correlation of defense gene induction defects with powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants. *Plant J* 16(4): 473-485.
- Rhoades, M. W., Reinhart, B. J., Lim, L. P., Burge, C. B., Bartel, B. & Bartel, D. P. (2002). Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110(4): 513-520.
- Riedle-Bauer, M. (2000). Role of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Enzymes in Systemic Virus Infections of Plants. *J. Phytopathology* 148: 297-302.
- Rinne, P. L., van den Boogaard, R., Mensink, M. G., Kopperud, C., Kormelink, R., Goldbach, R. & van der Schoot, C. (2005). Tobacco plants respond to the constitutive expression of the tospovirus movement protein NS(M) with a heat-reversible sealing of plasmodesmata that impairs development. *Plant J* 43(5): 688-707.
- Rodrigo, G., Carrera, J., Ruiz-Ferrer, V., del Toro, F. J., Llave, C., Voinnet, O. & Elena, S. F. (2012). A meta-analysis reveals the commonalities and differences in *Arabidopsis thaliana* response to different viral pathogens. *PLoS One* 7(7): e40526.

- Rubio-Somoza, I. & Weigel, D. (2011). MicroRNA networks and developmental plasticity in plants. *Trends Plant Sci* 16(5): 258-264.
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. & Moorman, A. F. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 37(6): e45.
- Ruiz-Ferrer, V. & Voinnet, O. (2009). Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annu Rev Plant Biol* 60: 485-510.
- Sanford, J. & Johnston, S. (1985). The concept of parasite-derived resistance - Deriving resistance genes from the parasite's own genome. *Journal of Theoretical Biology* 113: 395-405.
- Sarowar, S., Oh, H. W., Cho, H. S., Baek, K. H., Seong, E. S., Joung, Y. H., Choi, G. J., Lee, S. & Choi, D. (2007). Capsicum annum CCR4-associated factor CaCAF1 is necessary for plant development and defence response. *Plant J* 51(5): 792-802.
- Schmidt, G. W. & Delaney, S. K. (2010). Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. *Mol Genet Genomics* 283(3): 233-241.
- Schmittgen, T. D., Lee, E. J., Jiang, J., Sarkar, A., Yang, L., Elton, T. S. & Chen, C. (2008). Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods* 44(1): 31-38.
- Schott, G., Mari-Ordonez, A., Himber, C., Alioua, A., Voinnet, O. & Dunoyer, P. (2012). Differential effects of viral silencing suppressors on siRNA and miRNA loading support the existence of two distinct cellular pools of ARGONAUTE1. *EMBO J* 31(11): 2553-2565.
- Schwab, R., Palatnik, J. F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M. & Weigel, D. (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev Cell* 8(4): 517-527.
- Schwach, F., Vaistij, F. E., Jones, L. & Baulcombe, D. C. (2005). An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiol* 138(4): 1842-1852.
- Schwarz, S., Grande, A. V., Bujdoso, N., Saedler, H. & Huijser, P. (2008). The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* 67(1-2): 183-195.
- Shimizu, T., Satoh, K., Kikuchi, S. & Omura, T. (2007). The repression of cell wall- and plastid-related genes and the induction of defense-related genes in rice plants infected with Rice dwarf virus. *Mol Plant Microbe Interact* 20(3): 247-254.
- Shimura, H. & Pantaleo, V. (2011). Viral induction and suppression of RNA silencing in plants. *Biochim Biophys Acta* 1809(11-12): 601-612.
- Shyu, A. & Chen, C. (2010). Regulation of mRNA turnover. In *Handbook of Cell Signaling*, Vol. 277, 2311-2315.
- Siddiqui, S. A., Sarmiento, C., Truve, E., Lehto, H. & Lehto, K. (2008). Phenotypes and functional effects caused by various viral RNA silencing suppressors in transgenic *Nicotiana benthamiana* and *N. tabacum*. *Mol Plant Microbe Interact* 21(2): 178-187.
- Sieber, P., Wellmer, F., Gheyselinck, J., Riechmann, J. L. & Meyerowitz, E. M. (2007). Redundancy and specialization among plant microRNAs: role of the MIR164 family in developmental robustness. *Development* 134(6): 1051-1060.
- Soitamo, A. J., Jada, B. & Lehto, K. (2011). HC-Pro silencing suppressor significantly alters the gene expression profile in tobacco leaves and flowers. *BMC Plant Biol* 11: 68.

- Soitamo, A. J., Jada, B. & Lehto, K. (2012). Expression of geminiviral AC2 RNA silencing suppressor changes sugar and jasmonate responsive gene expression in transgenic tobacco plants. *BMC Plant Biol*, 12:204.
- Souret, F. F., Kastenmayer, J. P. & Green, P. J. (2004). AtXRN4 degrades mRNA in Arabidopsis and its substrates include selected miRNA targets. *Mol Cell* 15(2): 173-183.
- Spoel, S. H., Johnson, J. S. & Dong, X. (2007). Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(47): 18842-18847.
- Sunkar, R., Kapoor, A. & Zhu, J. K. (2006). Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell* 18(8): 2051-2065.
- Sunkar, R. & Zhu, J. K. (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *Plant Cell* 16(8): 2001-2019.
- Tang, G. (2005). siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends Biochem Sci* 30(2): 106-114.
- Thaler, J. S., Humphrey, P. T. & Whiteman, N. K. (2012). Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends Plant Sci* 17(5): 260-270.
- Thimm, O., Blasing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Kruger, P., Selbig, J., Muller, L. A., Rhee, S. Y. & Stitt, M. (2004). MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J* 37(6): 914-939.
- Thomma, B. P., Nurnberger, T. & Joosten, M. H. (2011). Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell* 23(1): 4-15.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y. & Collinge, D. B. (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal* 11: 1187-1194.
- Thran, M., Link, K. & Sonnwald, U. (2011). The Arabidopsis DCP2 gene is required for proper mRNA turnover and prevents transgene silencing in Arabidopsis. *Plant J*.
- Tichopad, A., Dilger, M., Schwarz, G. & Pfaffl, M. W. (2003). Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res* 31(20): e122.
- Trinks, D., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P. V., Akbergenov, R., Oakeley, E. J., Veluthambi, K., Hohn, T. & Pooggin, M. M. (2005). Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *J Virol* 79(4): 2517-2527.
- Tucker, M., Valencia-Sanchez, M. A., Staples, R. R., Chen, J., Denis, C. L. & Parker, R. (2001). The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 104(3): 377-386.
- Van Breusegem, F. & Dat, J. F. (2006). Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol* 141(2): 384-390.
- van Dun, C. M., Bol, J. F. & Van Vloten-Doting, L. (1987). Expression of alfalfa mosaic virus and tobacco rattle virus coat protein genes in transgenic tobacco plants. *Virology* 159(2): 299-305.
- van Dun, C. M., Overduin, B., van Vloten-Doting, L. & Bol, J. F. (1988). Transgenic tobacco expressing tobacco streak virus or mutated alfalfa mosaic virus coat protein does not cross-protect against alfalfa mosaic virus infection. *Virology* 164(2): 383-389.

- van Loon, L. C., Rep, M. & Pieterse, C. M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 44: 135-162.
- van Regenmortel et al, M. H., Fauquet C. M., Bishop D. H., Carsten E. B., Estes M. K., Lemon S. M., Maniloff J., Mayo M. A., McGeoch D. J., Pringle C. R. & Wickner R. B. (2000). Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.
- Vance, V. & Vaucheret, H. (2001). RNA silencing in plants--defense and counterdefense. *Science* 292(5525): 2277-2280.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3(7): RESEARCH0034.
- Vargason, J. M., Szittyta, G., Burgyan, J. & Hall, T. M. (2003). Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* 115(7): 799-811.
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Crete, P. & Bartel, D. P. (2004). The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev* 18(10): 1187-1197.
- Vlot, A. C., Dempsey, D. A. & Klessig, D. F. (2009). Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* 47: 177-206.
- Vogler, H., Kwon, M. O., Dang, V., Sambade, A., Fasler, M., Ashby, J. & Heinlein, M. (2008). Tobacco mosaic virus movement protein enhances the spread of RNA silencing. *PLoS Pathog* 4(4): e1000038.
- Voinnet, O. (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet* 17(8): 449-459.
- Voinnet, O., Pinto, Y. M. & Baulcombe, D. C. (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(24): 14147-14152.
- Wang, M. B. & Metzloff, M. (2005). RNA silencing and antiviral defense in plants. *Curr Opin Plant Biol* 8(2): 216-222.
- Wassenegger, M. & Krczal, G. (2006). Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends Plant Sci* 11(3): 142-151.
- White et al, A. J., Carr JP, Woods RD (1983). The effects of aspirin and polyacrylic-acid on the multiplication and spread of TMV in different cultivars of tobacco with and without the N-gene. *Phytopathology* z(107): 224-232.
- Whitham, S. A., Quan, S., Chang, H. S., Cooper, B., Estes, B., Zhu, T., Wang, X. & Hou, Y. M. (2003). Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J* 33(2): 271-283.
- Whitham, S. A., Yang, C. & Goodin, M. M. (2006). Global impact: elucidating plant responses to viral infection. *Mol Plant Microbe Interact* 19(11): 1207-1215.
- Wise, R. P., Moscou, M. J., Bogdanove, A. J. & Whitham, S. A. (2007). Transcript profiling in host-pathogen interactions. *Annu Rev Phytopathol* 45: 329-369.
- Wohlgemuth et al, H., Mittelstrass K, Kscheschan S., Bender J., Weigel H.-J., Overmeyer K, Kangasjarvi J., Sandermann H. & Langebartels G. (2002). Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant, Cell and Environment* 25: 717-726.
- Wolf, S., Deom, C. M., Beachy, R. N. & Lucas, W. J. (1989). Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science* 246(4928): 377-379.

- Wollmann, H., Mica, E., Todesco, M., Long, J. A. & Weigel, D. (2010). On reconciling the interactions between APETALA2, miR172 and AGAMOUS with the ABC model of flower development. *Development* 137(21): 3633-3642.
- Wu, G. & Poethig, R. S. (2006). Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. *Development* 133(18): 3539-3547.
- Wu, Q., Wang, X. & Ding, S. W. (2010). Viral suppressors of RNA-based viral immunity: host targets. *Cell Host Microbe* 8(1): 12-15.
- Wu, Y., Zhang, D., Chu, J. Y., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I. D., De Luca, V. & Despres, C. (2012). The *Arabidopsis* NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell Rep* 1(6): 639-647.
- Xie, Z., Fan, B., Chen, C. & Chen, Z. (2001). An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(11): 6516-6521.
- Xie, Z. & Qi, X. (2008). Diverse small RNA-directed silencing pathways in plants. *Biochim Biophys Acta* 1779(11): 720-724.
- Xu, J. & Chua 2011, N. H. Processing bodies and plant development. *Curr Opin Plant Biol* 14(1): 88-93.
- Yamasaki, H., Abdel-Ghany, S. E., Cohu, C. M., Kobayashi, Y., Shikanai, T. & Pilon, M. (2007). Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 282(22): 16369-16378.
- Yamasaki, H., Pilon, M. & Shikanai, T. (2008). How do plants respond to copper deficiency? *Plant Signal Behav* 3(4): 231-232.
- Yang, L., Conway, S. R. & Poethig, R. S. (2011). Vegetative phase change is mediated by a leaf-derived signal that represses the transcription of miR156. *Development* 138(2): 245-249.
- Ye, K., Malinina, L. & Patel, D. J. (2003). Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature* 426(6968): 874-878.
- Yi, S. Y., Yu, S. H. & Choi, D. (1999). Molecular cloning of a catalase cDNA from *Nicotiana glutinosa* L. and its repression by tobacco mosaic virus infection. *Mol Cells* 9(3): 320-325.
- Yi, S. Y., Yu, S. H. & Choi, D. (2003). Involvement of hydrogen peroxide in repression of catalase in TMV-infected resistant tobacco. *Mol Cells* 15(3): 364-369.
- Ying, X. B., Dong, L., Zhu, H., Duan, C. G., Du, Q. S., Lv, D. Q., Fang, Y. Y., Garcia, J. A., Fang, R. X. & Guo, H. S. (2010). RNA-dependent RNA polymerase 1 from *Nicotiana tabacum* suppresses RNA silencing and enhances viral infection in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 22(4): 1358-1372.
- Zhang, J. & Zhou, J. M. Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. *Mol Plant* 3(5): 783-793.
- Zhang, J. & Zhou, J. M. (2010). Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. *Mol Plant* 3(5): 783-793.
- Zhang, X., Yuan, Y. R., Pei, Y., Lin, S. S., Tuschl, T., Patel, D. J. & Chua, N. H. (2006). Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev* 20(23): 3255-3268.
- Zhao, L., Kim, Y., Dinh, T. T. & Chen, X. (2007). miR172 regulates stem cell fate and defines the inner boundary of APETALA3 and PISTILLATA expression domain in *Arabidopsis* floral meristems. *Plant J* 51(5): 840-849.
- Zhu, C., Ding, Y. & Liu, H. (2011). MiR398 and plant stress responses. *Physiol Plant* 143(1): 1-9.

- Zhu, Q. H. & Helliwell, C. A. (2011). Regulation of flowering time and floral patterning by miR172. *J Exp Bot* 62(2): 487-495.
- Zijlstra, C., Scharer-Hernandez, N., Gal, S. & Hohn, T. (1996). Arabidopsis thaliana expressing the cauliflower mosaic virus ORF VI transgene has a late flowering phenotype. *Virus Genes* 13(1): 5-17.
- Zipfel, C. (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol* 12(4): 414-420.
- Zurbriggen, M. D., Carrillo, N. & Hajirezaei, M. R. (2010). ROS signaling in the hypersensitive response: when, where and what for? *Plant Signal Behav* 5(4): 393-396.
- Zvereva, A. C. & Pooggin, M. M. (2012) Silencing and Innate Immunity in Plant Defense Against Viral and Non-Viral Pathogens. *Viruses* 4, 2578-2597.