

Tesis Doctoral

# Estudio de los cambios transcriptómicos producidos por infecciones virales en plantas, rol de fitohormonas y su vinculación con la progresión de síntomas

Manacorda, Carlos Augusto

2013

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Manacorda, Carlos Augusto. (2013). Estudio de los cambios transcriptómicos producidos por infecciones virales en plantas, rol de fitohormonas y su vinculación con la progresión de síntomas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Manacorda, Carlos Augusto. "Estudio de los cambios transcriptómicos producidos por infecciones virales en plantas, rol de fitohormonas y su vinculación con la progresión de síntomas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Estudio de los cambios transcriptómicos  
producidos por infecciones virales en plantas, rol  
de fitohormonas y su vinculación con la progresión  
de síntomas.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Carlos Augusto Manacorda**

Director de tesis: Dr. Sebastián Asurmendi

Consejero de Estudios: Dr. H. E. Hopp

Lugar de trabajo: Instituto de Biotecnología, INTA Castelar

Buenos Aires, 2013

## TÍTULO

**Estudio de los cambios transcriptómicos producidos por infecciones virales en plantas, rol de fitohormonas y su vinculación con la progresión de síntomas.**

## RESUMEN

Las pérdidas en cultivos ocasionadas por virus dependen mayormente de la severidad de los síntomas producidos. La comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a la producción de síntomas es de importancia para el desarrollo de estrategias que permitan reducir las pérdidas ocasionadas por fitovirus. Mediante el uso de cepas de virus de los géneros Tobamovirus y Potyvirus, el presente trabajo analizó la relación entre la severidad de sus síntomas en *Nicotiana tabacum* y *Arabidopsis thaliana* con su capacidad para alterar diferencialmente parámetros morfológicos, fisiológicos y transcriptómicos relevantes para los procesos de desarrollo y respuestas a estrés, hormonas y defensa. Los resultados indicaron que a tiempos tempranos de la infección en tejidos sistémicos, cuando aún no son visibles los síntomas característicos de la infección, se producen cambios moleculares importantes. Éstos incluyen alteraciones en la acumulación de metabolitos vinculados con procesos de señalización y defensa, así como cambios transcriptómicos en genes clave en redes de senescencia, defensa y respuesta a hormonas. La respuesta de microRNAs con importantes roles en el desarrollo ante tratamientos con hormonas y virus exhibió un componente transcripcional y muchos de estos genes reguladores evidenciaron un patrón bifásico de cambios, sugiriendo que los procesos que conducen a su alteración en etapas tempranas de la infección difieren de los que condicionan la misma a etapas avanzadas. En *Arabidopsis*, gran parte de las diferencias en alteraciones fisiológicas y de síntomas inducidas por distintas cepas de un Potyvirus se perdieron en plantas mutantes para la vía del ácido salicílico. A la luz de estos hallazgos, se propone un mecanismo por el cual la retroalimentación entre ácido salicílico y especies reactivas de oxígeno determina la activación de genes clave en los procesos de desarrollo y senescencia.

**Palabras clave:** Turnip mosaic virus (TuMV), Tobacco mosaic virus (TMV), *Arabidopsis*, *Nicotiana tabacum*, síntomas, microRNAs, transcriptómica, metabolómica, ROS, senescencia, ácido salicílico.

## TITLE

**Study of transcriptomic changes caused by viral infections in plants, the role of plant hormones and their relationship with the progression of symptoms.**

## ABSTRACT

Losses on crops caused by virus mostly depend on symptoms severity. The understanding of the molecular mechanisms underlying the production of symptoms is important for the development of strategies that will reduce the losses caused by plant virus. By using viral strains of virus of the genus Tobamovirus and Potyvirus, this study analyzed the relationship between the severity of their symptoms in *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* with their ability to differentially alter physiological, morphological and transcriptomic parameters relevant to the processes of development and responses to stress, hormones, and defense. The results indicated that at early times of infection in systemic tissues, when the characteristic symptoms of the infection are still not visible, important molecular changes occur. These include alterations in the accumulation of metabolites linked to processes of signaling and defense, as well as transcriptomic changes in key genes in senescence, defense and response to hormones networks. The response of microRNAs with important roles in development following treatment with hormones and viruses exhibited a transcriptional component and many of these regulatory genes showed a biphasic pattern of changes, suggesting that the processes that lead to their alteration at early stages of infection differ from which condition it to advanced stages. In *Arabidopsis*, much of the differences in physiological changes and symptoms induced by different strains of a Potyvirus were lost in mutant plants for salicylic acid pathway. In the light of these findings, a mechanism is proposed by which the feedback between salicylic acid and reactive oxygen species determines the activation of key genes in the processes of development and senescence.

**Keywords:** Turnip mosaic virus (TuMV), Tobacco mosaic virus (TMV), *Arabidopsis*, *Nicotiana tabacum*, symptoms, microRNAs, transcriptomics, metabolomics, ROS, senescence, salicylic acid.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Consejero de estudios, Dr. H. E. Hopp, y a mi Director de Tesis, Dr. S. Asurmendi, por la amplia libertad y confianza que depositaron en mí. A la Dra. M. del Vas, por su cuidadosa lectura crítica de la Tesis.

A todos los compañeros de INTA, becarios y personal técnico que, con su buena disposición, me aportaron valiosas ideas y críticas constructivas que sin duda enriquecieron mi trabajo en gran medida.

## DEDICATORIAS

Esta Tesis está dedicada a aquellas personas que influyeron positivamente en mi concepción y entendimiento de la práctica científica, pero también de otros aspectos de la vida que la incluyen. En particular:

A los Dres. Mario Bunge y Carl Sagan, por su enfoque esencialmente humanista de la ciencia y por enseñarme que la honestidad intelectual es un bien en sí mismo, sin el cual se corre el peligro de mentirse a sí mismo y por ende, a los demás.

A nuestra Presidenta Dra. Cristina Fernández de Kirchner, por permitirnos vivir el momento de mejoría social continua en paz y democracia más extenso de nuestra historia. Y por promover la educación y la ciencia de una manera que desde la época de Sarmiento no se conocía. Y por muchas cosas más.

A mi familia, por muchísimas cosas, pero principalmente por enseñarme a enfrentar las dificultades sin perder el buen humor ni la decencia y sin desanimarse. Por enseñarme lo fundamental del pensamiento crítico y la importancia de intentar hacer bien las cosas. Por heredarme lo importante: educación, amor y valores.

A Cinthia, por estar en los buenos momentos y en los otros, por ser como es y por elegirme.

## Publicaciones derivadas de esta Tesis

### Publicaciones en revistas científicas:

*Virus infection alters transcriptional activity of miR164a promoter in plants.*

A.A Bazzini, **CA Manacorda\***, NI Almasia\*, VC Mongelli, AJ Distéfano, GA Maroniche, MC Rodriguez, G Conti, HE Hopp, M del Vas and S Asurmendi. *BMC Plant Biology* 2009, 9:152 doi:10.1186/1471-2229-9-152.\* **Ambos autores contribuyeron igualmente al trabajo.**

*Metabolic and miRNA Profiling of TMV Infected Plants Reveals Biphasic Temporal Changes.* Bazzini AA, **Manacorda CA**, Tohge T, Conti G, Rodriguez MC, Nunes-Nesi A, Villanueva S, Fernie AR, Carrari F, Asurmendi S. (2011) *PLoS ONE* 6(12): e28466. doi:10.1371/journal.pone.0028466

*Salicylic acid determines differential senescence produced by two Turnip mosaic virus strains involving reactive oxygen species and early transcriptomic changes.* **Carlos Augusto Manacorda**, Carmen Mansilla, Humberto Julio Debat, Diego Zavallo, Flora Sánchez, Fernando Ponz and Sebastián Asurmendi. *Molecular plant-microbe interactions*. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-07-13-0190-R>

### Otras Publicaciones relacionadas, realizadas durante el periodo de mi beca:

*Transgenic expression of Tobacco mosaic virus capsid and movement proteins modulate plant basal defense and biotic stress responses in Nicotiana tabacum.* Conti, G., Rodriguez, M.C., **Manacorda, C.A.** and Asurmendi, S. (2012). *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI, 25, 1370-1384

### Participación en Congresos

#### Como coautor:

- *A virus induced gene silencing (VIGS) system designed for Solanaceae plant species using GFP as screening marker of silenced tissue.* M.C. Rodríguez, Bazzini A.A., **C.A. Manacorda**, H.E. Hopp, F. Carrari y S. Asurmendi. REDBIO, 22 al 26 de octubre de 2007, Viña del Mar, Chile.

- *Spatial and temporal characterization of the transcriptional activity of mir164a promoter in plants.* Bazzini AA, Almasia NI, **Manacorda CA**, Mongelli VC, Distéfano AJ, Maroniche GA, Rodriguez C, Hopp HE, del Vas M y Asurmendi S. SAIB, Mar del Plata, Argentina, 17-20 de Noviembre de 2007.

- *Plant Virus infections, disease symptoms and microRNAs*. Bazzini AA, **Manacorda CA**, Rodriguez C, Hopp HE, Beachy R.N and Asurmendi S. Advance Summer School on The Molecular and Cellular Basis of Infection, Ciudad del Cabo, Sudáfrica, Marzo de 2008.

- Tobamovirus alter miRNAs in two temporal phases, the novel one, is systemic and independent of virus presence correlating with virus severity. Autor/es: A.A. Bazzini, **C.A Manacorda**, G. Conti, M.C. Rodriguez, S. Villanueva and S. Asurmendi. II Meeting of the Spanish Network of Plant Virology. Cadiz, España. Marzo del 2010

-*Analysis of sRNAs profiles at early stage of two contrasting Tobamovirus infections*. Zavallo, D. , Rodríguez, M. C., **Manacorda, C. A.**, Asurmendi, S. , S. XLVII Reunión Anual SAIB, Potrero de los Funes, San Luis, República Argentina, 30 de Octubre al 2 de Noviembre de 2011.

*Como primer autor:*

- *Rol de los miRNAs en la replicación viral y desarrollo de síntomas en Arabidopsis thaliana*.

**Carlos A. Manacorda**, Ariel A. Bazzini y Sebastián Asurmendi. XXVII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Rosario, República Argentina, 21-24 de Septiembre de 2008.

- *A strategy to reduce miRNAs activity in plants based on artificial miRNAs*. **Manacorda, Carlos**; Bazzini, Ariel; Conti, Gabriela; Asurmendi, Sebastián. XLV Reunión Anual SAIB, Tucumán, República Argentina, 10 al 13 de Noviembre de 2009.

- *TuMV strains producing different symptoms change differentially miRNA and miRNA-target expression*. **Manacorda, C.A.**, Rodríguez, M.C., Asurmendi, S. XLVII Reunión Anual SAIB, Potrero de los Funes, San Luis, República Argentina, 30 de Octubre al 2 de Noviembre de 2011.

- *Dos cepas de TuMV producen en Arabidopsis cambios diferenciales de acumulación de mRNAs y miRNAs con correlato fenotípico de alteración diferencial de la senescencia y acumulación de ROS temprana*. **Manacorda, C.A.**, Mansilla, MC., Zavallo, D., Sánchez Sánchez, F., Ponz, F., Asurmendi, S. XXIX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Mar del Plata, República Argentina, 17-20 de Septiembre de 2012.

# ÍNDICE

<b>TÍTULO.....</b>	<b>I</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>II</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>III</b>
<b>DEDICATORIAS.....</b>	<b>IV</b>
<b>PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS .....</b>	<b>V</b>
<b>ÍNDICE .....</b>	<b>VII</b>
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1 – Las pérdidas ocasionadas por fitovirus en su contexto socioeconómico.....</b>	<b>1</b>
<b>2 – Biología de los virus de plantas .....</b>	<b>4</b>
2.1 – Definición de virus .....	4
2.2 – Clasificación de los virus .....	4
2.2.1 – <i>El problema de la diferenciación especie-cepa</i> .....	5
2.3 – Características generales de los virus de plantas .....	7
2.3.1 – <i>Morfología</i> .....	7
2.3.2 – <i>Tipo y organización del genoma</i> .....	8
2.3.3 – <i>Ciclo vital de los virus de plantas</i> .....	9
2.3.4 – <i>Sentido del movimiento sistémico viral dentro de la planta</i> .....	10
<b>3 – Características de los virus utilizados en esta Tesis .....</b>	<b>11</b>
3.1 – El género Tobamovirus .....	11
3.2 – El género Potyvirus .....	14
<b>4 – Interacciones virus-planta .....</b>	<b>17</b>
4.1 – Inmunidad innata .....	17
4.1.1 – <i>Resistencia genéticamente predeterminada pasiva e inducida</i> .....	18
4.1.2 – <i>Genes R y el paradigma del ETI en infecciones virales</i> .....	19
4.2 – Rol de compuestos químicos de bajo peso molecular en la defensa contra virus .....	20
4.2.1 – <i>Ácido salicílico (SA)</i> .....	21
4.2.2 – <i>Ácido jasmónico (JA)</i> .....	22
4.2.3 – <i>Etileno (ET)</i> .....	22
4.2.4 – <i>La elusiva señal de SAR</i> .....	23
4.2.5 – <i>Especies reactivas de oxígeno (ROS)</i> .....	24
4.3 – Silenciamiento de RNA .....	25
4.3.1 – <i>Mecanismos de activación del silenciamiento de RNA viral</i> .....	26
4.3.2 – <i>Biogénesis y modo de acción de los vsiRNAs</i> .....	27
4.3.3 – <i>Supresores virales del silenciamiento</i> .....	29
4.3.4 – <i>Inmunidad innata, silenciamiento de RNA y supresores del silenciamiento</i> .....	30

<b>5 – Los microRNAs y sus múltiples funciones en plantas .....</b>	<b>31</b>
5.1 –Características generales .....	31
5.2 –Evolución de genes miRs .....	32
5.3 –Biogénesis de miRs .....	34
5.3.1 – <i>Transcripción y procesamiento de pri- y pre-miRs</i> .....	34
5.3.2 – <i>Modificaciones finales y maduración de miRs</i> .....	35
5.4 –Regulación de síntesis de miRs maduros .....	35
5.4.1 – <i>Regulación transcripcional de miRs</i> .....	36
5.4.2 – <i>Regulación post-transcripcional de miRs</i> .....	37
5.5 –Modo de acción de miRs en plantas .....	39
5.5.1 – <i>Requisitos de complementariedad miR/mRNA</i> .....	39
5.5.2 – <i>Mecanismos de regulación de mRNAs mediados por miRs</i> .....	40
5.5.3 – <i>Discusión: Conexiones entre complementariedad mRNA/miR y mecanismo de represión</i> .....	42
5.6 – Rol de los miRs en el desarrollo .....	43
5.6.1 – <i>Transición de fase</i> .....	43
5.6.2 – <i>Senescencia</i> .....	44
5.6.3 – <i>Morfología foliar</i> .....	44
5.6.4 – <i>Otros procesos de desarrollo influenciados por miRs</i> .....	48
5.7 – Rol de los miRs en respuestas a estreses abióticos y bióticos .....	48
5.7.1 – <i>Sequía y salinidad</i> .....	49
5.7.2 – <i>Nutrientes</i> .....	49
5.7.3 – <i>Especies reactivas de oxígeno</i> .....	51
5.7.4 – <i>Hormonas</i> .....	51
5.7.5 – <i>Estrés biótico</i> .....	51
5.7.6 – <i>Conclusión: estreses, miRs y su impacto en el fenotipo</i> .....	52
5.8 – MiRs y VSRs .....	52
<b>6 – Senescencia .....</b>	<b>53</b>
6.1 – Pigmentos fotosintéticos y senescencia .....	54
6.2 – Antocianinas y senescencia .....	54
6.3 – SAGs y senescencia .....	56
6.4 – Hormonas y senescencia .....	56
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>58</b>
<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>58</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>58</b>
<b>CAPÍTULO 2: LAS INFECCIONES VIRALES ELEVAN LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR DEL MIR164A EN ARABIDOPSIS. ....</b>	<b>60</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>61</b>
2.1 – Análisis bioinformáticos y clonado de la probable región promotora extensa del miR164a .....	61
2.2 – El PmiR164a se expresa principalmente en el tejido vascular, y su expresión está regulada durante el desarrollo .....	63
2.3 – El PmiR164a es activado por infecciones virales .....	66
2.4 – Las infecciones virales afectan el nivel de acumulación del miR164 maduro y sus genes blanco .....	69
2.5 – El ácido giberélico induce la actividad del PmiR164a .....	71
<b>Discusión .....</b>	<b>73</b>
<b>Conclusión .....</b>	<b>78</b>

<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>79</b>
Construcciones génicas y obtención de plantas transgénicas.....	79
Material vegetal y ensayos de infecciones virales.....	79
Cuantificación de proteínas.....	80
Detección por DAS-ELISA de CP virales .....	80
Ensayos histoquímicos y fluorimétricos de actividad $\beta$ -Glucuronidasa (GUS) .....	80
Tratamientos con hormonas .....	81
Cuantificación de miR maduro por Northern blot.....	81
Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).....	82
Análisis estadísticos.....	82
Cebadores para PCR y qPCR .....	83

### **CAPÍTULO 3: LA ACUMULACIÓN DE MIRS MADUROS EN TEJIDOS SISTÉMICOS DE *N. TABACUM* INFECTADAS CON TMV SIGUE UN PERFIL TEMPORAL BIFÁSICO. .... 84**

<b>Resultados .....</b>	<b>85</b>
3.1 – Diseño experimental y caracterización de la progresión de la infección con TMV .....	85
3.2 – TMV produce una alteración bifásica en la acumulación de metabolitos primarios en la hoja sistémica .....	88
3.3 – La acumulación de CP de TMV correlaciona con el agotamiento de los aminoácidos que la constituyen en la hoja sistémica .....	93
3.4 – TMV provoca una alteración temporal bifásica en la acumulación de miRNAs maduros en hojas sistémicas de tabaco .....	95
3.5 – Acumulación de miRs y sus genes blancos en etapas tempranas de infección por dos tobamovirus que difieren en los síntomas provocados en tabaco.....	99
3.5.1 – Comparación de los síntomas inducidos en tabaco por dos tobamovirus de diferente agresividad y acumulación viral temprana de TMV .....	99
3.5.2 – Validación en <i>N. tabacum</i> de genes blanco de miRs .....	101
3.5.3 – Cuantificación de miRs y sus mRNAs blanco a etapas tempranas de la infección con ShMV y TMV .....	102
3.6 – TMV y ShMV provocan la subacumulación del pre-miR166a en tabaco .....	104
3.7 –TMV aumenta la densidad de redes de correlación de acumulación de metabolitos y miRNAs indicando compleja reprogramación de vías regulatorias .....	106
<b>Discusión .....</b>	<b>110</b>
La relevancia de un enfoque global en el estudio de interacciones planta-virus.....	110
El cambio metabolómico bifásico refleja en cada etapa el impacto sistémico de la infección por TMV .....	110
Múltiples estímulos pre-transcripcionales y efectos post-transcripcionales virales determinan una bifase en acumulación de miRs maduros .....	112
Los análisis de correlación permiten identificar metabolitos y miRs potencialmente claves en la respuesta ante la infección viral.....	113
<b>Conclusión .....</b>	<b>114</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>116</b>
Material vegetal e infecciones virales .....	116
Cuantificación de proteínas.....	116
Detección por DAS-ELISA de CP virales .....	116
Técnicas clásicas de biología molecular .....	116
Análisis metabolómicos.....	117
Detección de la CP de TMV por RT-PCR.....	117
Extracción de RNA para experimentos de qPCR.....	118
Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).....	118
Extracción de sRNAs para microarreglos de miRNAs .....	118

Validación de genes blanco de miRs en <i>N. tabacum</i> .....	119
Análisis estadísticos .....	120
Cebadores para PCR y qPCR .....	120

## **CAPÍTULO 4: EL ÁCIDO SALICÍLICO DETERMINA LA SENESCENCIA DIFERENCIAL PRODUCIDA POR DOS CEPAS DE TUMV, INVOLUCRANDO LA ACUMULACIÓN DE ROS Y CAMBIOS TRANSCRIPTÓMICOS TEMPRANOS. .... 121**

### **Resultados ..... 123**

4.1 – Las cepas JPN1 y UK1 de TuMV inducen síntomas claramente diferenciables en Arabidopsis... 123	
4.2 – El proceso de senescencia está retrasado en plantas infectadas con JPN1, en comparación con UK1 .....	125
4.3 – TuMV-GFP permite analizar la dispersión espaciotemporal del virus e identificar la hoja sistémica más afectada por la infección .....	127
4.4 – JPN1 y UK1 se acumulan sistémicamente a niveles similares en Arabidopsis.....	129
4.5 – UK1, pero no JPN1, induce la acumulación de ROS en tejidos sistémicos infectados .....	130
4.6 – JPN1 y UK1 regulan diferencialmente genes clave en procesos de senescencia, estrés oxidativo y respuestas hormonales .....	133
4.7 – Estudio del efecto del SA y JA en las redes de senescencia reguladas por ORE1 y ORS1 .....	138
4.8 – Las diferencias en progresión de la senescencia y acumulación de ROS entre cepas se pierden en mutantes NahG de Arabidopsis.....	141

### **Discusión ..... 145**

UK1 desencadena la senescencia antes y determina síntomas más severos que JPN1, a pesar de que ambas cepas acumulan similares niveles de RNA viral. ....	145
La acumulación diferencial de pigmentos fotosintéticos y flavonoides indica diferentes velocidades de senescencia, acumulación de ROS y/o competición por recursos en las plantas infectadas por UK1 y JPN1 .....	146
La sobreacumulación de ROS disparada por UK1 depende del SA y determina la gravedad de fenotipos de detención del crecimiento.....	148
JPN1 y UK1 regulan de manera diferente los sistemas enzimáticos celulares de generación y barrido de ROS .....	149
El perfil de expresión de genes clave en la regulación de nutrientes puede indicar competición por recursos a etapas tardías de la infección.....	151
Los análisis transcriptómicos revelan una sobreacumulación temprana de SAGs inducida por UK1 y una convergencia tardía entre ambas cepas de TuMV .....	153
SA y ROS, particularmente el $O_2^{\bullet -}$ generado por peroxidasas de pared, pueden explicar la reducción diferencial de crecimiento entre plantas Col0 y NahG infectadas con UK1 .....	155
La interacción entre SA y $H_2O_2$ es un componente clave de las respuestas de senescencia diferenciales .....	156
Los síntomas desencadenados por las cepas de TuMV estarían determinados por la competición por recursos y por una diferente generación o percepción de la respuesta mediada por SA.....	157
El posible efecto de factores virales sobre hormonas permite postular la existencia de mecanismos subyacentes a las diferencias entre JPN1 y UK1.....	161

### **Conclusión ..... 162**

### **MATERIALES Y MÉTODOS ..... 164**

Material vegetal .....	164
Infecciones virales .....	164
Bombardero génico .....	165
Cuantificación de proteínas.....	165
Detección por DAS-ELISA de CP virales .....	166
Técnicas clásicas de biología molecular .....	166
Medición de pigmentos.....	166

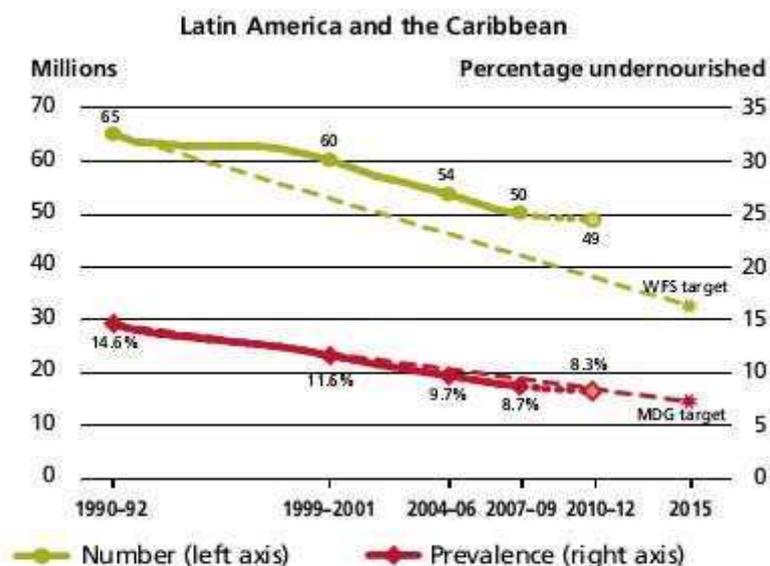
Detección y cuantificación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en hojas mediante la técnica de DAB .....	167
Detección y cuantificación de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> en hojas mediante la técnica de NBT.....	167
Cálculo del área de las hojas .....	168
Tratamientos con hormonas .....	168
Extracción de RNA para experimentos de qPCR.....	168
Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).....	168
Análisis estadísticos.....	168
Cebadores para PCR y qPCR .....	169
<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES INTEGRADORAS.....</b>	<b>170</b>
<b>APÉNDICE A: PUESTA A PUNTO DEL ENSAYO FLUORIMÉTRICO DE ACTIVIDAD B- GLUCURONIDASA (GUS) EN ARABIDOPSIS.....</b>	<b>175</b>
Introducción .....	175
Resultados .....	175
Discusión .....	186
Conclusiones.....	187
Protocolo modificado para ensayo fluorimétrico de actividad <i>β-glucuronidasa</i> (GUS) en Arabidopsis: .....	187
<b>APÉNDICE B. ACUMULACIÓN RELATIVA DE METABOLITOS DE TABACO ANTE INFECCIÓN CON TMV .....</b>	<b>189</b>
Tabla B1. Acumulación relativa de metabolitos primarios y secundarios de tabaco ante infección por TMV.....	189
Tabla B2. Acumulación relativa de metabolitos primarios y secundarios de tabaco durante el desarrollo .....	194
<b>APÉNDICE C. ACUMULACIÓN RELATIVA DE MICRORNAS DE TABACO ANTE INFECCIÓN CON TMV .....</b>	<b>196</b>
Tabla C1. Acumulación relativa de metabolitos primarios y secundarios de tabaco ante infección por TMV.....	196
<b>APÉNDICE D. PROTOCOLO TRIZOL® SCALE-DOWN .....</b>	<b>197</b>
<b>APÉNDICE E. REQUERIMIENTOS MIQE DE ENSAYOS DE QPCR .....</b>	<b>199</b>
Tabla E1. Requerimientos MIQE de las condiciones experimentales usadas en el Capítulo 3 de la Tesis para cuantificación de RNA mediante qPCR. ....	199
A: RT-qPCR de miRNAs maduros. ....	199
B: RT-qPCR de mRNAs y pre-miRs. ....	200
Tabla E2. Requerimientos MIQE de las condiciones experimentales usadas en el Capítulo 4 de la Tesis para cuantificación de RNA mediante qPCR. ....	202

A: RT-qPCR de miRNAs maduros. ....	202
B: RT-qPCR de mRNAs. ....	203
<b>APÉNDICE F. LISTA DE OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS .....</b>	<b>206</b>
Tabla F1. Lista de cebadores utilizados para clonado y transgénesis de construcciones reporteras PmiR164a:GUS y P35S:GUS del Capítulo 2 de esta Tesis.....	206
Tabla F2. Lista de cebadores utilizados para análisis por PCR y qPCR de mRNAs del Capítulo 2 de esta Tesis.....	206
Tabla F3. Lista de oligonucleótidos utilizados en el Capítulo 3 de esta Tesis. ....	207
Tabla F4. Lista de cebadores utilizados para análisis de qPCR de mRNAs del Capítulo 4 de esta Tesis. ....	210
Tabla F5. Lista de cebadores tipo lazo y tallo (" <i>stem-loop</i> ") utilizados para sintetizar cDNA de miRs maduros seleccionados del Capítulo 4 de esta Tesis. ....	212
Tabla F6. Lista de cebadores utilizados para análisis de qPCR de miRNAs maduros del Capítulo 4 de esta Tesis. ....	212
<b>APÉNDICE G. COCIENTES DE EXPRESIÓN Y P-VALORES DE TRANSCRIPTOS SELECTOS DE ARABIDOPSIS ANTE INFECCIÓN CON JPN1 O UK1. ....</b>	<b>213</b>
<b>APÉNDICE H. COCIENTES DE EXPRESIÓN Y P-VALORES DE TRANSCRIPTOS SELECTOS DE ARABIDOPSIS ANTE TRATAMIENTO CON SA O MEJA.....</b>	<b>220</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>222</b>

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

### 1 – Las pérdidas ocasionadas por fitovirus en su contexto socioeconómico

Aproximadamente 870 millones de personas en el mundo no comen lo suficiente para estar saludables. Esto significa que una de cada ocho personas en la Tierra se acuesta cada noche con hambre. El número de personas viviendo con hambre crónica se ha reducido en 130 millones durante los últimos 20 años. La prevalencia de la desnutrición cayó de 23.3 a 14.9 por ciento para los países en vía de desarrollo durante el periodo 1990-2010 (Programa Mundial de Alimentos: <http://es.wfp.org/>). Para América Latina esta reducción fue más marcada durante el decenio 2000-2010 [1] (Figura 1.1). A pesar del relativo éxito de programas focalizados para reducir el hambre implementados por diversos gobiernos del mundo en desarrollo, el número de personas malnutridas sigue siendo inaceptablemente alto. Aunque la producción mundial de alimentos bastaría para dar de comer a todos, su inadecuada distribución y la especulación de precios lo impide [2-4].



**Figura 1.1.** Desnutrición en América Latina y el Caribe. Datos 2010-2012 son estimaciones. Fuente: FAO, *The State of Food Insecurity in the World 2012*.

Además, hacia 2050, la población mundial habrá aumentado en 2000 o 3000 millones de habitantes, lo que probablemente aumentará al menos en un 60% la demanda de alimentos, según diversos estudios. A ese aumento contribuirá el mayor nivel de vida de muchas personas, que consumirán más, sobre todo carne. Cada vez hay más cultivos destinados a la producción de biocombustibles, lo que impone nuevas exigencias a las explotaciones agrícolas, a lo que hay que sumar la degradación de los agroecosistemas impuesta por prácticas agrícolas no sustentables. Llegado a ese punto, no sólo la distribución, sino también la producción de alimentos serían insuficientes para cubrir la demanda mundial. En este complejo contexto para el futuro cercano, las enfermedades provocadas por fitopatógenos se presentan como una

amenaza adicional, al reducir sustancialmente los rindes de cultivos. El problema es especialmente grave en los países en desarrollo, donde los más pobres suelen habitar áreas rurales y depender para su sustentación de la agricultura. Asimismo, en dichos países un elevado porcentaje de los ingresos depende de la exportación de productos primarios, muchas veces de origen agrícola y asociados a monocultivos, lo que aumenta su vulnerabilidad. En este contexto, caídas significativas de la productividad debido a enfermedades de los monocultivos redundan en hambrunas, menores ingresos fiscales, y profundización de la pobreza [5]. Es difícil estimar adecuadamente las pérdidas anuales debido a enfermedades de los cultivos debido tanto a falta de datos actualizados como a la diversa metodología utilizada por diversos autores en países diferentes [6]. Este problema se profundiza al pretender precisar las pérdidas ocasionadas por virus; relegados en los cálculos debido a su mayor dificultad de medición. Más aún, es difícil cuantificar las pérdidas ocasionadas por los virus en ocasiones en que no sólo afectan al rendimiento, sino que pueden tener influencias más sutiles en las plantas que también deriven en pérdida de calidad de la cosecha.

Además hay pérdidas indirectas porque a veces los productores, en vez de sembrar los genotipos mas rendidores siembran genotipos resistentes a una determinada enfermedad pero de menor rendimiento. La Tabla 1.1 resume algunas de las maneras en las que los virus pueden dañar a los cultivos o encarecer los costos.

**Tabla 1.1.** Algunos tipos de daños directos e indirectos relacionados con infecciones virales.

Reducción en crecimiento	Reducción en vigor	Reducción en calidad o valor de mercado	Costo de esfuerzo de mantenimiento de sanidad cultivar
Reducción de rendimiento (incluye infección asintomática). Falla de la cosecha.	Sensibilidad aumentada a congelamiento y sequía.	Defectos en atractivo visual del producto: forma o color.	Prácticas culturales como control de vectores.
	Aumento de la predisposición a posteriores ataques de otros patógenos o pestes.	Reducción en calidad de guardado.	Costo de propágulos libres de virus.
		Reducción en atractivo para el consumidor: sabor, textura.	Programas de cuarentena para importación/exportación.
		Reducida capacidad de propagación.	Programas de erradicación.
			Cruzamientos para obtener resistencia.
			Costos de investigación, educación y extensión.

*Adaptado de:* Hull, R., Matthews' Plant Virology. Fourth ed. 2002, San Diego, CA: Elsevier Academic Press.

Por otro lado, el carácter insidioso de los virus de plantas, su persistencia en cultivos perennes y su transmisión en casos de propagación vegetativa del cultivo, complican más el panorama [7]. Un estimado de las pérdidas de cultivos anuales a escala mundial debido a enfermedades, malezas e insectos equivalen a U\$D 220.000 millones [8]. Las pérdidas atribuibles a virus se calculan en un 10-15% de las totales [6], por lo que en una estimación conservadora, más de U\$D 22.000 se pierden cada año alrededor del mundo debido a virus fitopatógenos. En Argentina, la enfermedad causada por el *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV) en maíz produjo pérdidas por U\$D 120 millones en la campaña 1996/97 y U\$D 70 millones en la campaña 2006/07 [9-10] (ver Figura 1.2) y los híbridos disponibles no ofrecen un nivel de protección adecuado. Por lo tanto, entender la relación hospedante-patógeno y consecuentemente la producción de síntomas es de vital importancia para proponer estrategias antivirales efectivas o perfeccionar las actualmente empleadas. 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. Dentro de las estrategias emergentes para el control de enfermedades en plantas se encuentra la transgénesis, una de cuyas más promisorias aplicaciones es precisamente el desarrollo de cultivares resistentes a virus, algunos ya comercialmente productivos en el mundo [5]. Se ha indicado que el uso de OGMs en la agricultura de países en desarrollo aceleraría la consecución de los ocho Objetivos de Desarrollo del Milenio (MDGs) de la ONU [11]. En este sentido, Argentina tiene un largo historial de adopción de cultivos de OGMs [12] (<http://www.isaaa.org/>; <http://www.argenbio.org>) y no hay problemas mayores de percepción pública acerca de los mismos, contrariamente a lo que ocurre en muchos países desarrollados. En resumen, 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, paso previo indispensable para el posterior desarrollo de herramientas eficaces de control.



**Figura 1.2.** Síntomas del MRCV. Las hileras del centro muestran plantas de maíz con grado severo de enanismo. (Fuente: Informe PROMARC, IFFIVE-INTA).

## 2 – Biología de los virus de plantas

Los virus son probablemente las entidades más abundantes en el planeta, y se ha estimado que el total de partículas virales superan por 10 veces el total del número de células [13-14]. Cualquier organismo vivo puede ser hospedante de estos parásitos obligados, y recientemente se han descrito incluso en el Dominio Archaea. La mejora en las técnicas de detección e identificación de virus y los cambios en los criterios de clasificación y definición (tema de gran debate actual entre virólogos, ver [15]) han dado lugar a un creciente número de virus identificados (Tabla 1.2).

**Tabla 1.2.** Número de taxones virales reconocidos en cada actualización:

Year/Report	Orders	Families	Subfamilies	Genera	Species
<b>2005 (8<sup>th</sup> Report)</b>	3	73	11	289	1898
<b>2008</b>	5	82	11	307	2078
<b>2009 (9<sup>th</sup> Report)</b>	6	87	19	349	2285
<b>2011</b>	6	94	22	395	2480

Fuente: International Committee on Taxonomy of Viruses. (<http://ictvonline.org/>)

### 2.1 – Definición de virus

Podemos definir un virus como “...un set de una o más moléculas de templado de ácido nucleico, normalmente encapsuladas en una o más capas de proteína y/o lipoproteínas, que es capaz de organizar su propia replicación sólo cuando está dentro de huéspedes permitidos. Usualmente, sólo puede ser transmitido horizontalmente entre huéspedes permitidos. Dentro de las células, la replicación viral 1) depende de la maquinaria de síntesis proteica del huésped, 2) se organiza a partir de pools de materiales del huésped, 3) de modo no separado del huésped por un sistema de membranas y 4) dando lugar permanentemente a variantes a partir de varios tipos de cambios en el ácido nucleico del virus...” [7]

Para ser considerado como virus, el agente debe ser capaz de transmitir la enfermedad horizontalmente a un huésped. Dentro de estas limitaciones dadas por la definición, los virus presentan una enorme diversidad en los diversos aspectos de su biología, lo que da lugar a una compleja clasificación y nomenclatura.

### 2.2 – Clasificación de los virus

Al fin de la clasificación de los virus, caracteres moleculares, genéticos y morfológicos han sido utilizados. Sin pretender una enumeración exhaustiva, podemos mencionar que los descriptores más utilizados en taxonomía viral son [7, 16]:

#### 1) Propiedades del virión

##### A. Morfológicas (tamaño, forma, presencia o ausencia de envoltura)

- B. Propiedades físicas del virión (Masa molecular, densidad, estabilidad ante solventes)
  - C. Propiedades del genoma. (DNA o RNA, cadena doble o cadena simple, y en este caso, polaridad negativa o positiva de la cadena, linealidad o circularidad del genoma, número de segmentos del genoma, tamaño del mismo, presencia de 5' caps, 3' poli-As o VPgs asociados, comparación nucleotídica).
  - D. Propiedades de las proteínas virales (Número, tamaño, actividades funcionales como las catalíticas, comparación de secuencias proteicas).
- 2) Organización y replicación del genoma (estrategias de replicación, características de la replicación, traducción y modificaciones post-traduccionales, presencia/ausencia de cuerpos de inclusión)
  - 3) Propiedades antigénicas (relaciones serológicas, mapeo de epítopes).
  - 4) Propiedades biológicas (rango de huéspedes, patogenicidad, tropismo de tejidos, histopatología, modo de transmisión, relaciones con vectores).

Usando éstos y otros criterios, han sido determinados hasta el momento 87 géneros pertenecientes a 20 familias de virus que afectan plantas. Puede consultarse el detalle en <http://viralzone.expasy.org/> ([17]). La mayoría de los virus de plantas descritos son ssRNA (+) virus. Los virus se clasifican en categorías de orden, familia, género y especie.

### **2.2.1 – El problema de la diferenciación especie-cepa**

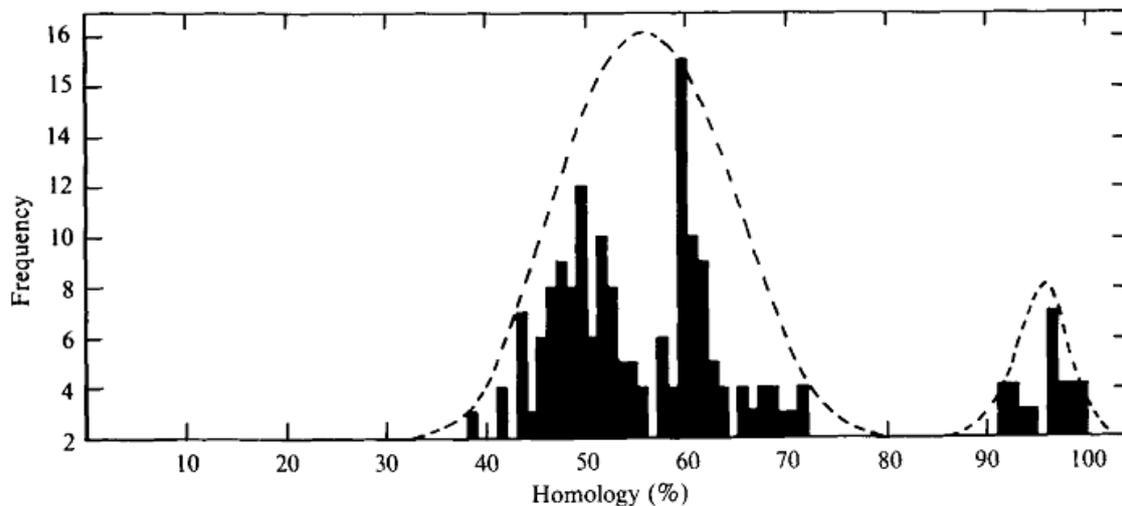
La delimitación del concepto de “especie” viral suele ser complicada y objeto de debate ([15, 18-22]), y la consideración acerca de si un aislado viral en particular es una nueva especie o una cepa (“strain”) de una especie ya descrita, es un evento común. Esto se debe, principalmente, a que la estructura poblacional de los virus, debido a su alta tasa de error en la replicación, da lugar al establecimiento de una colección de cuasiespecies. Una especie viral podría ser considerada como una colección de cepas con propiedades similares. Más estrictamente, y de acuerdo al ICTV:

*“Una especie viral es una clase politética de virus que constituye un linaje replicativo y ocupa un nicho ecológico particular” [18].*

El intento de clasificar los aislados como cepas pertenecientes a una misma especie o no, tiene relevancia con objeto no sólo puramente taxonómico, sino también conceptual y práctico, a los fines de las actividades de extensión y alerta a los productores. A tal fin, se han desarrollado varios tipos de criterios para determinar lo más objetivamente posible si el investigador está en presencia de una nueva cepa o de una nueva especie viral. Entre los criterios, se destacan:

- 1) Los biológicos (comparación de síntomas macroscópicos y efectos citológicos, rango de huéspedes, y genotipo de huéspedes sensibles, métodos de transmisión, etc.).
- 2) Los serológicos (entre los que destaca la reacción ante ensayo de ELISA).
- 3) Los estructurales, principalmente
  - A. Ácidos nucleicos (nivel de homología de secuencias nucleotídicas de genes o genomas completos, hibridación por dot-blot, RFLPs, SSCP, etc.). Aunque los análisis a nivel nucleotídico pueden tener desventajas. Las sustituciones sinónimas, los cambios de marco de lectura, codones stop, y posibles múltiples funciones de la misma secuencia (regulatoria/codificante) en diferentes marcos de lectura que dan diferente peso a diferentes nucleótidos hacen que la sola utilización de información nucleotídica para determinar relaciones taxonómicas de virus, no sea aconsejable como única fuente.
  - B. Proteínas. Se ha demostrado que la CP de los virus de plantas, especialmente los de ssRNA (+), tiene una importancia fundamental en varios procesos biológicos relevantes para el virus. Varias características dependen de la CP (reacción de ELISA, movilidad electroforética, unión a cationes, etc.). Así, el grado de conservación de los aminoácidos de la CP debería ser alto entre cepas de un mismo virus, y menor entre especies de un género.

Un ejemplo clásico es dado por la clasificación de los potyvirus. Durante mucho tiempo, la taxonomía de este grupo de virus de plantas estuvo en gran desorden y confusión. Esto en parte se debía al enorme número de potyvirus descritos (los cuales constituyen un 10% de todos los virus de plantas [7]), pero también a la gran variación entre ellos y la incapacidad de los investigadores de diferenciarlos entre sí. Se creía que los potyvirus formaban un “continuum” de pocos géneros, con límites difusos entre taxones inferiores. Sin embargo, un trabajo enfocado en análisis de la CP de diferentes cepas de varias especies [23], permitió establecer claramente un umbral de homología a partir del cual poder diferenciar cepas de especies diferentes, clarificando por completo el panorama para este grupo (Figura 1.3).



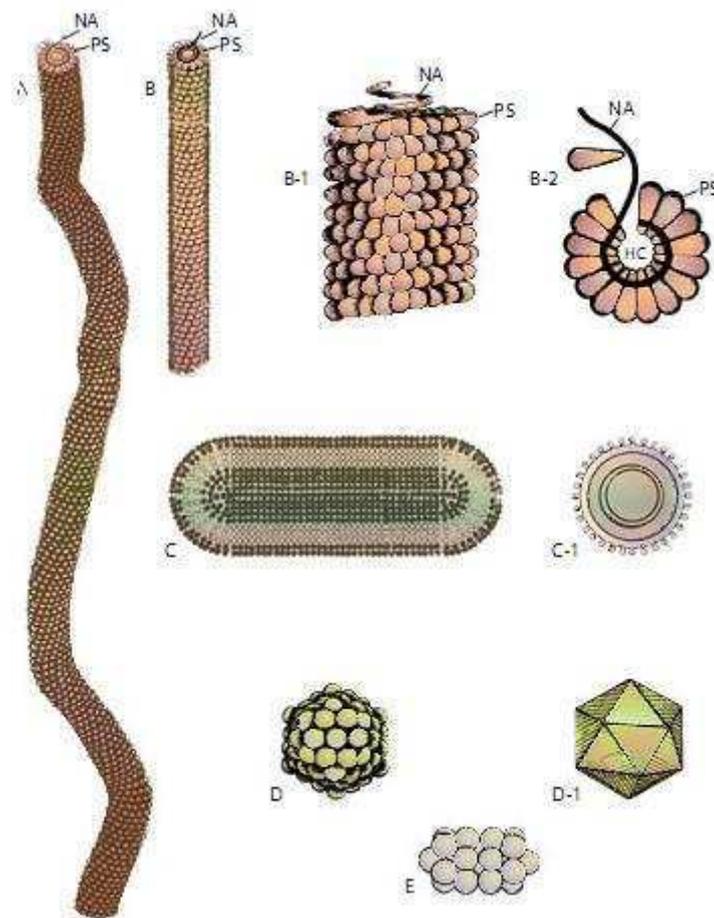
**Figura 1.3.** Distribución bimodal de frecuencias de 136 comparaciones de las homologías de secuencia de aminoácidos de las CPs de 17 cepas de 8 potyvirus diferentes. Homologías entre distintos virus tuvieron un valor medio de 54% (pico de la izquierda,  $SD=7\%$ ) con un rango entre 38-71%. Homologías entre distintas cepas tuvieron un valor medio de 95% (pico de la derecha,  $SD=3\%$ ) con un rango entre 90-99%. Fuente: Shukla and Ward, 1988 ([23]).

Más adelante en el desarrollo de esta Tesis, se pondrá de manifiesto la pertinencia de diferenciar entre ambas categorías taxonómicas en el presente estudio.

## 2.3 – Características generales de los virus de plantas

### 2.3.1 – Morfología

La diversidad de formas que adoptan los diferentes virus de plantas es muy grande (Figura 1.4). Las partículas virales (viriones) se componen de dos partes principales, el genoma de ácido nucleico y la envoltura (cápside) de proteína. Las cápsides de los virus se ensamblan siguiendo dos tipos básicos de simetría, helicoidal (dentro de la cual se encuentran los filamentos rígidos o flexuosos) o icosaédrica (que presentan variantes baciliformes y viriones gemelos). El rango de tamaño de las partículas virales es variable: mientras que para los filamentos rígidos son comunes los tamaños de 15 por 300 nm, los flexuosos pueden tener 10-13 nm de ancho y hasta 2000 nm de largo. Los virus poliédricos pueden tener un diámetro entre 17 y 100 nm.

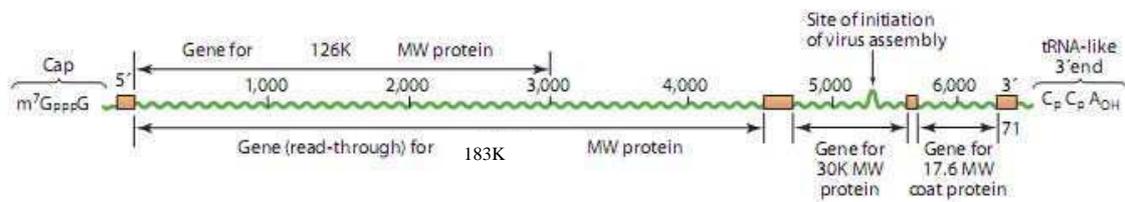


**Figura 1.4.** Formas, tamaños y estructuras representativas de algunos virus de plantas. (A) Virus filamentosos flexuoso. (B) Virus rígido en forma de bastón. (B-1) Disposición espacial de subunidades proteicas (PS) y ácido nucleico (NA) en los virus A y B. (B-2) Vista de una sección de esos mismos virus. HC, cuerpo ahuecado. (C) Virus corto baciliforme. (C-1) Vista de un corte de ese virus. (D) Virus isométrico poliédrico. (D-1) Icosaedro representando la simetría de 20 lados de las subunidades proteicas del virus isométrico. (E) Geminivirus consistente en partículas gemelas. *Adaptado de [8].*

Típicamente, en virus de plantas los ácidos nucleicos forman el 5-40% del virus, y la proteína el restante 60 a 95%. Los virus elongados poseen la menor relación de ácido nucleico:proteína. Lo inverso se da en los virus de simetría esférica.

### 2.3.2 – Tipo y organización del genoma

La mayoría (cerca del 80%) de los virus de plantas son ssRNA(+) virus. Sin embargo, otras posibilidades existen, como virus con genomas dsRNA, ssRNA(-), ssDNA o retrovirus de dsDNA. No se han descrito fitovirus con genomas de dsDNA que no sean retrovirus o retrovirus de ssDNA. La organización básica de un genoma de virus puede ilustrarse mediante el más estudiado de todos los fitovirus, el *Tobacco Mosaic Virus* TMV (Figura 1.5):

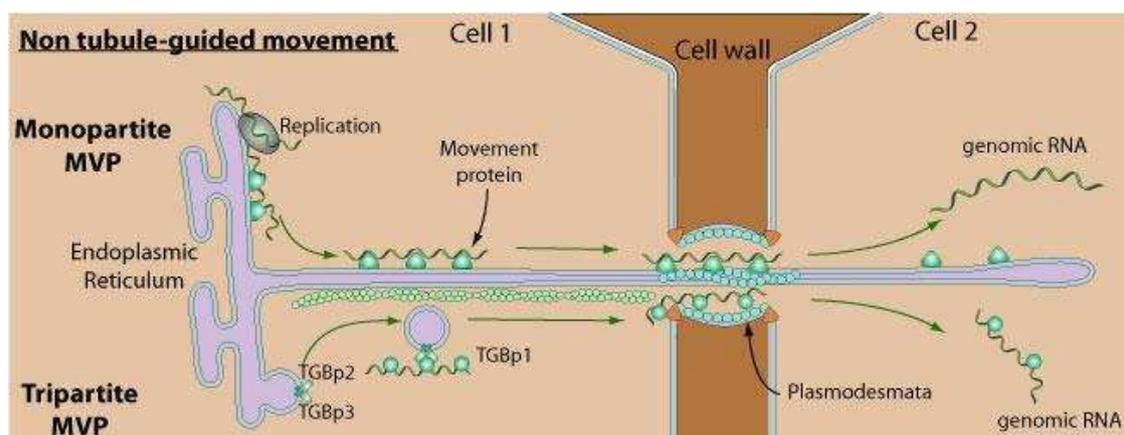


**Figura 1.5.** Genoma de TMV, ssRNA(+) de unos 6400 nt. La traducción de 4 genes da lugar a proteínas de 126, 183, 30, y 17.6K de peso molecular, respectivamente. Los rectángulos naranjas representan secuencias regulatorias. *Adaptado de [8].*

Luego de la entrada a la célula y su desencapsidación, la mayoría de los virus de plantas replican su RNA (que sirve a la vez de mRNA) y sintetizan sus proteínas en el citoplasma. Unos pocos virus de plantas, como los virus de genoma dsDNA que se integran al DNA del huésped en el núcleo o los que poseen genoma ssDNA, replican y transcriben en el núcleo, donde también pueden ensamblar el virión.

### 2.3.3 – Ciclo vital de los virus de plantas

El ciclo de vida de los virus comienza con su entrada a la célula vegetal. Dos modos de entrada existen para los diferentes virus, según su ciclo vital: entrada a través de daño mecánico inducido a la planta (por ejemplo, por el pastoreo de herbívoros) o la entrada mediante vectores (insectos chupadores cuyo aparato bucal chupador esté contaminado con viriones infectivos). Ambas estrategias permiten a los viriones traspasar la dura cutícula protectora de las células vegetales y entrar en el citoplasma de las células. Luego, la dispersión es en primera instancia hacia otras células vecinas vía los plasmodesmos (Figura 1.6).



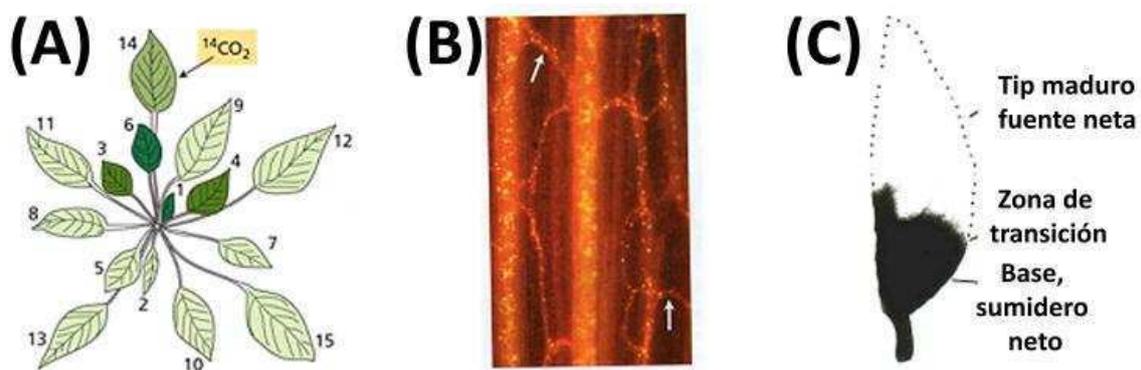
**Figura 1.6.** Movimiento célula-célula de fitovirus. El genoma viral se asocia con proteínas de movimiento (MP) virales y, a veces, proteínas del huésped, para ampliar el tamaño del plasmodesmo y pasar a la célula vecina. *Tomado de <http://viralzone.expasy.org/>*

Este movimiento de célula a célula toma en promedio 1 mm por día (8-10 células). Sin embargo, los virus se dispersan luego por el floema, a través de los plasmodesmos, desde donde son transportados largas distancias dentro de la planta. La mayoría de los virus tardan entre 2 y 5 días en abandonar la hoja inoculada y comenzar el movimiento sistémico, el cual se realiza pasivamente, siguiendo el sentido

del flujo de fotoasimilados. Este movimiento es mucho más rápido (del rango de cm por hora) y la reentrada desde el floema hacia células parenquimáticas de alrededor permite colonizar tejidos nuevos. Finalmente, la transmisión del virus de una planta a otra, completa el ciclo vital del virus.

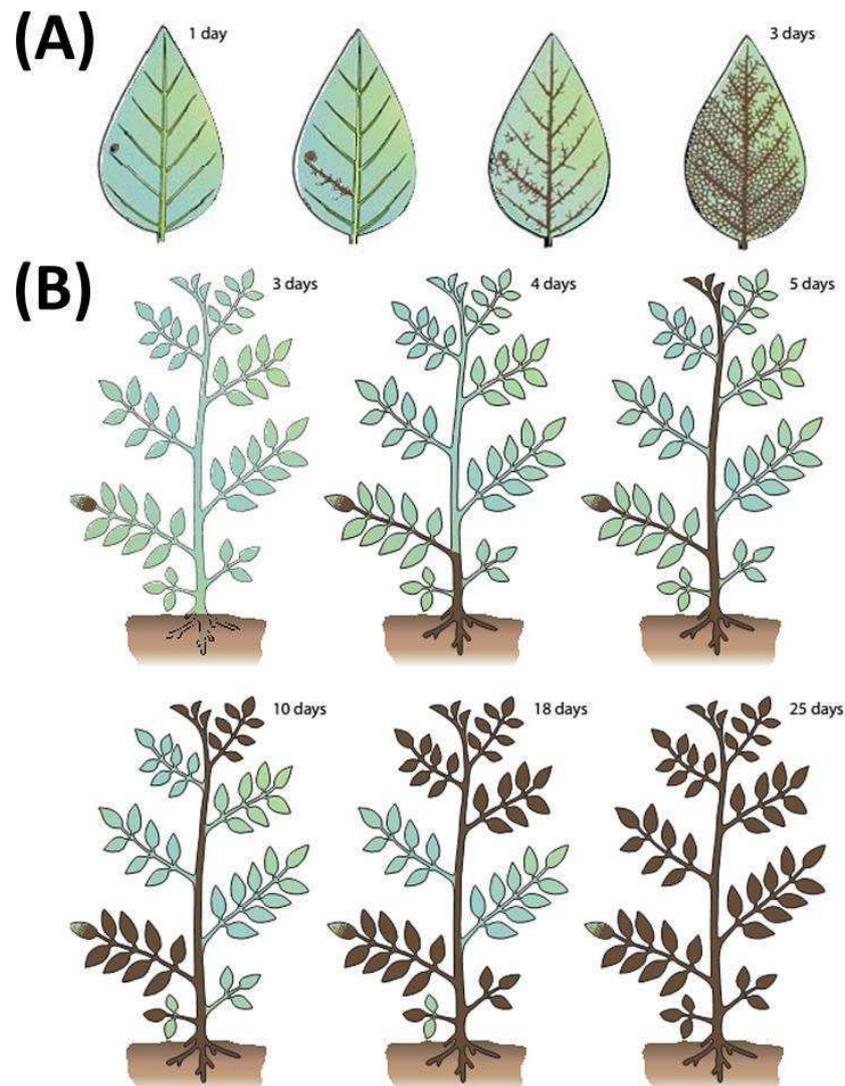
### 2.3.4 – Sentido del movimiento sistémico viral dentro de la planta

La distribución de los virus en etapas avanzadas de la infección termina siendo hacia prácticamente toda la planta, pero la velocidad de llegada a diferentes tejidos, o incluso a partes de un dado tejido, depende de varios factores: proximidad al tejido fuente, estadio de desarrollo de la planta y del tejido sumidero, fuerza relativa de los sumideros y conexiones vasculares. La dispersión viral sigue un patrón determinado en parte por la fuerza relativa de los tejidos como fuente/destino de fotoasimilados (Figura 1.7). La dispersión sistémica del virus es influenciada por el flujo de metabolitos en la planta (Figura 1.7A) y la dispersión es mediante los tubos cribosos del floema (Figura 1.7B). Dentro de las hojas también se distinguen zonas viejas, exportadoras netas de fotoasimilados, y zonas en desarrollo, importadoras netas (Figura 1.7C).



**Figura 1.7.** Sentido del movimiento sistémico de los fotoasimilados en las plantas. (A) Mediante el suministro de  $^{14}\text{CO}_2$  radiactivo a una sola hoja madura (hoja 14, fuente neta) puede posteriormente detectarse la marca radiactiva incorporada en fotoasimilados preferentemente en las hojas superiores que forman un pequeño ángulo con la hoja 14 (hojas 1, 3, 4 y 6, sumideros netos). Nótese la ausencia de marca en hojas 2, 5 y 7, que son sumideros netos pero forman un ángulo mayor con la hoja 14. (B) Corte longitudinal que muestra la ubicación de los tubos cribosos del floema, responsables del transporte de fotoasimilados. Su anatomía determina que el flujo de fotoasimilados sea preferentemente vertical (canales de gran diámetro), y sólo marginalmente radial (anastomosis, marcadas con flechas). (C) Hoja sumidero que importa fotoasimilados marcados con  $^{14}\text{CO}_2$ . Se distinguen zonas exportadoras netas de fotoasimilados (distales) y zonas en desarrollo, importadoras netas (proximales). (A-B) Tomado de [24]. (C) Tomado de [25].

Esto determina un patrón general para la dispersión de virus, en el cual las raíces, tubérculos y hojas superiores jóvenes son los primeros tejidos en ser invadidos (Figura 1.8).



**Figura 1.8.** Dispersión de TMV en plantas de tomate a partir de un foco de infección puntual. (A) Dispersión dentro de la hoja inoculada y (B) dispersión a tejidos sistémicos. Tomado de [8] luego del trabajo original de [26].

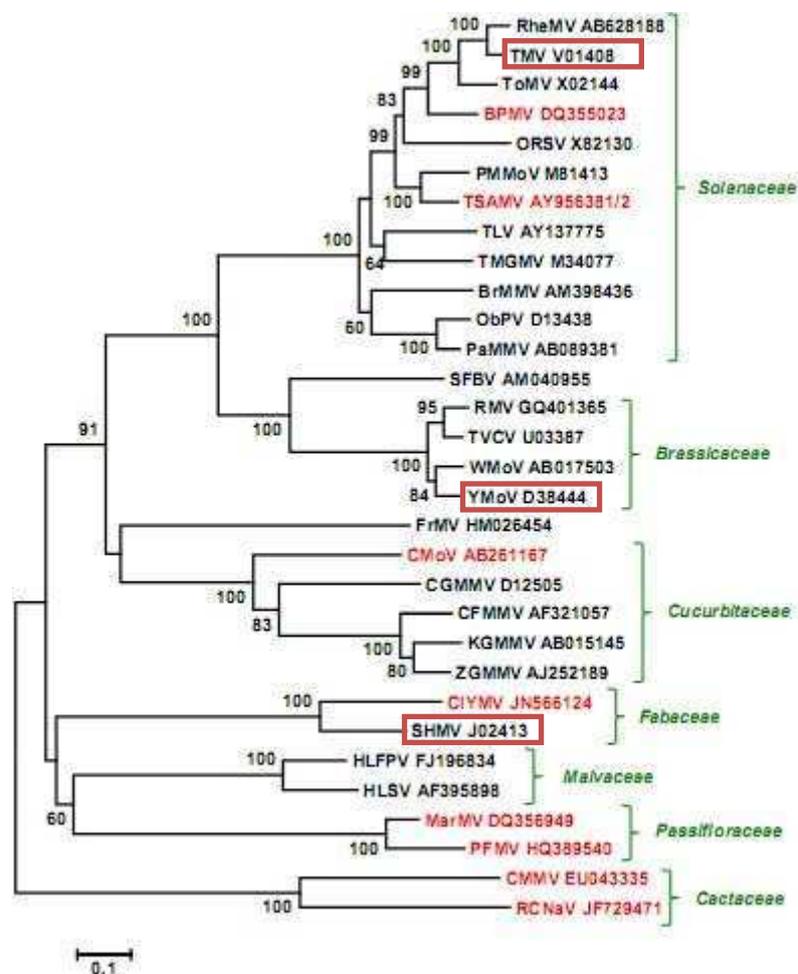
### 3 – Características de los virus utilizados en esta Tesis

En esta Tesis se trabajó con virus pertenecientes a los géneros *Tobamovirus* y *Potyvirus*. Ambos poseen virus ssRNA (+) cuyos genomas no están fragmentados. Es decir, son virus cuyo genoma está conformado por una única hebra de RNA que puede ser traducida directamente en la totalidad de las proteínas virales. A continuación se reseñarán algunas de las características de los virus pertenecientes a estos géneros.

#### 3.1 – El género *Tobamovirus*

La familia *Virgaviridae* es una de las 72 familias virales no asignadas aún a ningún orden taxonómico. Dentro de esta familia, el género *Tobamovirus* es el más numeroso, con cerca de 30 representantes, infectando una gran variedad de plantas

de diversas familias (Figura 1.9). La especie tipo de este género es el TMV (Figura 1.10), el virus de plantas más citado y estudiado del mundo [27].

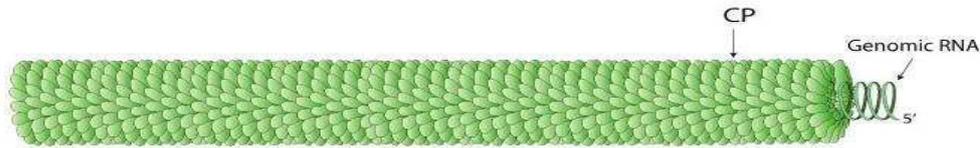


**Figura 1.9.** Árbol filogenético (distancia) de las secuencias aminoacídicas de las proteínas de movimiento y cápside de los tobamovirus. En rojo, las 8 nuevas especies propuestas pendientes de confirmación por el ICTV. Recuadradas, las especies que se usaron en esta Tesis. Tomado de <http://ictvonline.org/>.

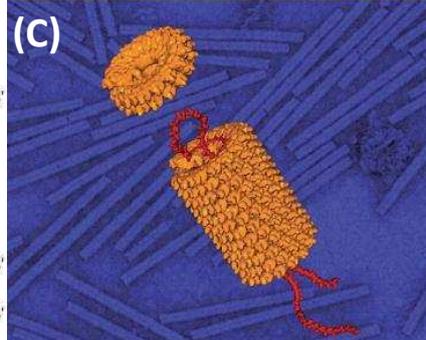
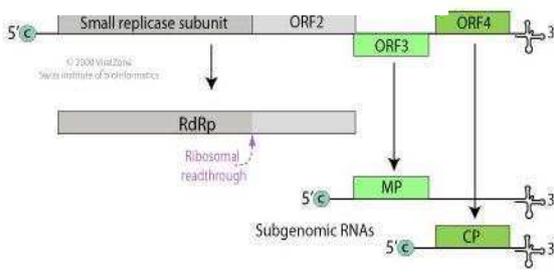
El género *Tobamovirus* es el único que posee virus con genomas monopartitos y que a la vez, sus viriones forman bastones rígidos (Figura 1.10A). Éstos se componen de 5/ de ácido nucleico y 95/ de proteína. Poseen simetría helicoidal con unos 18nm de ancho y 300nm de largo. Su genoma de 6.3-6.5 kb de ssRNA(+) posee cap metilada en 5' y carece de poli(A) en su extremo 3', en donde tiene una estructura similar a tRNA (Figura 1.10B). A partir del RNA genómico se traducen las proteínas que componen la replicasa viral que sintetiza la hebra complementaria. Utilizando esta hebra como molde se transcriben los RNAs subgenómicos. Su posterior traducción produce en primer lugar la MP y luego la CP, que forma complejos agregados homopoliméricos para el posterior ensamblaje del virión (Figura 1.10C). El esquema del ciclo del virus en la célula se ve en la Figura 1.11. La transmisión de estos virus ocurre fácilmente por daño mecánico o contacto, no se conocen insectos vectores. Los viriones son muy estables y mantenidos adecuadamente pueden ser infectivos luego de 50 años. En el marco de esta Tesis, se trabajará con tobamovirus que infectan plantas de la familia *Solanaceae* (el *Tobacco mosaic virus*, o TMV) y *Brassicaceae* (el

*Youcai mosaic virus*, o YMoV). A su vez, dos cepas del YMoV serán las utilizadas: *Oilseed rape mosaic virus* (ORMV) y la denominada Cg. Síntomas de infecciones virales con tobamovirus se ven en la Figura 1.12.

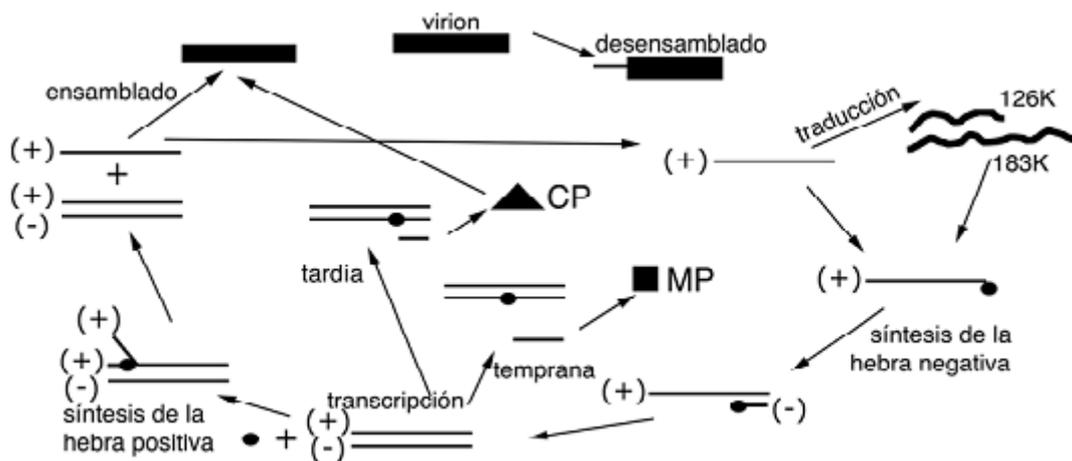
(A)



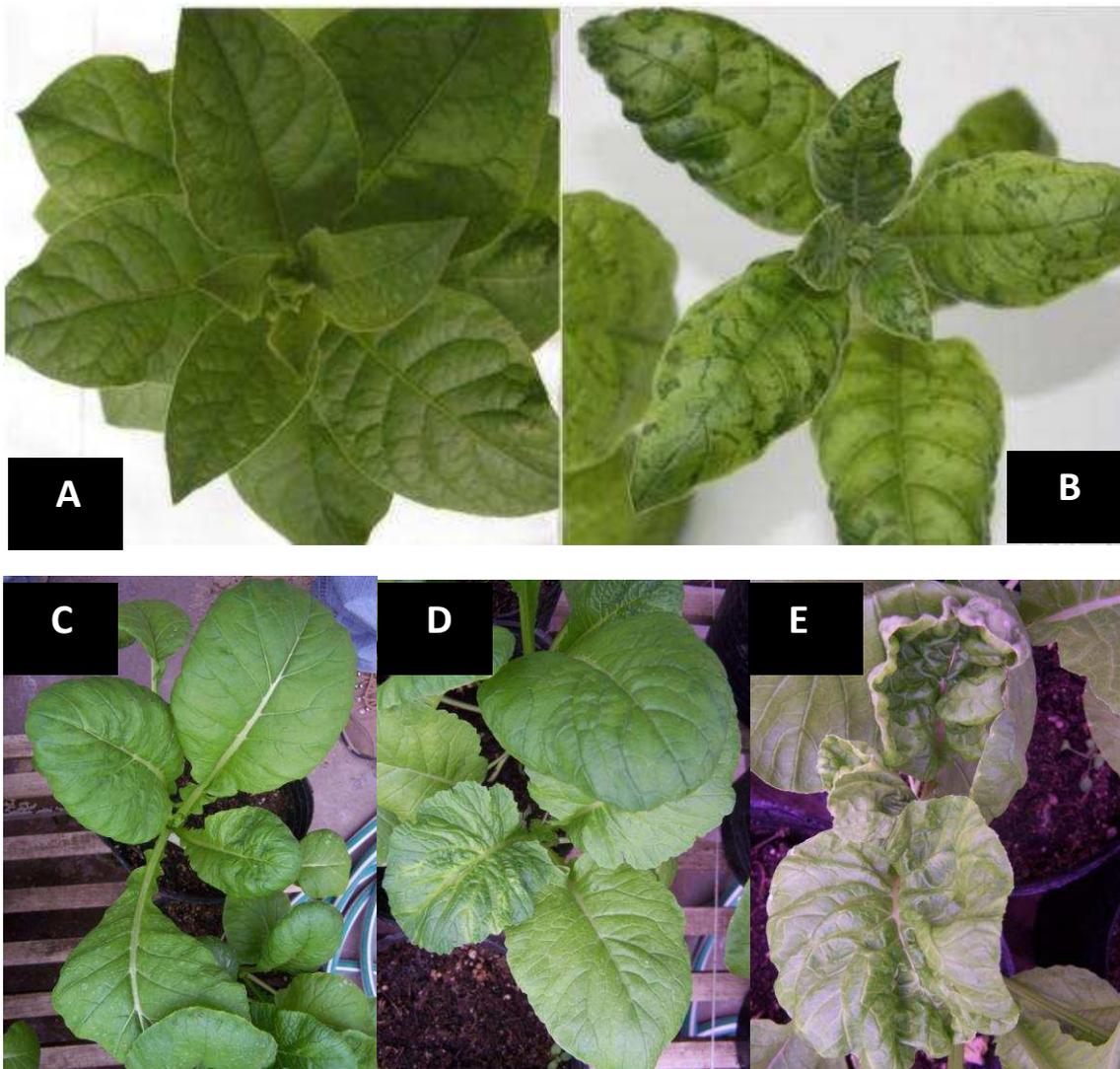
(B)



**Figura 1.10.** Los Tobamovirus. (A) Virión. Se observa la proteína de la cápside (CP), que envuelve al genoma de ssRNA(+) de manera helicoidal. (B) Genoma. El RNA genómico sirve a la vez de mRNA. Al menos 4 proteínas son traducidas, a partir de 3 RNAs sub-genómicas. (C) Imagen compuesta. Delante: diagrama esquemático mostrando un disco de agregados de CP a punto de unirse al virión en proceso de ensamblado. El ssRNA(+) pasa por el centro hueco de los sucesivos agregados. En el fondo: tinción negativa de micrografía electrónica de viriones de TMV. (A-B tomados de <http://viralzone.expasy.org/>. (C) Tomado de [27]).



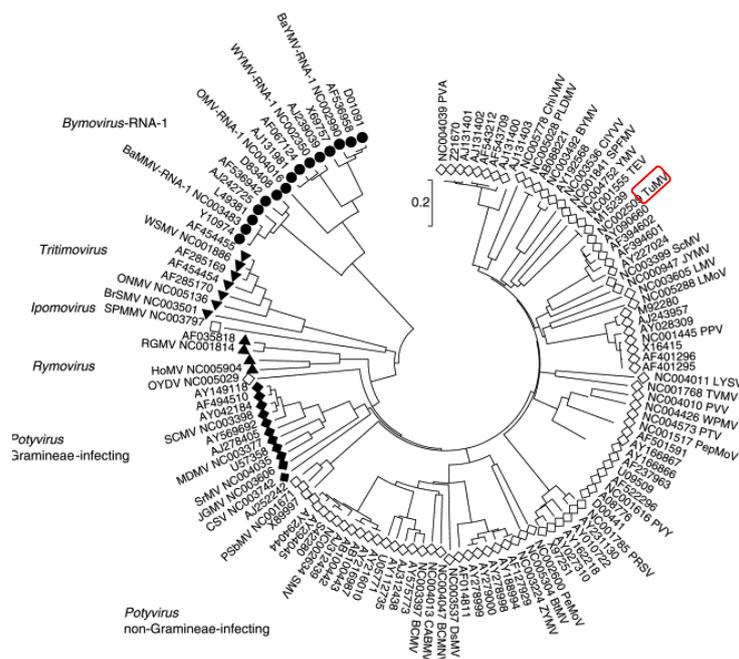
**Figura 1.11.** Esquema del ciclo viral del TMV en el citoplasma de una célula vegetal comenzando con el desensamblado viral y finalizando con la conformación del virión. K= kDa. Tomado de [28].



**Figura 1.12.** Síntomas producidos por los tobamovirus usados en esta Tesis en sus huéspedes habituales. (A-B) Plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*, familia *Solanaceae*) susceptibles al TMV. La foto (A) corresponde a una planta inoculada con buffer (NI) y la (B) a una planta inoculada con TMV mostrando el síntoma de mosaico característico. (C-E) Plantas de *Brassica juncea* (familia *Brassicaceae*) susceptibles al *Youcai mosaic virus* (YMoV). La foto (C) corresponde a una planta inoculada con buffer (NI), la (D) a una planta inoculada con la cepa Cg de YMoV y la (E) a una planta inoculada con la cepa ORMV de YMoV, mostrando los síntomas característicos de mosaico y deformación de la hoja. (A-B) Gentileza de la Dra. G.C. Conti.

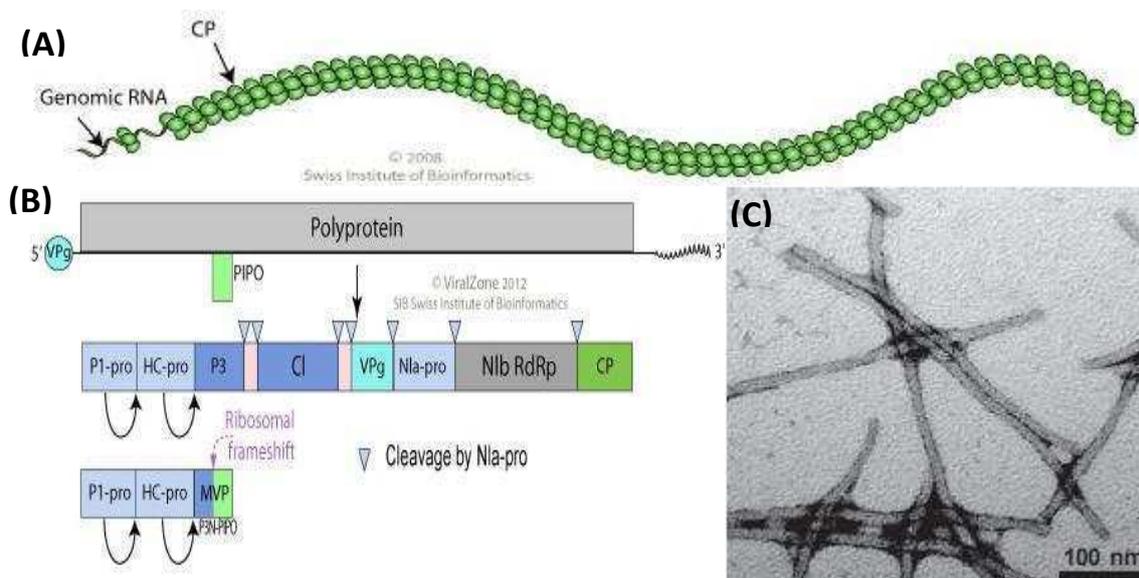
### 3.2 – El género *Potyvirus*

La familia *Potyviridae* no está asignada aún a ningún orden taxonómico. Dentro de esta familia, el género *Potyvirus* es el más numeroso; sus 146 especies constituyen el género más numeroso de todos los virus de plantas. La Figura 1.13 muestra la biodiversidad de esta familia.



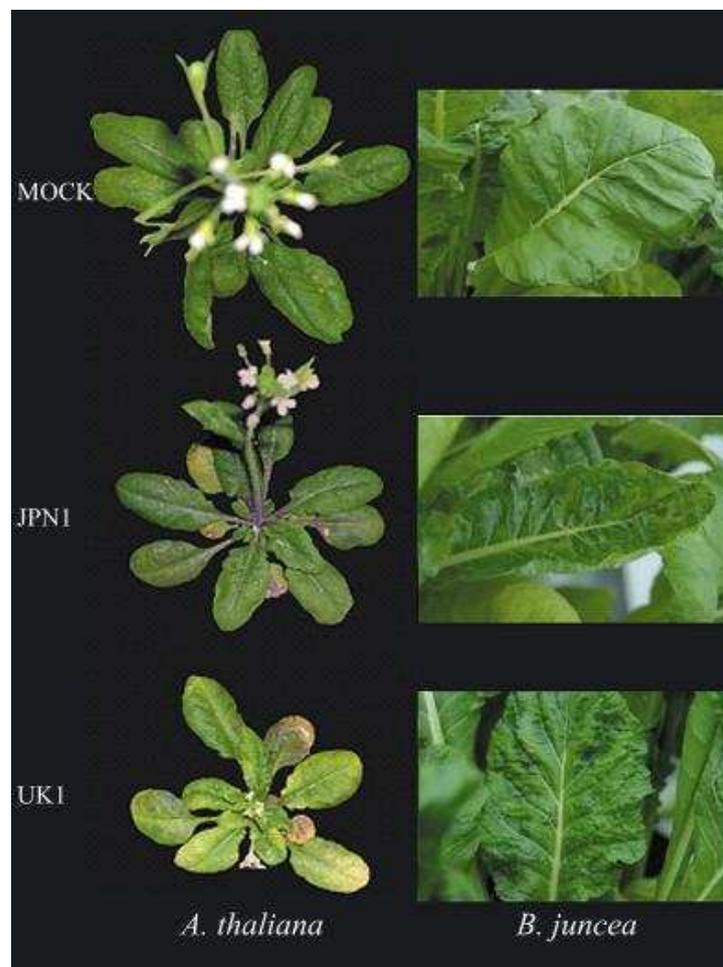
**Figura 1.13.** Biodiversidad de la familia *Potyviridae*. Análisis filogenético de la comparación de 120 genomas virales de 48 miembros de la familia *Potyviridae* mediante alineamiento por ClustalX. Diamantes llenos indican integrantes del género *Potyvirus* que infectan gramíneas, diamantes blancos indican integrantes del género *Potyvirus* que no infectan gramíneas. Triángulos, cuadrados y círculos indican integrantes de la familia *Potyviridae* que no pertenecen al género *Potyvirus*. Recuadrado, el potyvirus que se utilizó en este trabajo, *Turnip mosaic virus* (TuMV). Tomado de [29].

La especie tipo de este género es el *Potato virus Y* (PVY) y se esquematiza en la Figura 1.14.



**Figura 1.14.** Los Potyvirus. (A) Virión. Posee simetría helicoidal y es flexuoso. Se observa la proteína de la cápside (CP), que envuelve al genoma de ssRNA(+). (B) Genoma. El RNA genómico sirve a la vez de mRNA y es traducido dando lugar a una poliproteína que es a su vez procesada por 3 proteínas virales en productos finales (flechas). En P3N-PIPO se ubica un segundo ORF, expresado mediante “ribosomal frameshifting” (cambio eventual de marco de lectura del ribosoma durante la traducción); se cree que actúa como MP. (C) tinción negativa de micrografía electrónica de viriones de PVY. (A-B tomados de <http://viralzone.expasy.org/>. (C) Tomado de [27]).

Los *Potyvirus* poseen genomas monopartitos lineales. Sus viriones son flexuosos y filamentosos (Figura 1.14A). Éstos se componen de 5% de ácido nucleico y 95% de proteína. Poseen simetría helicoidal con unos 12-15nm de ancho y 720-850nm de largo. Su genoma de alrededor de 10 kb de ssRNA(+) posee una proteína viral asociada covalentemente (VPg) en 5' y un tracto de poli(A) en su extremo 3' (Figura 1.14B). A partir del RNA genómico se traducen las 10 proteínas virales en un RNA mensajero que forma una poliproteína. HC-Pro autocataliza el corte del fragmento P1-HC-Pro del resto de la poliproteína, siguiendo el corte autocatalítico de P1. NIa-Pro corta el resto de la poliproteína. La proteína CI forma cuerpos de inclusión citoplasmáticos en las células infectadas. Recientemente, se ha descubierto que una proteína adicional ubicada dentro de P3, llamada PIPO, se traduce con un cambio en +2 en el marco de lectura, separada de la poliproteína principal [30]. La transmisión de estos virus ocurre mediante insectos vectores (áfidos). Síntomas de infecciones virales con potyvirus se ven en la Figura 1.15.



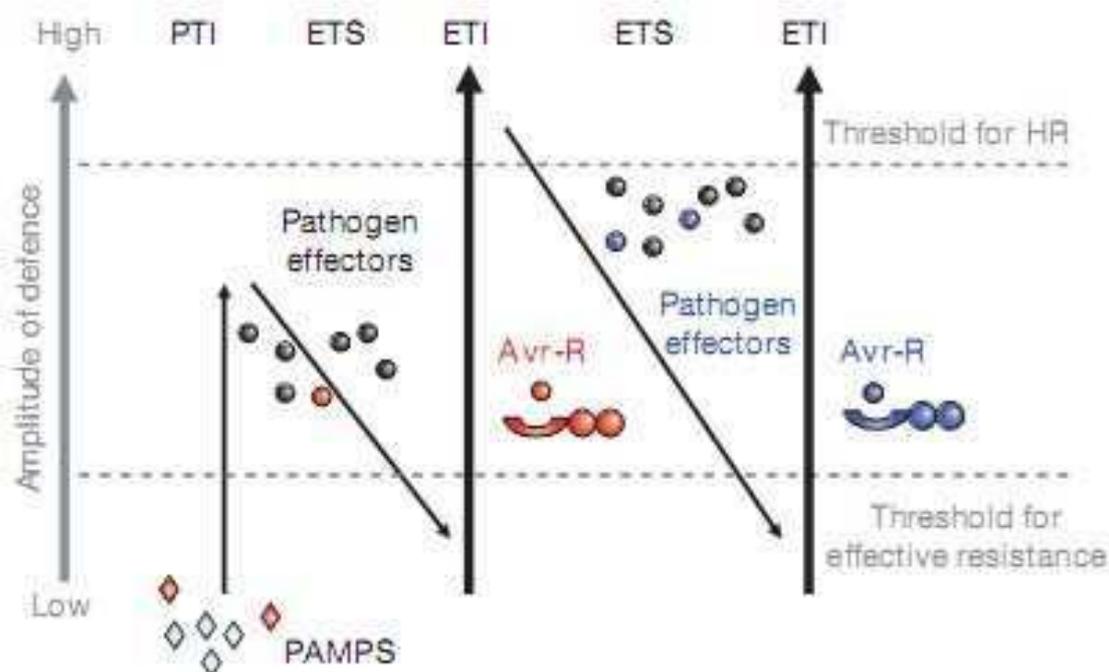
**Figura 1.15.** Síntomas producidos por los potyvirus usados en esta tesis en los huéspedes utilizados. Efecto de la inoculación con buffer (arriba), TuMV-JPN1 (en el centro) o TuMV-UK1 (abajo) en plantas de *A. thaliana* (panel izquierdo) o plantas de *B. juncea* (panel derecho) a 16 dpi. En las plantas de Arabidopsis infectadas se pueden observar las deformaciones foliares, el torcimiento del tallo floral en plantas infectadas con la cepa JPN1, y el arresto de la floración en las infectadas con UK1. En *B. juncea* se observan los fenotipos de mosaico característicos y las deformaciones foliares.

## 4 – Interacciones virus-planta

Durante una infección viral, en una mirada simplificada, básicamente el huésped intenta restringir la infección a la vez que el virus intenta sobrepasar estas barreras. El resultado del juego entre los dos genomas, particular de cada pareja virus-huésped es el que en última instancia determina los síntomas eventualmente visibles luego de una infección viral. Siguiendo la definición de [31] establecemos que en el caso de las interacciones virus-planta observadas en la presente Tesis, todas ellas caen en el rango de huésped infectable, del tipo susceptible (replicación y movimiento virales sistémicos) y sensible, mostrando las plantas síntomas evidentes de las infecciones.

### 4.1 – Inmunidad innata

Las plantas están continuamente expuestas a un amplio espectro de patógenos, incluyendo virus, bacterias, hongos, oomycetes, nematodos, y la estrategia de defensa de la planta varía dependiendo de la del patógeno, en una co-evolución permanente. A diferencia de un sistema defensivo basado en células móviles como el de los mamíferos, las plantas dependen para su defensa del sistema de inmunidad innata de cada célula, y de las señales que de ellas se deriven [32]. Actualmente, se cree que hay esencialmente dos ramas del sistema defensivo de las plantas. La primera detecta mediante proteínas transmembrana (PRRs, de *pattern recognition receptors*) a proteínas efectoras del patógeno con un patrón molecular cuasi-universal (PAMPs, de *pathogen-associated molecular patterns*) de evolución lenta, como podría ser la flagelina bacteriana. El otro, citoplasmático, está compuesto por proteínas “R”, la mayoría de las cuales poseen dominios ricos en leucina (LRR) y un sitio de unión a nucleótidos (NBS), denominadas NBS-LRR [33]. Las NBS-LRR son efectivas, entonces, ante patógenos que se nutren de tejidos vivos (biótrofos obligados) o son hemibiótrofos, pero no ante necrótrofos [34]. Estos genes *R* son polimórficos, y evolucionan velozmente, a la par de los genes *Avr* de los patógenos, que son determinantes de avirulencia. Las proteínas *R* actúan ya sea interactuando físicamente con efectores moleculares del patógeno *Avr* ([35-37]) o de modo indirecto, reconociendo la alteración de blancos propios del huésped afectados por los efectores del patógeno ([32, 38]). El hallazgo de que diferentes alelos de proteínas *R* podrían reconocer variantes de proteínas *Avr* del patógeno apunta a un alto nivel de complejidad de las LRRs en la inmunidad de plantas [37]. Una mirada simplificada de cómo interactúan las plantas y sus patógenos en el contexto de esta defensa innata, se muestra en la Figura 1.16.



**Figura 1.16.** El “modelo de zigzag” ilustra la respuesta cuantitativa del sistema inmune innato de la planta. En un primer momento, la planta detecta, mediante proteínas extra-citoplasmáticas (PRRs), PAMPs del patógeno. Esto activa la defensa basal y detiene al patógeno (PTI, de *PAMP-triggered immunity*). Si el patógeno posee efectores Avr que supriman o superen la PTI, la resistencia es superada. Este fenómeno se conoce como *effector-triggered susceptibility* (ETS). La planta, a su vez, puede reconocer un efector del patógeno (esfera roja) mediante una proteína R que interactúe directamente con ella, o detecte cambios en moléculas propias que son blanco de la Avr. Esto neutraliza al patógeno, pudiendo provocar una respuesta hipersensible (HR), y nueva resistencia. Esto se denomina *effector-triggered immunity* (ETI), una versión más fuerte de protección que la PTI. Posteriormente, en el patógeno pueden evolucionar nuevas proteínas Avr (esferas azules), que sobrepasan la resistencia, hasta que en la planta a su vez se desarrolla una proteína R capaz de reconocerlas y desencadenar un nuevo ETI. Tomado de [32].

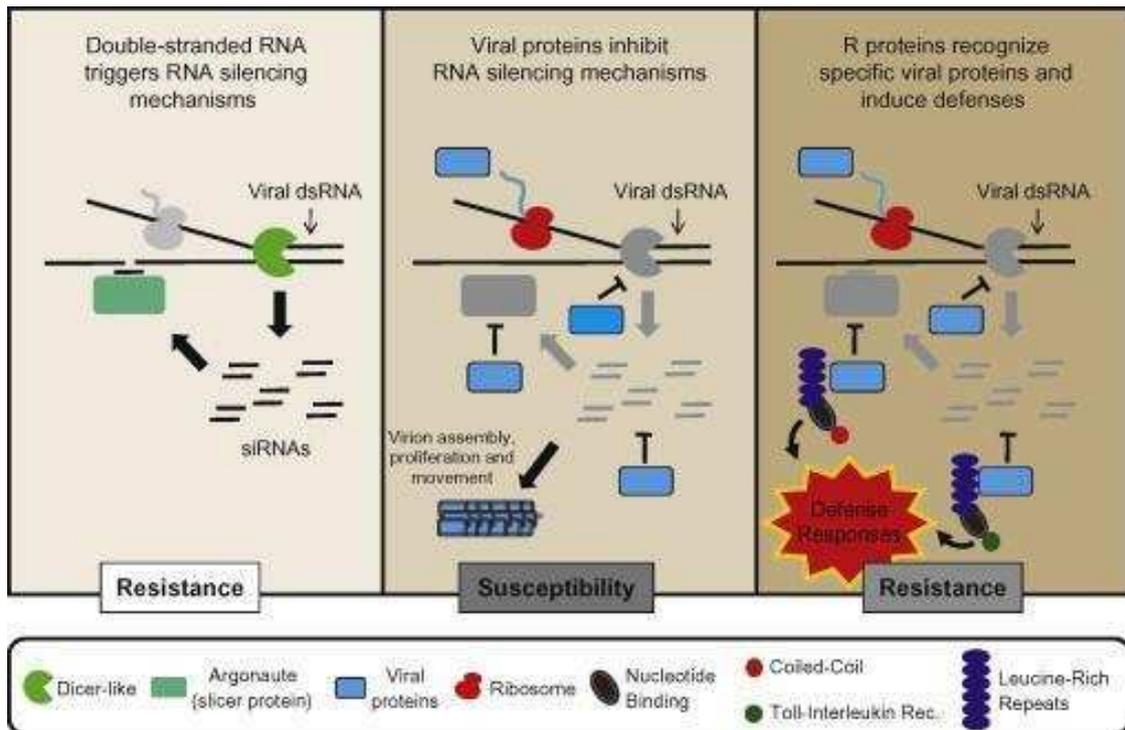
#### 4.1.1 – Resistencia genéticamente predeterminada pasiva e inducida

Como parásitos obligados no separados de su huésped por pared o membranas como otros patógenos de plantas, los virus han desarrollado características propias que enfrentan a las plantas con desafíos distintos a los que presentan los patógenos celulares. Antes del descubrimiento del silenciamiento de RNA y su rol en la defensa de las plantas, se pensaba que la defensa antiviral sólo estaba predeterminada genéticamente, ya sea de forma pasiva o inducida. La defensa pasiva puede resultar de la ausencia en el huésped de una variante génica que permite la infección. Un ejemplo de este tipo de resistencia es el que se da en la resistencia recesiva a potyvirus mediada por la relación entre la proteína VPg del virus y el factor de elongación proteico eIF4E del huésped. VPg interactúa con eIF4E [39] y cepas virales con ciertas mutaciones en la secuencia aminoacídica de la VPg son menos agresivas [40]. Esto se debe a que dichas mutaciones afectan directamente la capacidad de interacción de ambas proteínas. De este modo, mutaciones o *knock-down* de una o varias proteínas eIF4E resultan en resistencia a un amplio espectro de potyvirus [41-42]. En contraste, los mecanismos predeterminados genéticamente de resistencia inducida se

desencadenan luego de la infección. El ejemplo mejor estudiado es el de la respuesta hipersensible (HR), en la cual el virus es restringido a las células inicialmente infectadas mediante la muerte de las células de alrededor del foco de la infección (resumido en [43]). La HR puede determinar un estado de defensa activado para las células vecinas, la resistencia adquirida local (LAR) o sistémica, en toda la planta (SAR). Ésta suele generar una resistencia no sólo al patógeno causal, sino de amplio espectro [44].

#### **4.1.2 – Genes *R* y el paradigma del ETI en infecciones virales**

El caso de la HR desencadenada por virus se ajusta en parte al modelo de la Figura 1.16, ya que casi siempre es determinada por un solo gen de cada organismo, como el gen *N* del tabaco (gen *R* dominante que confiere resistencia a casi todas las cepas de TMV) y un gen *Avr* del virus (la proteína replicasa 126/183-kDa de TMV)[45]. Sin embargo, la extensión del paradigma del ETI en la resistencia antiviral en plantas tiene sus límites. Por un lado, las proteínas *R* de función antiviral aisladas de plantas son de la clase NBS-LRR, estructuralmente similares a las implicadas en defensa contra patógenos celulares, y están también localizadas en el citoplasma, desde donde disparan las mismas señales de amplio espectro anti-patógenos [46]. Pero por otro lado, las proteínas PRRs, que poseen dominio extracitoplasmático, no tendrían ningún rol en el reconocimiento de PAMPs virales, ya que los virus permanecen localizados intracelularmente (aunque no pueda descartarse que existan PRRs citoplasmáticas aún no descubiertas que sean responsables de la detección de elementos virales o de efectos inducidos en común por los virus en la célula infectada [47]). Se ha propuesto, sin embargo, que una analogía puede ser hecha entre los PAMPs de patógenos celulares y el dsRNA o RNA de estructura aberrante, que los virus poseen y que desencadenan el silenciamiento de RNA ([48], Figura 1.17).



**Figura 1.17.** Adaptación del paradigma del ETI a la resistencia a virus. (Izquierda), la defensa basal de la planta contra el virus reside en el reconocimiento de un PAMP viral, el dsRNA. El silenciamiento produce siRNAs que son utilizados por la maquinaria celular para degradar el genoma viral, dando resistencia. (Centro), los virus a su vez poseen inhibidores de la respuesta primaria, los supresores del silenciamiento (efectores), que actúan a diferentes niveles, dependiendo del virus y del supresor que codifique, originando ETS. (Derecha), estos efectores virales son a su vez reconocidos por las NBS-LRR (genes *R*) que generan una respuesta de defensa, determinando ETI. Tomado de [46].

Este esquema es válido para un número de “efectores” virales que sí son a la vez supresores del silenciamiento, como la replicasa de 126 kDa de TMV en *Nicotiana* spp. que dispara HR mediada por el gen *N*. Sin embargo, este esquema no puede universalizarse para la resistencia a las infecciones virales derivada de HR. Por ejemplo, la CP de TMV desencadena HR en *Nicotiana* spp. poseedoras del gen *N'*, sin ser supresora del silenciamiento (resumido en [47]). En conclusión, si bien el esquema clásico desarrollado para entender la conexión entre resistencia basal y resistencia inducida por bacterias es apropiado para explicar la resistencia a algunos virus desarrollada por las plantas, en otros casos dicha conexión posee bases aún no comprendidas del todo.

#### 4.2 – Rol de compuestos químicos de bajo peso molecular en la defensa contra virus

Entre las moléculas más conocidas que se inducen por la activación de genes de defensa están las fitohormonas ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (ET). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) como  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  y NO también juegan un rol en el establecimiento de la defensa. Estas moléculas poseen también importantes funciones en ausencia de ataque de patógenos en el desarrollo normal de la planta. Ante una infección con un patógeno, los niveles endógenos de estas hormonas suben, y se asocian con cambios en el transcriptoma [49]. Por otro lado, la aplicación exógena

de estas hormonas suele aumentar la resistencia basal en la planta [50], aunque el tipo de hormona utilizada determinará el espectro de resistencia inducida. En efecto, las evidencias apuntan a que la hormona involucrada en una protección eficaz dependerá de la relación patógeno-huésped, en particular del carácter biótrofo o necrótrofo del patógeno. Así, el papel del SA es más relevante en el caso de interacciones biótropas, mientras que el JA y sus derivados están involucrados en el control de patógenos necrótrofos [34]. Aunque las hormonas SA y JA han sido vistas por mucho tiempo como antagonistas [51] y de hecho, para algunos genes ése parece ser el caso, siendo inducidos por una hormona y reprimidos por la otra [52], la visión actual indica que la sinergia entre ambas hormonas es importante también, sobre todo ante la posibilidad de que la planta esté sometida al ataque de más de un tipo de patógeno [52-54]. Esta visión es reforzada por la reciente aparición de un trabajo de revisión automatizada de bibliografía que ha descubierto nuevos vínculos, directos e indirectos, entre JA y SA, e incluso evidencias de la hasta ahora poco explorada vinculación entre ET y SA [55]. A continuación se resume el papel de estos metabolitos en la defensa.

#### **4.2.1 –Ácido salicílico (SA)**

En el caso de interacciones incompatibles, el resultado del reconocimiento de efectores virales por parte de la planta puede determinar el desencadenado de HR. Ésta implica cambios mayores en la pared celular, proteínas señalizadoras y metabolitos como el SA en el sitio de infección y alrededores, en un radio de pocos cientos de células [56-57].

Si bien la respuesta hipersensible puede darse tanto frente a patógenos celulares como a virus, en este último caso se presentan particularidades que la diferencian. Por ejemplo, el ácido salicilhidroxinámico (SHAM) inhibe la resistencia inducida por SA a TMV en tabaco, pero no tiene efecto sobre patógenos celulares [58]. A su vez, aunque en ambos casos las proteínas PR son inducidas, no se ha demostrado un efecto antiviral de éstas, que sí actúan frente a otros patógenos [59-60]. Sin embargo, la HR presenta características en común en la defensa contra todos los patógenos, como la inducción de un estallido oxidativo que produce ROS, seguido de una acumulación de SA primero a nivel local y luego sistémico [61].

El desencadenado de una HR, que limita la zona de replicación viral, suele determinar el establecimiento de la SAR en tejidos no infectados. Ambos fenómenos están vinculados con la producción de SA por la planta. Es importante notar que la SAR no se desarrolla cuando el virus desafiante es capaz de moverse sistémicamente [62]. La importancia del SA en la defensa de la planta se pone en evidencia tanto mediante experimentos que implican aplicación exógena de SA o sus derivados, como mediante el uso de mutantes para la vía del SA. La aplicación de SA suprime la replicación de TMV en el tejido inoculado [63], sin embargo no tiene un efecto en la infección de tabaco con el potyvirus PVY [64], por lo que esta acción del SA no es universal para todas las interacciones virus-planta.

Asimismo, la importancia del SA en la respuesta ante patógenos queda en evidencia a través del uso de plantas de tabaco o *A. thaliana* transgénicas que expresan el gen bacteriano *NahG*. Éste codifica para una enzima que degrada SA.

Plantas NahG poseen susceptibilidad aumentada tanto a patógenos celulares como a virus [65-66]. Mutantes de *Arabidopsis* en genes *sid1*, *sid2*, y *pad4*, incapaces de acumular SA, también son más susceptibles a patógenos (ej.: [67]). SA es determinante en el desencadenado de la SAR, como se demuestra con el uso de transgénicas NahG, incapaces de desarrollar SAR ante la infección de TMV [68].

Normalmente las infecciones sistémicas no necrotizantes no activan la síntesis de SA ni la consiguiente activación de genes *PR* respondedores de SA. Sin embargo, se ha reportado un aumento en genes respondedores a SA durante infecciones compatibles de *Arabidopsis* con CMV-Y u ORMV [69] o TuMV [70], aunque en el caso de [69] las plantas mutantes para la vía de SA no mostraban más susceptibilidad a la infección que las Col-0, en contraste con lo que sucede en infecciones con patógenos celulares.

#### **4.2.2 –Ácido jasmónico (JA)**

Se ha observado que el SA es capaz de aumentar la concentración intracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, al inhibir proteínas con actividad catalasa, probablemente mediante la unión de SA con el grupo hemo de las mismas [71], y a la ascorbato peroxidasa [72]. Además, durante la interacción planta-patógeno, las ROS son producidas en gran medida en la membrana plasmática [73]. Esto puede dar lugar a la peroxidación no enzimática de lípidos de membrana, dando lugar a daño de membrana (común en la HR) y a oxilipinas, moléculas señalizadoras precursoras del JA [74]. La peroxidación lipídica también puede ser iniciada por enzimas de la familia de las lipoxigenasas (LOX). Bajo estrés o en senescencia, las enzimas LOX son inducidas [75]. Ante el ataque por patógenos, la enzima fosfolipasa A puede liberar ácidos grasos libres desde la membrana, los cuales son oxidados por LOX para producir hidroxiperóxidos lipídicos [76]. Esto da lugar a reacciones en cadena en la membrana [77] y son convertidos por una batería de enzimas en una mezcla compleja de metabolitos con actividad biológica diversa [78]. La HR también puede involucrar al JA, como se demostró al detectarse en tabaco infectado con *P. syringae* un incremento de JA alrededor del sitio de infección, pero no más allá, siendo este evento precedido por aumento en SA y ROS [79].

El JA posee también un rol en la resistencia basal. Por ejemplo, tanto la mutante *jar1*, con sensibilidad reducida a metil jasmonato (MeJA), como la triple mutante *fad3fad7fad8*, defectuosa en biosíntesis de JA, poseen susceptibilidad a oomicetes no patogénicos del suelo ([80-81]). La vía del JA es importante en la defensa contra herbivoría [82] y se ha reportado también la importancia de esta hormona en la resistencia adquirida contra el *Cucumber mosaic virus* (CMV) utilizando mutantes *fad3fad7fad8* ([83]). Estos ejemplos señalan el rol protector del JA contra un amplio rango de patógenos, y no exclusivamente contra necrótrofos.

#### **4.2.3 –Etileno (ET)**

El etileno ha sido implicado en estrés biótico como compuesto clave en la resistencia a patógenos. Las evidencias indican que el ET afecta de manera diferente la

resistencia a patógenos con diferentes estilos de vida. Aunque el rol del ET en resistencia a patógenos celulares vía su requerimiento para la inducción de al menos algunas PRs ha sido reportado [59], no está del todo claro su posible rol en la respuesta a virus. Es posible, sin embargo, que el etileno juegue un rol como regulador negativo del SA, como podría ser el caso del aumento de la resistencia observada en las mutantes de *etr1* (defectuosas en receptores de ET) de Arabidopsis ante CaMV [84]. Además, el ET se produce en forma masiva durante la HR. Por ejemplo, al inocular tabaco Samsun NN con TMV U1, se produce un aumento repentino en la síntesis y acumulación de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), el precursor químico del etileno, seguido de una rápida acumulación de ET. Tanto el aumento como la acumulación de ACC se restringen a las células que rodean las áreas necróticas. El aumento de etileno no es consecuencia de la aparición de lesiones necróticas, sino que las precede. Ninguno de estos cambios se observan en plantas susceptibles sistémicamente [85].

#### **4.2.4 –La elusiva señal de SAR**

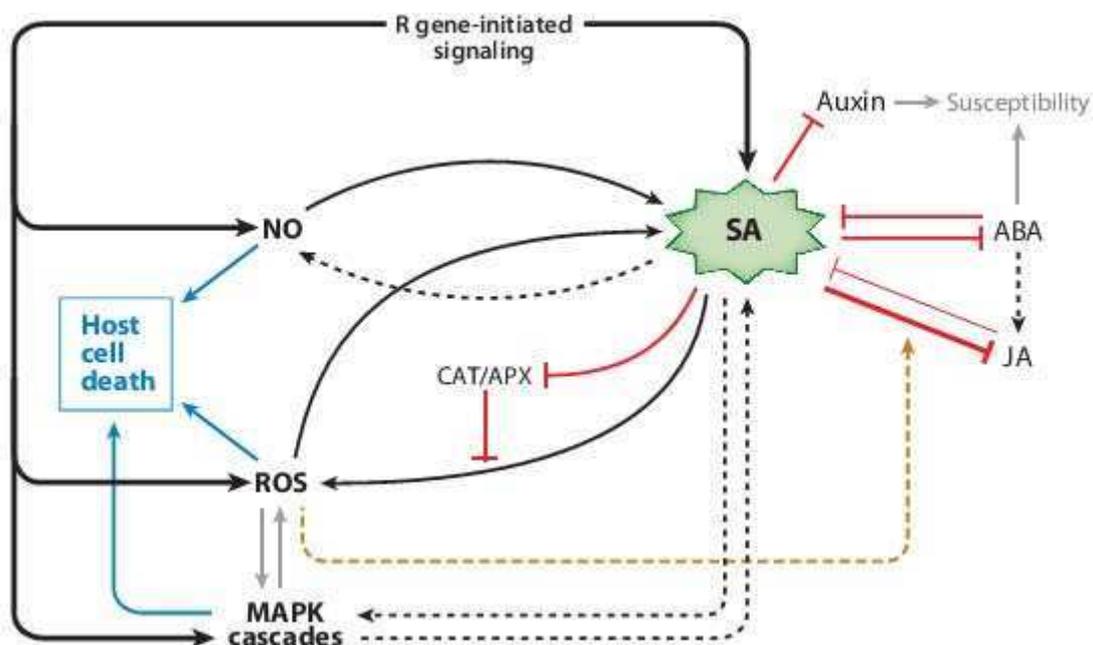
El mecanismo mediante el cual se establece la SAR, así como la naturaleza de la señal que viaja por el floema a tejidos aún no infectados, se desconocen. Aunque el SA puede ser transportado por el floema, experimentos de injertos recíprocos usando transgénicas NahG han demostrado que SA no sería la señal traslocada en la planta que confiere SAR, aunque el SA es esencial en el tejido sistémico para el desarrollo de la misma [86]. Por otro lado, las mutantes *sabp2* en tabaco y Arabidopsis, que no pueden convertir el metil-SA en SA, tienen el establecimiento de SAR comprometido. Esto llevó a postular que el metil-SA es la señal que viaja por floema luego de la HR, a partir del cual la enzima SABP2 produce SA en tejidos sistémicos, desencadenando SAR [87-88]. La dependencia del establecimiento de la SAR en la percepción del etileno en el tejido inoculado quedó demostrada con la utilización de plantas de tabaco transgénicas *Tetr* (codificantes para un receptor dominante negativo de etileno). Dichas plantas son incapaces de desarrollar SAR y las proteínas PR no son inducidas sistémicamente ante la infección por TMV. La utilización de injertos recíprocos demostró que son necesarios receptores normales de ET en el tejido local infectado, pero no en el sistémico, para que la SAR pueda desarrollarse en tejidos sistémicos [89]. Estos experimentos apuntan también a que es necesaria la síntesis *de novo* de SA en tejidos sistémicos para el establecimiento de SAR, y no su transporte por floema, en coincidencia con reportes previos [86-88]. Otros trabajos apuntan al JA o sus derivados como la señal sistémica que induce SAR. Experimentos con Arabidopsis mutantes sugieren que una molécula lipídica es determinante para el establecimiento del SAR [90]. JA, y no SA, fue encontrado acumulado en el floema cuando Arabidopsis se desafió con una cepa avirulenta de *P. syringae*. Además, la aplicación foliar de JA indujo SAR, mientras que mutantes defectuosos en la vía del JA fueron incapaces de establecerla ([91]). JA podría estar involucrado en etapas tempranas de la respuesta, siendo SA el responsable de eventos más tardíos. Otros trabajos, sin embargo, apuntan a que el JA no es necesario para el establecimiento de SAR, si bien algunas moléculas lipídicas que son sus precursoras sí lo son [92]. En este sentido, un reciente trabajo del

grupo de Klessig [93] ha intentado unificar estos resultados aparentemente contradictorios, al hallar la interconexión de la señalización basada en MeSA y lípidos en *Arabidopsis* y tabaco. Así, para el establecimiento de la SAR serían necesarias al menos dos señales viajando por el floema; el valor adaptativo de este sistema doble vendría dado por la robustez de su redundancia y/o por la capacidad de su uso modular ante interacciones diversas, permitiendo diferenciar, por ejemplo, patogénesis de simbiosis o relaciones mutualistas [47, 93].

#### 4.2.5 –Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Las ROS son especies químicas reactivas de oxígeno formadas por sucesivas reducciones del oxígeno molecular ( $O_2$ ). Las más importantes son el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), las cuales son respuestas comunes al estrés biótico que modifican el estado oxidativo de las células [94]. Las ROS producidas como consecuencia de ataque de patógenos se producen sobre todo en la membrana [73], aunque parece ser importante también la generación de ROS en mitocondria sólo en el caso de defensa antiviral [95]. Las ROS poseen un rol reconocido como señales de defensa, principalmente en los estallidos oxidativos que ocurren temprano en la HR, durante interacciones incompatibles, y que suelen dar como resultado la muerte celular [56]. Por ejemplo, la actividad de NADPH oxidasas, generadoras de  $O_2^{\bullet-}$  (ortólogas a subunidades gp91<sup>phox</sup> de enzimas de macrófagos) se incrementan en la interacción incompatible *N. tabacum*-TMV [73]. Otra fuente conocida de ROS durante el ataque de patógenos son las peroxidasas de pared celular, que pueden activarse mediante la alcalinización del apoplasto debido a la acción de las NADPH oxidasas [96], colaborando en reacciones de reforzamiento de pared celular, aumento de síntesis de taninos, generación de peróxidos lipídicos que actúen como señalizadores o precursores hormonales, etc. Por otro lado, y dado que mutantes antisentido para peroxidasas de pared celular mostraron susceptibilidad aumentada a patógenos, se ha propuesto que éstas son las iniciadoras del ROS apoplástico, y que las NADPH oxidasas amplificarían la señal de ROS inicial [97]. Es bien conocido también el rol que cumplen las ROS en la señalización mediante el  $Ca^{2+}$ : en primer lugar, el estallido oxidativo propicia la movilización de  $Ca^{2+}$  hacia el citosol, tanto desde el apoplasto como desde los reservorios intracelulares, dando como resultado un aumento de la concentración del  $Ca^{2+}$  citosólico. Como las proteínas NADPH oxidasas que producen  $H_2O_2$  poseen dominios citoplasmáticos “EF-hand” de unión a  $Ca^{2+}$ , dan como resultado una retroalimentación positiva de generación de ROS [98]. En segundo lugar, el aumento en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular activa cascadas de señalización por MAP kinasas, dando lugar a cambios transcriptómicos relacionados con defensa. Así, diferentes mecanismos enzimáticos colaboran en generar una compleja red auto-amplificante en respuesta al patógeno. Coherente con estos hallazgos, la inhibición de NADPH oxidasas abolió el estallido oxidativo en plantas de tabaco infectadas con TMV [99]. En el mismo trabajo, se halló que el estallido oxidativo se dispara dentro de segundos de la inoculación de las hojas de tabaco con TMV, e incluso la proteína de la cápside por sí sola es suficiente para efectuarlo, lo que excluye a la replicación viral como requisito. Además, el mismo estudio halló que diferentes combinaciones de

cultivares de tabaco-TMV, dando lugares a interacciones tanto incompatibles como compatibles, provocaban la generación de ROS. Otros ejemplos de aumento de ROS en interacciones planta-virus compatibles pueden ser la reportada para el sistema *Phaseolus vulgaris*-White clover mosaic virus (WCIMV) [100] y el de CaMV infectando *A. thaliana* [101], aunque el hecho de que este aumento en ROS no es universal en interacciones planta-virus compatibles se refleja en el no aumento de ROS en el patosistema CMV-tabaco [99], mostrando especificidad en las respuestas. Es probable que las ROS interactúen e influyen otras vías de señalización comunes, como las de SA y JA. Algunos trabajos sugieren que la activación de ROS es anterior a la del SA (ej.: [79]) y hay indicios de que es independiente de ella pero no de etileno [101], al menos para algunos patosistemas. En realidad, la relación entre SA y las ROS es compleja, y mucho se ha escrito acerca de cuál de las dos señales está río arriba de la otra; un compromiso que se condice con muchos resultados experimentales indica que ambos tipos de moléculas forman un bucle de retroalimentación positiva [88]. Para resumir, ésta y otras relaciones se esquematizan en la Figura 1.18.



**Figura 1.18.** SA en relación a otras señales de defensa. Flechas indican activación, líneas rojas, represión. Líneas de puntos representan relaciones menos comprendidas, o hipotéticas. ABA, ácido abscísico; APX, ascorbato peroxidasa; CAT, catalasa; JA, ácido jasmónico; MAPK, proteína quinasa activada por mitógeno; NO, óxido nítrico; ROS, especies reactivas de oxígeno; SA, ácido salicílico. Tomado de [88].

### 4.3 –Silenciamiento de RNA

El silenciamiento de RNA describe la reducción de la expresión génica mediado por RNAs pequeños (siRNAs) que poseen alta homología de secuencia con el RNA blanco del silenciamiento. Esta reducción se da por mecanismos altamente conservados entre los reinos de eucariotas. El silenciamiento de RNA fue observado por primera vez en experimentos que tenían por objeto la sobreexpresión del gen de chalcona sintasa en petunias para inducir cambios en la pigmentación [102-103].

Posteriormente, el fenómeno fue descubierto también en algas, hongos y animales (resumido en [104]). Luego de más de una década de estudio de los mecanismos de silenciamiento antiviral en plantas, se ha acumulado una gran cantidad de conocimiento acerca del mecanismo, así como de los factores tanto del huésped como del virus que pueden afectarlo. En adelante, me referiré principalmente a los mecanismos relevantes ante infecciones de virus de ssRNA(+), por ser los más comunes en plantas y los utilizados en esta Tesis.

#### **4.3.1 –Mecanismos de activación del silenciamiento de RNA viral**

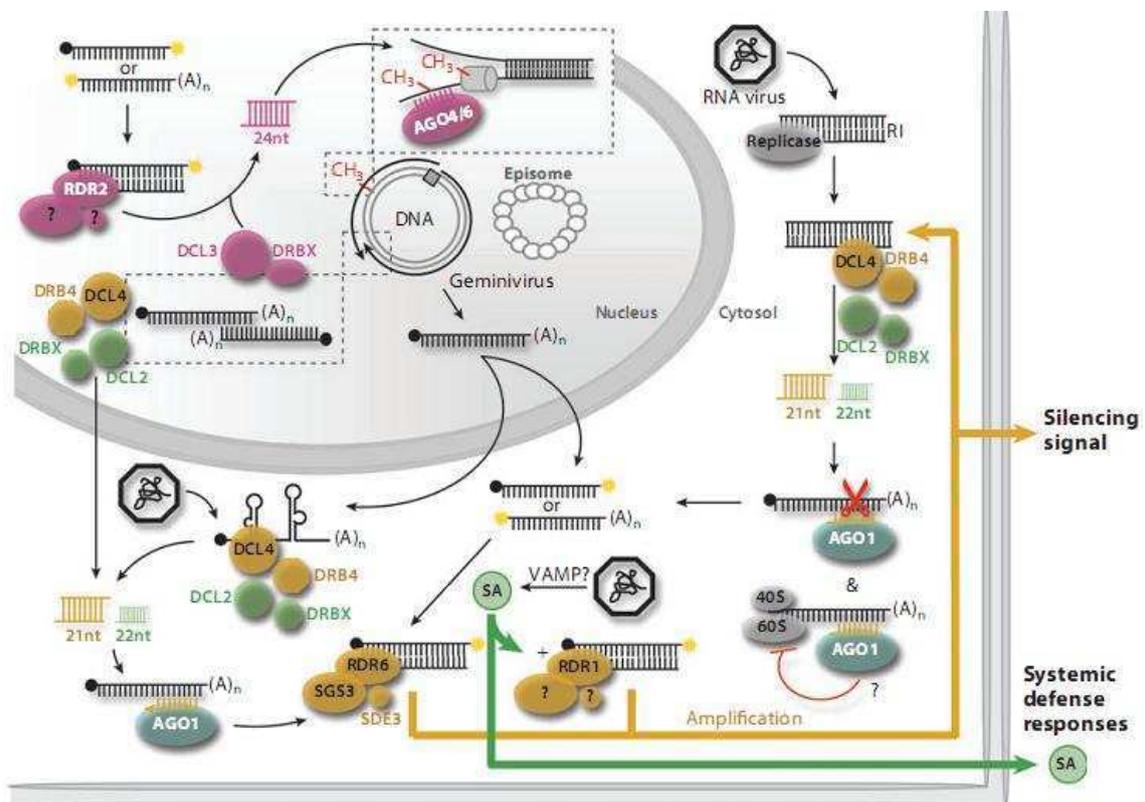
Hasta principios de la década de 1990 se pensaba que la resistencia a virus de plantas sólo podía darse de manera predeterminada genéticamente, y se habían logrado plantas transgénicas resistentes a virus por expresión de la CP [105]. Sin embargo, experimentos pioneros demostraron que la transgénesis de plantas con secuencias de RNA viral modificadas de modo que no pudieran codificar para proteínas, o con secuencias de RNA viral antisentido, también podían originar protección antiviral [106-107]. Se observó que esta resistencia no sólo no dependía de la presencia de proteínas virales, sino que era altamente específica, al contrario que la protección mediada por CP, que suele otorgar un rango de resistencia heteróloga. Además, la necesidad de formación de dsRNA quedó demostrada ante el eficaz silenciamiento provocado por la introducción de transgenes que expresaban un RNA viral con complementariedad interna, capaz de formar estructuras de horquilla, elevando aún más el nivel de resistencia exhibido por las transgénicas [108]. Las estructuras secundarias intramoleculares complejas, se revelarían clave en el desencadenado de silenciamiento antiviral que se produce de manera natural en plantas. La mayoría de los virus de plantas poseen genoma ssRNA(+), que replican mediante intermediarios de doble cadena de RNA (dsRNA). Esto llevó a pensar en un principio que esta estructura podía ser el blanco de la maquinaria de silenciamiento antiviral de las plantas; sin embargo, el dsRNA viral está protegido por los complejos de replicación, y el dsRNA se desarma rápidamente por acción de helicasas del virus o del huésped. Incluso en etapas de movimiento o encapsidación, diferentes proteínas virales protegen al menos parcialmente al RNA viral. Otra posible fuente de siRNAs derivados de virus (vsiRNAs) es el ssRNA(+), que forma estructura secundaria compleja y parcialmente doble catenaria, la que es reconocida por las RNasas (DCLs) y cortada para formar vsiRNAs. Esto se deduce de experimentos en los cuales se demostró que la generación de vsiRNAs no siempre se produce de manera homogénea a lo largo del genoma viral, sino que puede haber una marcada presencia de vsiRNAs procedentes de “regiones calientes”, sugiriendo la importancia de las zonas altamente estructuradas de simple cadena de los virus para disparar PTGS [109-111]. Para varios virus ssRNA(+) (incluyendo TMV), se vio por secuenciación que la mayor parte de los vsiRNAs derivados se generan asimétricamente, siendo alrededor del 80% derivados de la cadena positiva del RNA [109-110, 112-114]. Teniendo en cuenta el gran exceso de cadena positiva sobre la negativa en infecciones con virus ssRNA(+) (a veces de 20-100 veces [115]), en los cuales la cadena negativa de RNA sirve de molde para producir mucho RNA de cadena positiva, adaptativamente tiene sentido para la planta apuntar

a la eliminación de la cadena negativa, que es limitante. Se cree que la cadena de RNA(-) permanece siempre unida al complejo de replicación, unida a factores proteicos virales y del huésped, mientras el RNA(+) producido se libera al citosol [116]. Dicho esto, es importante notar que no todos los virus producen vsiRNAs de manera asimétrica: TuMV origina proporciones casi iguales de vsiRNAs de ambas cadenas, por lo que se cree que en su caso dichos vsiRNAs provienen del corte de dúplex de dsRNA [111, 113, 117-118]. El caso de TRV parece intermedio: TRV es un virus ssRNA(+) de genoma bipartito, en el cual el RNA1 origina vsiRNAs de ambas polaridades en similar proporción, mientras que el RNA2 origina vsiRNAs mayoritariamente de la cadena positiva [119]. Estudiando varios patosistemas, se ha visto que suelen predominar los vsiRNAs generados de la cadena positiva, aunque varios virus originan vsiRNAs de ambas cadenas en similar proporción [111]. Las razones de estas diferencias aún se desconocen.

#### **4.3.2 –Biogénesis y modo de acción de los vsiRNAs**

La Figura 1.19 resume los principales acontecimientos moleculares que conducen al silenciamiento antiviral en Arabidopsis. Después de invadir la célula huésped, el RNA viral puede ser reconocido por la maquinaria de silenciamiento endógena de la planta a través de su estructura secundaria de simple cadena, de la doble cadena generada por las RdRps del virus (intermediarios de replicación, RIs), o por la presencia de RNA aberrante (abRNA), falta de cap o poli(A) [120]. En Arabidopsis, el dsRNA viral es cortado en vsiRNAs por proteínas con actividad RNasa III llamadas Dicer (DCLs). De las 4 DCLs descritas para *Arabidopsis thaliana*, DCL4 (principalmente) y DCL2 se encargan de esta actividad catalítica en silenciamiento contra virus ssRNA(+) [121], originando fragmentos de 21 y 22 nt, respectivamente. Ante la supresión de actividad de DCL4 por factores virales, DCL2 pasa a generar la mayoría de los vsiRNAs; sin embargo se ha visto, al menos para algunos patosistemas, que estos vsiRNAs de 22 nt tienen mucha menos eficacia en su actividad antiviral [122-123]. Las DCLs son ayudadas en su actividad por proteínas HYL1 y varias DRBs. Luego del corte, que deja 2 nt protruyentes, la metilasa HEN1 agrega grupos metilo en los extremos 3' protruyentes de ambas cadenas, estabilizando y evitando oligouridilación de los vsiRNAs [124]. Estos son llamados vsiRNAs primarios, originados directamente de las cadenas de RNA virales. Una cadena se selecciona y se une a proteínas de la familia Argonauta (AGO). De las 10 AGOs identificadas en Arabidopsis, AGO1, 2 y 7 tienen función antiviral conocida [125]. El complejo de AGO cargado con la cadena de vsiRNA primario forma el complejo multiproteico RISC. Como AGO contiene dominios con actividad endonucleolítica de RNasa H [126], puede cortar las cadenas virales complementarias a las cuales se une el complejo ribonucleoproteico RISC en su escaneo por el citoplasma (RISC puede también determinar inhibición de la traducción y, en el caso de genes endógenos, metilación de DNA [127]). A su vez, las cadenas de RNA viral reconocidas por RISC y cortadas, generan abRNA que es sustrato de RNA polimerasas dependientes de RNA (RDRs) del huésped [128]. De las RDRs conocidas en Arabidopsis que actúan ante virus, son importantes RDR1, RDR2 y RDR6, siendo RDR1 inducida por SA y ante ataque de patógenos [118, 129]. Estas enzimas generan dsRNA,

el cual a su vez vuelve a ser detectado por las DCLs, que sintetizan así vsiRNAs secundarios, es decir, originados de la actividad de amplificación del huésped. Este mecanismo produce una amplificación de la señal de silenciamiento y vsiRNAs afectando una zona del genoma viral más extensa que la inicial (transitividad) [130], cubriendo todo el genoma [111]. Incluso, se ha indicado que vsiRNAs pueden ser responsables de parte de los síntomas virales, al complementarse con algunos mRNAs del huésped [131]. Los vsiRNAs pueden moverse vía plasmodesmos y por el floema hacia otras células [132]. Esto genera resistencia sistémica, ya que estas señales pueden viajar por delante del virus [127]. Este mecanismo, que depende de los vsiRNAs de 21 nt generados por DCL4 [133], constituye el componente sistémico del silenciamiento antiviral. Dicho componente sistémico depende de integrantes de la maquinaria de silenciamiento que son parcialmente diferentes de los responsables del silenciamiento local, al menos en algunos patosistemas [118]. Un resumen de lo expuesto puede verse en la Figura 1.19.



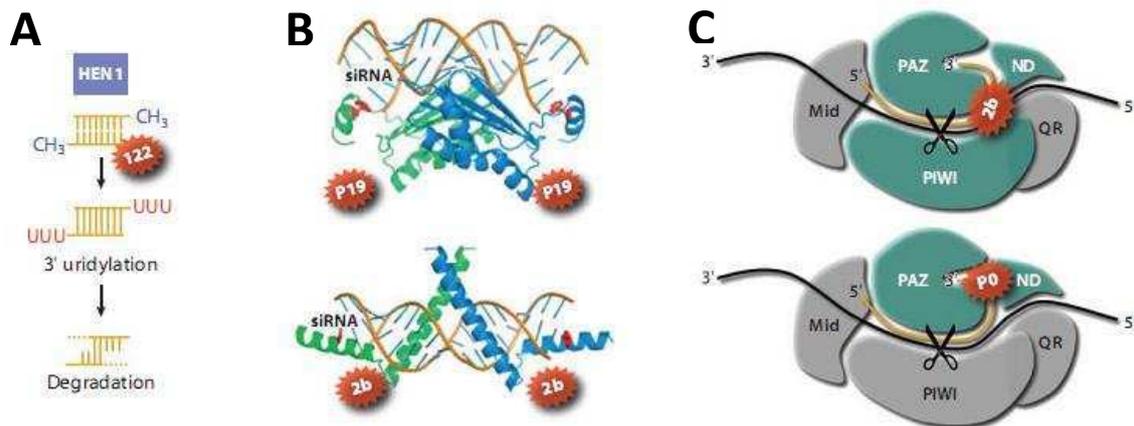
**Figura 1.19.** Silenciamiento antiviral en Arabidopsis. Se muestra el silenciamiento de virus de DNA y de RNA, aunque sólo estos últimos son de interés en esta Tesis. DCL4 actúa primariamente sobre dsRNA, originado sobre todo por apareamiento intramolecular de la cadena de ssRNA(+), pero también a partir de intermediarios de replicación (RIs), generados ya sea por acción de las RdRps virales (en gris) o RDRs del huésped que forman dsRNA a partir de RNAs virales sin cap o poli(A) (abRNAs). Las RDRs originan vsiRNAs secundarios, con transitividad. RDRs con función antiviral son sobre todo la RDR6, pero también la RDR1, activada por SA. Éste es producido por la posible detección de patrones moleculares asociados a virus (VAMPs), por ejemplo dominios de replicasa conservados [127]. Si DCL4 es suprimida por un VSR, DCL2 la sustituye, y la producción de dúplex de vsiRNAs pasa de 21 nt a 22 nt, lo cual tiene un efecto decremental en la actividad antiviral de la señal. AGO1 y otras AGO son las encargadas de cargar una hebra en RISC y efectuar el corte de hebras de RNA complementarias. SA y vsiRNAs de 21 nt se mueven sistémicamente, inmunizando tejidos en avance del virus. DRB, dsRNA binding; SGS, SUPPRESSOR OF GENE SILENCING; SDE, SILENCING DEFECTIVE; RI, replication intermediate. Tomado de [127]

### 4.3.3 –Supresores virales del silenciamiento

Ante la presión de selección impuesta por la planta huésped con su maquinaria de silenciamiento, los virus han adquirido evolutivamente factores proteicos que funcionan como supresores del silenciamiento de RNA. Al contrario que el mecanismo de silenciamiento, que está conservado evolutivamente no sólo en plantas sino entre reinos eucariotas, las proteínas virales supresoras del silenciamiento (VSRs) han evolucionado independientemente en diferentes linajes virales. En consecuencia poseen gran diversidad de secuencia y estructural, así como también otros roles biológicos como la replicación, movimiento y encapsidación [125]. Los mecanismos de acción de los VSRs pueden ser [125]:

- a) *Unirse a cadenas largas de dsRNA, inhibiendo así su procesamiento por DCL4.*
- b) *Unirse a dúplex de vsiRNAs, interfiriendo de este modo con el ensamblado de RISC y el movimiento sistémico.*
- c) *Degradar vsiRNAs.*
- d) *Marcar a AGO1 para degradación.*
- e) *Unirse e inactivar a AGO1 y RISC.*

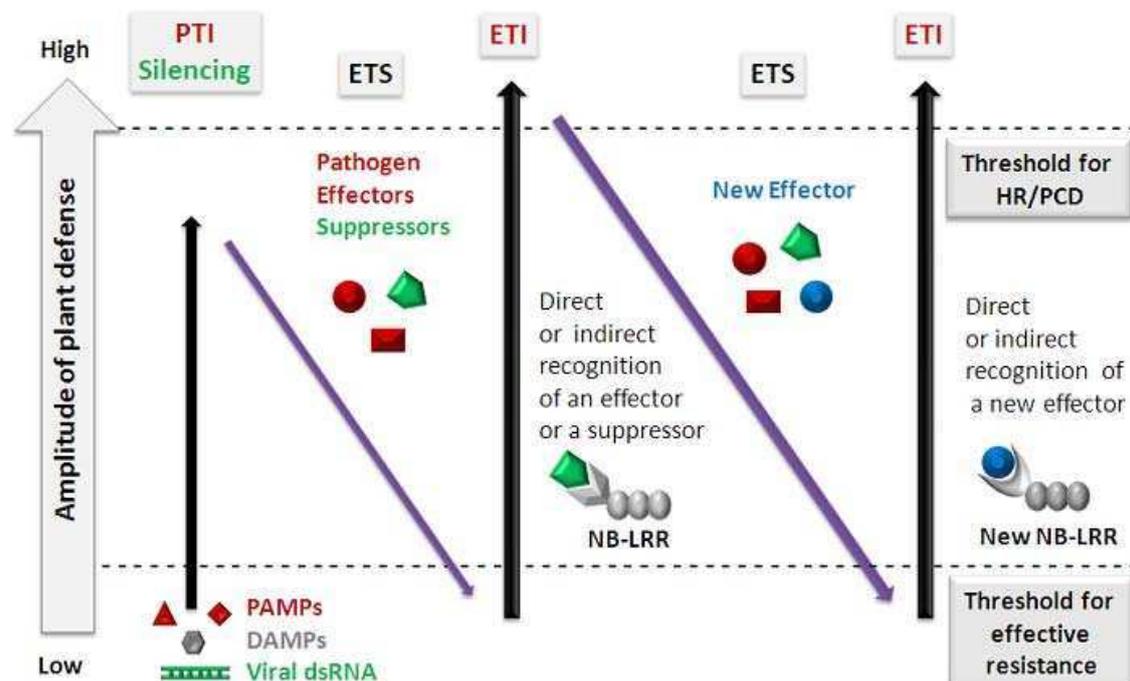
El nivel de acción de cada VSR y su impacto en el mecanismo de silenciamiento pueden ejemplificarse con el supresor p19 de CymRSV. En un estudio de *High-Throughput Sequencing* (HTS) reciente utilizando varios patosistemas, se vio que CymRSV, al contrario que el resto de los virus analizados, origina vsiRNAs de 22 nt, y no de 21 nt. Esto puede ser consecuencia de la actividad de p19, al secuestrar preferencialmente vsiRNAs de 21 nt o bloquear DCL4, con lo que DCL2 pasa a producir la mayoría de los vsiRNAs [111]. Otra muestra del poder supresor de una VSR es la proteína HC-Pro de Potyvirus, evidenciada por la incapacidad de TuMV mutantes para esta VSR de infectar [118]. Se sabe que HC-Pro interfiere con la resistencia a virus y otros patógenos mediada por SA [134]; a la vez, se ha hipotetizado que diferentes sensibilidades de RDR1 y RDR6 a HC-Pro serían responsables de que en mutantes *rdr1* se acumulen menos vsiRNAs que en mutantes *rdr2* o *rdr6*. Siendo RDR1, pero no RDR6, sensible a SA, las vías de acción de estas enzimas podrían estar diferencialmente alteradas por HC-Pro [118]. En resumen, los diversos supresores pueden actuar interfiriendo en uno o más pasos de la vía del silenciamiento antiviral. Ejemplos se ven en la Figura 1.20.



**Figura 1.20.** Algunos supresores de silenciamiento de RNA viral (VSRs) de virus de RNA. (A) Bloqueo de la función de HUA ENHANCER 1 (HEN1) mediado por P122, lo que origina uridilación y degradación de vsiRNAs. (B) Arriba: P19 actúa como pinza de vsiRNAs uniendo específicamente los de 21 nt. Abajo: el supresor 2b une vsiRNAs y dsRNAs más largos. (C) 2b y P0 inhiben la actividad de ARGONAUTE1 (AGO1) a través de interacción con sus dominios PAZ, PIWI y ND (2b) o PAZ y ND (P0). Tomado de [127].

#### 4.3.4 –Inmunidad innata, silenciamiento de RNA y supresores del silenciamiento

Muchos supresores del silenciamiento poseen otras funciones, como ser proteínas de la cápside, movimiento, helicasas, etc, y poseen además la capacidad de ser Avr reconocidas por la planta. El número de proteínas NB-LRR de Arabidopsis es limitado (cerca de 160) y por ende muy inferior al potencial número de efectores patogénicos existentes. Al ser comunes muchas veces las respuestas desencadenadas por patógenos que necesariamente poseen efectores muy alejados evolutivamente entre sí, ha sido sugerido que muchas veces estas proteínas reconocen algunos factores del huésped modificados (teoría de la guarda). Esta teoría ha recibido recientemente apoyo experimental importante [135]. Al poner en contexto la respuesta antiviral de silenciamiento de RNA con otros mecanismos de defensa ante patógenos de plantas, se puede extender el modelo de zig-zag de co-evolución de factores del huésped y sus patógenos, como se ve en la Figura 1.21.



**Figura 1.21.** Modelo de zig-zag de [32] modificado. En la primera fase, las plantas detectan PAMPs o patrones moleculares indicadores de peligro endógenos modificados (DAMPs) o dsRNA viral. La respuesta es, respectivamente, PTI o silenciamiento, obteniéndose resistencia. En la fase 2, efectores proteicos del patógeno o, en el caso de virus, VSRs, producen quiebre de la resistencia (ETS). En la fase 3, estos efectores o VSRs son reconocidos directa o indirectamente por proteínas citoplasmáticas NB-LRR y desencadenan ETI. En la fase 4, el patógeno evoluciona hacia proteínas efectoras o VSRs nuevas, las cuales otorgan ETS hasta que una nueva variante de NB-LRR se seleccione en la planta y sea capaz de reconocerla. Tomado de [125].

## 5 – Los microRNAs y sus múltiples funciones en plantas

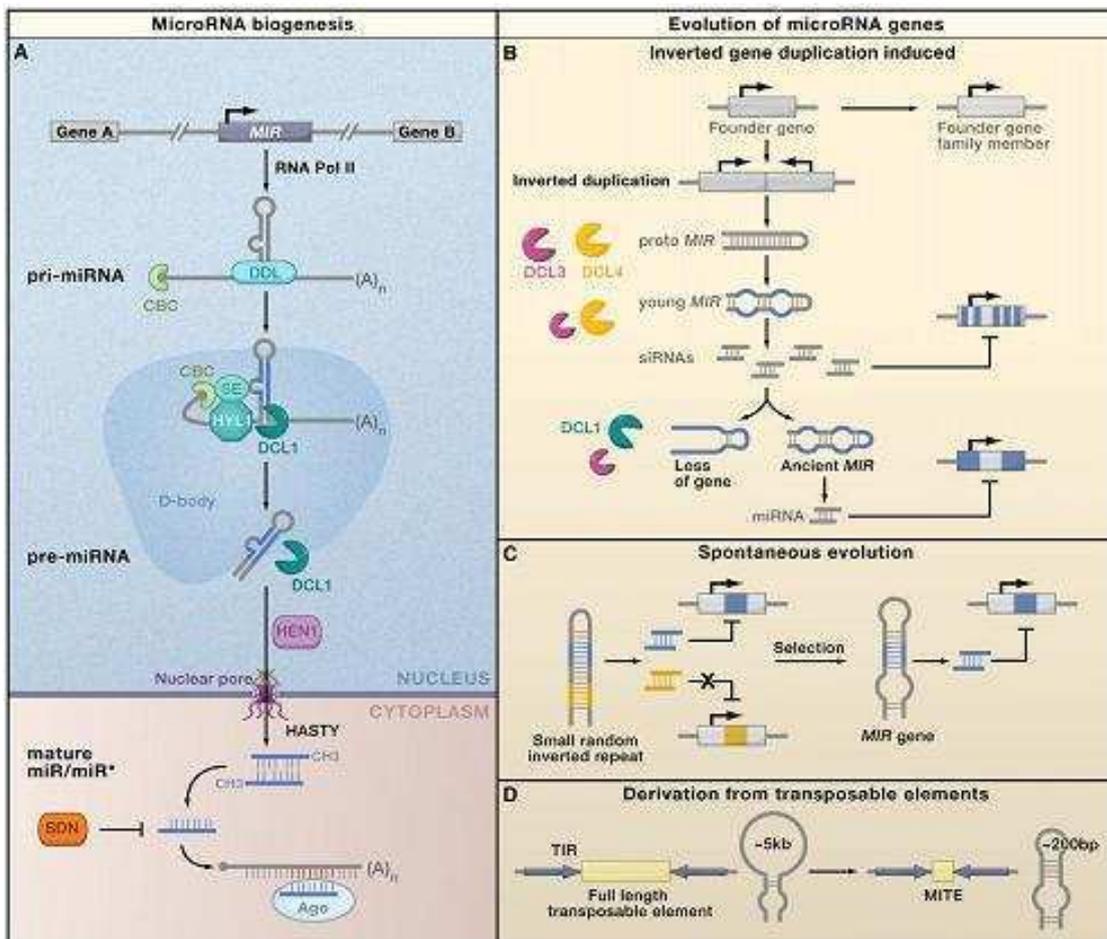
### 5.1 –Características generales

Los microRNAs (miRs) son moléculas de RNA pequeñas endógenas, mayoritariamente de 21 nt de longitud, que cumplen un rol de reguladores negativos de la expresión génica. Desde su descubrimiento en el gusano *Caenorhabditis elegans* [136], se los ha encontrado presentes en la mayoría de los grupos eucariotas [137] incluyendo algas unicelulares [138] e incluso en virus animales [139]. Si bien no han sido hallados miRs comunes entre plantas y animales, se cree que una vía primitiva de silenciamiento génico ancestral derivó en las rutas actuales en ambos grupos, cuya maquinaria enzimática guarda amplias similitudes. Los miRs son reguladores negativos de la expresión génica y actúan al nivel de inhibición de la transcripción de genes endógenos blanco (mecanismo conocido como TGS), o bien a nivel post-transcripcional, induciendo la represión de la traducción de sus moléculas de mRNA blanco o catalizando su corte (mecanismos de PTGS) [140].

## 5.2 –Evolución de genes miRs

En plantas, los genes miR están dispersos a lo largo de todo el genoma y, a diferencia de lo que suele observarse en animales, no están mayoritariamente en intrones sino en zonas intergénicas [141]. De los más de mil genes miR hallados en plantas, alrededor de 100 familias poseen integrantes altamente conservados, de origen ancestral, que poseen como blanco factores de transcripción que regulan procesos celulares básicos, muy conservados [142-143]. Como ejemplo extremo de conservación, puede mencionarse el caso del miR160. Posee varios parálogos en *Arabidopsis* y se encuentra en otras especies de plantas, incluyendo los musgos. La conservación de este miR es impresionante, siendo idéntica la secuencia de algunos de sus ortólogos entre plantas alejadas cientos de millones de años evolutivamente entre sí. Sus genes blanco, algunos factores de transcripción ARF, muestran un alto grado de conservación, especialmente en la zona complementaria al miR maduro [137]. Muchas de estas familias de miRs se expandieron mediante duplicaciones genómicas, y en consecuencia poseen varias copias y suelen estar altamente expresados. La existencia de varios parálogos de una familia de miRs con secuencia madura en ocasiones idéntica, plantea la cuestión de si su función es redundante o no. Estudios realizados con mutantes de miR164a, b y c demostraron roles en algunos casos solapantes y en otros, exclusivos, entre estos parálogos en *Arabidopsis* [144-146]. La supuesta redundancia entre parálogos podría reflejar en parte el hecho de que ciertos *loci* se activan en condiciones que no son frecuentes en el laboratorio [137]. Por el contrario, miRs pertenecientes a familias pequeñas parecen haberse originado por separado en diferentes linajes de plantas y típicamente se encuentran representados por un solo *locus* genómico. Estos serían miRs “jóvenes”, siendo cada uno característico de algunos grupos de plantas en particular. A diferencia de los miRs más conservados, poseen como blanco genes menos conservados y de más amplio rango de funciones [137, 147]. La posibilidad de utilizar técnicas de HTS para analizar el transcriptoma de RNA pequeños comparados de *A. thaliana* y *A. lyrata* permitió observar diferencias interesantes entre los miRs ancestrales, más conservados (MC), y los menos conservados (LC), propios de *Brassicaceae*. LC miRs son más frecuentemente expresados en sólo una de las dos especies, mientras que los MC miRs, como era de esperar, se expresan en ambas especies. La expresión de MC miRs es en promedio varios órdenes de magnitud mayor que en LC miRs, los cuales están casi todos codificados por un solo *locus* genómico. LC miRs presentan además una mayor proporción de miRs maduros de 22 nt y presentan una tasa de sustitución nucleotídica más alta que las familias de miRs altamente conservadas en plantas. Los genes blanco de LC miRs tienen mayor tendencia a ser especie-específicos y a perder complementariedad con sus miRs jóvenes regulatorios [148]. El análisis comparativo de transcriptomas de *A. thaliana* y *A. lyrata* indica que un origen frecuente de los miRs es la duplicación invertida de *loci* codificantes para exones [149], aunque otros mecanismos evolutivos han sido propuestos (Figura 1.22B-D). Estos miRs jóvenes, expresados en bajas cantidades, seguirían en muchos casos deriva génica más fácilmente que miRs ancianos, perdiendo frecuentemente complementariedad con sus blancos, y en última instancia, funcionalidad. Tomados en su conjunto, los datos

sugieren un conjunto básico de miRs ancianos y conservados junto con un constante proceso de nacimiento y muerte de nuevos miRs [141, 150].



**Figura 1.22.** Biogénesis y evolución de genes miR. (A) Biogénesis. Los miRs de plantas son transcritos por la RNA polimerasa II (RNA Pol II) en regiones mayormente intergénicas. Se origina un transcripto de largo variable, el pri-miRNA, el cual está estabilizado por la poliadenilación, el cap en 5' y las proteínas CBC (de unión al cap) y DDL. En inclusiones nucleares específicas (D-bodies) el pri-miR se procesa por DCL1, con la ayuda de SERRATA1 (SE1) y HYL1 (también conocida como DRB1), originando pre-miRNAs. Luego del corte del miR maduro y su secuencia complementaria dentro del loop (el miR\*), la metilasa HEN1 estabiliza el dúplex miR/miR\*, evitando su degradación por exonucleasas SDN. El dúplex es exportado al citoplasma presumiblemente mediante el paso por poros nucleares a través de HASTY. MiRs son cargados en AGO1, del complejo RISC, desplazándose la cadena miR\* y quedando el complejo activado con la cadena guía miR, capaz de actuar sobre mRNAs blanco. (B) Evolución de un miR joven a partir de un evento de duplicación invertida. Luego de la duplicación, el apareamiento interno perfecto es cortado preferentemente por DCL3 y 4, generando una población de siRNAs que pueden tener diversos genes blanco, entre ellos, el gen que dio origen a la duplicación. Bajo selección de los siRNAs y luego de acumular mutaciones en la estructura, el proto-miR evoluciona a una estructura secundaria reconocida por DCL1. El blanco evoluciona también, conservando su secuencia blanco. (C) Evolución de genes miR por inversión al azar de secuencias genómicas. Los siRNAs generados pueden ser seleccionados positivamente (azul) o negativamente (amarillo) al complementar secuencias blanco fortuitas. (D) Evolución de genes miR a través de elementos transponibles. Las secuencias invertidas repetitivas terminales flanqueantes de los transposones pueden generar una estructura conocida como MITE, que al transcribirse pueden ser sustrato de generación de siRNAs. Así, se abre la posibilidad de complementariedad fortuita con genes blanco, y presión de selección hacia estructuras secundarias reconocidas por DCL1, generando un miR nuevo (Tomado de [140]).

### 5.3 –Biogénesis de miRs

#### 5.3.1 –Transcripción y procesamiento de pri- y pre-miRs

Como se mencionó anteriormente, los genes miRs en plantas están dispersos por el genoma y mayoritariamente ubicados en zonas intergénicas [141]. La necesidad de poliadenilación en 3' y adición de caperuza en 5' para la estabilidad de los pri-miRs (el transcripto primario de longitud variable que da origen, luego de varios pasos enzimáticos, a un miR maduro) es una fuerte evidencia indicativa de la transcripción de los genes miR por la RNA polimerasa II [151]. Por esta razón, se buscaron más elementos comunes entre los transcritos codificantes y los pri-miRs. Se halló que las proteínas de unión a caperuza (CBPs), necesarias para la estabilidad de los mRNAs, también se necesitan para estabilizar los pri-miRs [152]. En plantas, los miRs maduros se forman en el núcleo luego de varios pasos de procesamiento [153]. El pri-miR forma una estructura secundaria característica de longitud variable que es necesaria para su reconocimiento. La proteína de unión a RNA DDL estabiliza el pri-miR (se ha visto que mutantes *ddl* acumulan mucha menor cantidad del mismo) y podría funcionar como reclutadora de DCL1 [154]. La maduración de miRs a partir de sus precursores ocurre en estructuras nucleares localizadas llamadas D-bodies [155] (Figura 1.22A). Aquí, el pri-miR es procesado primero por RNAsas de tipo III, para dar un precursor (pre-miR) más corto, de alrededor de 70-150 bases. Esta estructura es posteriormente procesada por dichas RNAsas de tipo III. Existen varias proteínas involucradas en la biogénesis de los miRs maduros en los D-bodies. DCL1 es la RNAsa de tipo III responsable del corte por etapas del pri-miR [153, 156-157]; para algunos pri-miRs excepcionalmente largos, hasta cuatro eventos de corte son necesarios [158]. Sin embargo DCL1 por sí sola es muy ineficiente en originar los miRs de 21 nt característicos [159]. Estudios in vitro demostraron que las proteínas de unión a RNA HYL1 (de aquí en más denominada DRB1) y SERRATA aumentan significativamente la precisión y la velocidad de generación de miRs maduros a partir de los precursores [159]. De hecho, los pri-miRs son reclutados a los D-bodies, en donde son procesados por DCL1, con la ayuda de DRB1, SERRATA y DDL (con las cuales interactúa físicamente) [155] (Figura 1.22A). Las interacciones RNA-proteína en estos complejos nucleares de procesamiento, parece ser compleja: se ha visto que SERRATA posee múltiples dominios que le permiten hacer las veces de “andamio molecular” para la unión tanto a DCL1, DRB1 y el pri-miR, necesario para el procesamiento correcto [160]. Recientemente se ha visto que la interacción entre DCL1 y DRB1 y otras DRBs es importante para el procesamiento de pri-miRs y en consecuencia para determinar el nivel de acumulación de miRs maduros y de sus genes blanco en el meristema [161]. El uso de mutantes ha demostrado que CBC y SERRATA cumplen roles duales, ya que por un lado favorecen el procesamiento del pri-miR, pero por el otro, son importantes en splicing [140].

### **5.3.2 –Modificaciones finales y maduración de miRs**

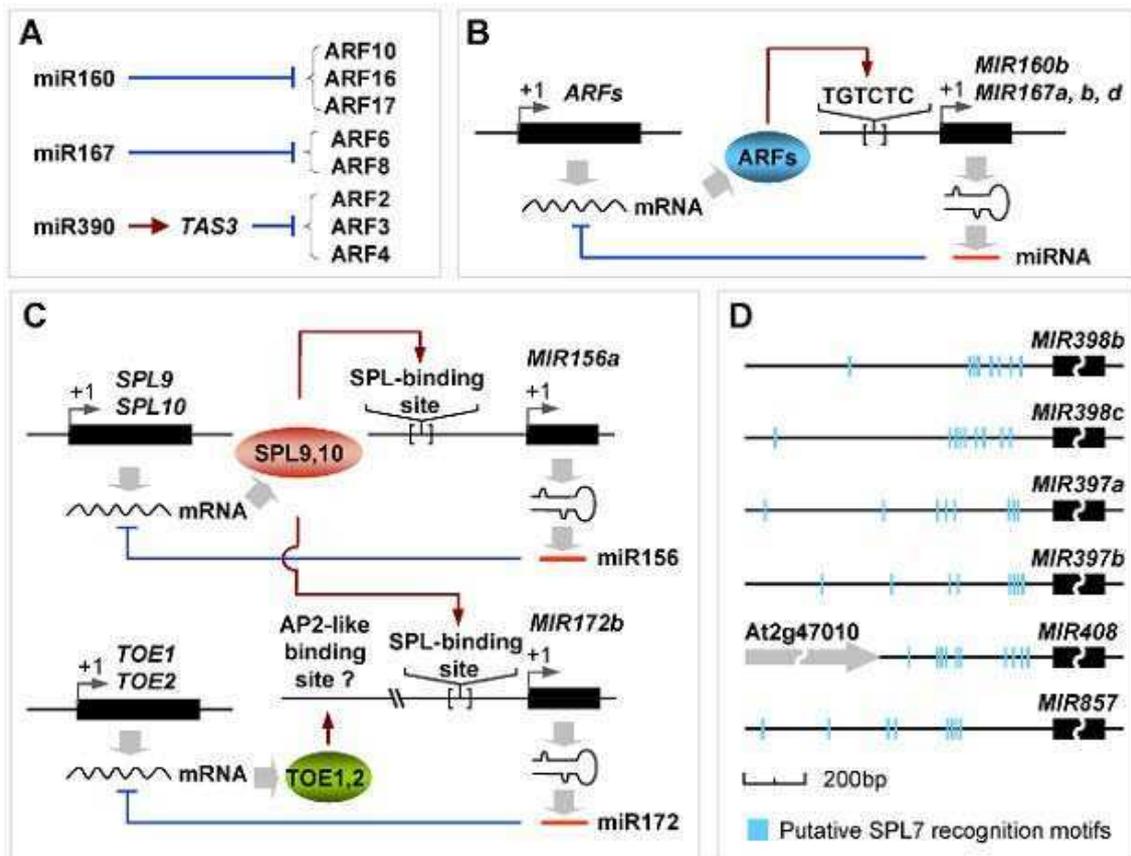
Luego de las rondas de corte, el resultado final es la generación de un dúplex de RNA de 21 nt que posee 2 nt protruyentes en dirección 3' a cada lado (Figura 1.22A). En plantas, este dúplex miR:miR\* es reconocido por, y sirve de sustrato para, HUA ENHANCER1 (HEN1), la metil-transferasa de RNA pequeños que deposita un grupo metilo en el grupo 2'-hidroxilo del nucleótido 3' terminal de cada una de las cadenas de sRNAs [162]. Se cree que esta metilación en ambas cadenas provee estabilidad al dúplex de RNA, evitando su oligouridilación y posterior degradación [163]. Posteriormente, este dúplex metilado se exporta desde el núcleo hacia el citoplasma. Se sabe poco acerca de este proceso, pero se cree que la proteína HASTY funciona en los poros nucleares dejando pasar el dúplex, del cual se ignora el modo en que lo atraviesa o los factores que lo acompañarían [140]. El paso final de maduración de miRs involucra proteínas de la familia ARGONAUTA (AGO), de las cuales AGO1 es la más importante en este proceso [164]. Del dúplex miR:miR\* AGO1 selecciona casi siempre la cadena guía, mientras que el miR\* suele ser descartado y se piensa que en la mayoría de los casos es degradado, aunque se ha comprobado que puede tener un rol regulatorio del pri-miR al menos en ciertos casos [165]. La manera en que AGO1 selecciona la cadena guía parece estar relacionada con la estabilidad termodinámica de las cadenas del dúplex, siendo la cadena menos estable la seleccionada para incorporarse a AGO1, y con ella, al complejo RISC [164]. Por otro lado, la naturaleza del nucleótido ubicado en 5' es importante en determinar cuál integrante de la familia AGO se unirá a un sRNA. Que AGO1 una preferencialmente cadenas con uracilo en el extremo de 5' es coherente con el hecho de que la mayoría de los miRs maduros poseen este nucleótido en su extremo [163]. AGO1 asociada a miR maduro a su vez forma parte de un complejo multiproteico llamado RISC, el cual posibilita la actividad regulatoria de los miRs [140] (Figura 1.22A). Como es de esperar, plantas mutantes para las proteínas de biogénesis de miRs (que cumplen roles clave en desarrollo, entre otras muchas cosas) poseen fenotipos aberrantes o inviables [140].

### **5.4 –Regulación de síntesis de miRs maduros**

Como ocurre con cualquier otro gen de la planta, los miRs no se expresan de manera homogénea ni constante. La cantidad relativa de miR maduro que existe en una planta depende de varios factores; diferentes tipos de miRs se encuentran acumulados a niveles distintos en una misma planta [166-167]. Los miRs responden a estímulos ambientales tales como estreses de todo tipo, de manera diferenciada [168]. Además, un mismo miR se acumula en cantidades diferentes en distintos tejidos o tipos celulares [169-171], y dichas cantidades suelen variar a lo largo del desarrollo [170, 172], o incluso a lo largo del día [173-174]. Estas finas regulaciones espaciales y temporales indican un rol de la regulación de los genes miR, la cual se da tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional [163].

#### 5.4.1 –Regulación transcripcional de miRs

Una forma fundamental de regulación de la transcripción es la modificación de la cromatina, incluyendo metilación del DNA y acetilación de histonas. Estas marcas epigenéticas actuantes en *cis* han sido vistas tanto río arriba como en el cuerpo de los genes miRs (resumido en [175]). Los genes miRs son transcritos por la RNA polimerasa II (RNA Pol II), como lo son los mRNAs codificantes del genoma [151]. Al igual que éstos, poseen elementos regulatorios actuantes en *cis* y en *trans*. Los esfuerzos por identificar los elementos regulatorios río arriba del sitio del comienzo de la transcripción (TSS) en miRs, han dado como resultado la identificación de secuencias regulatorias conservadas [176-177]. Estos análisis han mostrado, por un lado, que los promotores de miRs guardan similitudes con promotores de genes codificantes para proteínas, como es la presencia de TATA box característica de genes transcritos por RNA Pol II [151] y el elevado contenido de A y T (cerca del 68%) [176-177]. Por otro lado, se han identificado algunas diferencias en secuencias promotoras de miRs respecto de las de genes codificantes para proteínas. La construcción de matrices de pesado posicional (PWMs) de nucleótidos permitió determinar bioinformáticamente que existe en secuencias promotoras de miRs un enriquecimiento de secuencias promotoras blanco de algunos factores de transcripción, relativo a su presencia en genes codificantes de *Arabidopsis* [176-177]. Varios de estos factores de transcripción que se unirían preferencialmente a promotores de miRs son clave en la regulación mediada por hormonas (auxina, ABA y ácido giberélico), confirmando la importancia de los miRs en los procesos de desarrollo y adaptación al ambiente, que dependen de hormonas [176]. Algunos de los mRNAs blanco de miRs son a su vez factores de transcripción involucrados en la expresión de los mismos miRs. Por ejemplo, los factores de transcripción ARF, una familia amplia vinculada a la respuesta a auxinas, son regulados post-transcripcionalmente por miRs de la familia 160, 167 y 390 [164] (Figura 1.23A) y a la vez las secuencias consenso de unión a ARF están sobrerrepresentadas en los promotores de genes miRs [176]. El resultado es una regulación por retroalimentación negativa (Figura 1.23B). Bucles más complejos que involucran más de una familia de miRs y sus respectivos mRNAs blanco están reportados, por ejemplo jugando roles importantes en la regulación de la transición de estadio vegetativo/reproductivo en *Arabidopsis* y en maíz [178] (Figura 1.23C). También hay indicios de autorregulación para varios otros miRs con roles en estrés oxidativo, crecimiento vegetativo, e incluso un bucle de regulación que involucra a SERRATA (proteína esencial en el procesamiento de miRs) como factor regulado por un miR [169]. La respuesta a estrés en la que intervienen miRs de diversas familias puede estar coordinada mediante la existencia de elementos comunes en sus secuencias promotoras, como es el caso de la inducción de miRs de respuesta a deficiencia de cobre por el factor SPL7 (Figura 1.23D).

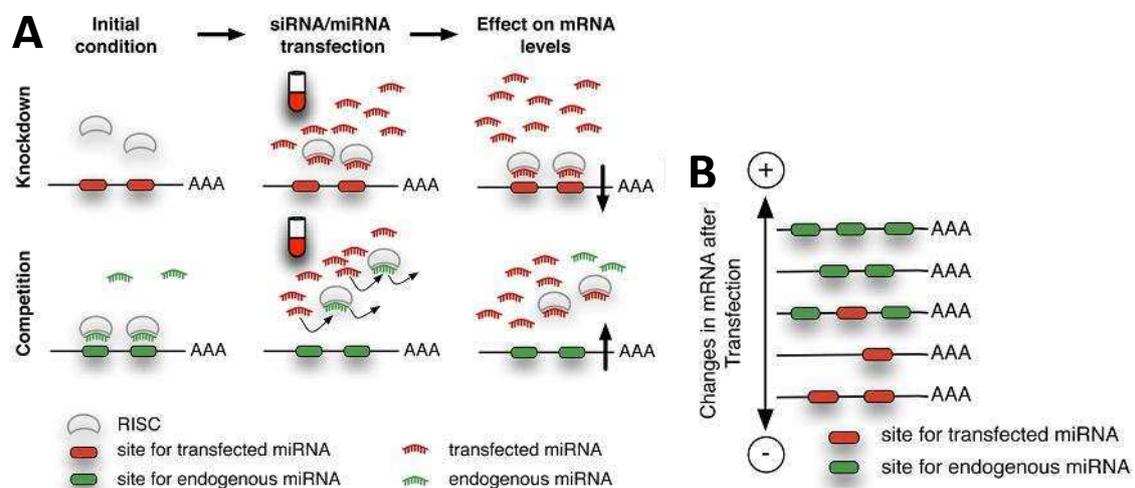


**Figura 1.23.** Regulación transcripcional de miRs en Arabidopsis. A) Algunos integrantes de la familia ARF de factores de transcripción (TFs, por su nombre en inglés) son regulados por miRs 160 y 167 (directamente) o por miR390 (indirectamente, vía la generación previa de ta-siRNAs). B) La predicción bioinformática de sitios múltiples de unión a ARF (TGTCTC) en promotores de miRs de la familia 160 y 167 permite especular con la regulación por retroalimentación negativa de dichos miRs. C) MiRs de la familia 156 tienen a los mRNAs SPL como blancos. SPL es una familia de TFs con 10 integrantes en Arabidopsis; de ellos, SPL9 y 10 son redundantes tanto en activar miR156a (induciendo un bucle de retroalimentación negativa similar a B)) como en activar a miR172b (promotor de la floración). TOE1 y 2 son TFs regulados por miR172 que a su vez tienen sitios de unión predichos al promotor de miR172b. En conjunto, la interacción de estos factores determina que al descender miR156 y avanzar la transición hacia el estadio reproductivo, SPL aumenta, miR172 también y se induce la floración. D) Los sitios de unión predichos de SPL7 a varios promotores de miRs cuya expresión se induce por deficiencia de cobre. En celeste, sitios GTAC predichos de unión de SPL7. Tomado de [163].

#### 5.4.2 –Regulación post-transcripcional de miRs

Luego de la biogénesis del pri-miR, la cantidad de miR maduro funcional puede aún regularse de varios modos [175]. Por ejemplo, el bucle de retroalimentación negativa que forman miR162 y su blanco DCL1 asegura que en caso de exceso de miR maduro, la concentración de mRNA de DCL1 baje, y el procesamiento de los miRs en general disminuya (ya que DCL1 es clave en procesamiento de pri- a pre-miR y de éste a miR maduro). Viceversa, si la cantidad de DCL1 es muy elevada, tenderá a procesar más pre-miRs, generando entre otros, miR162 maduro que devolverá DCL1 a niveles estacionarios [179]. De este modo, afectando el procesamiento de los precursores se regula la cantidad de miR maduro disponible. Otro nivel de regulación del

procesamiento se ha observado usando datos de secuenciación de alto rendimiento del degradoma de *Arabidopsis* y arroz, comprobándose que los pre-miRs presentan señales de ser regulados por los miRs y miRs\* maduros que originan, en un bucle de retroalimentación negativa [165, 180]. Una vez sintetizado el miR maduro, nuevos niveles de regulación aparecen. Se ha propuesto que el mecanismo de edición de RNA podría actuar sobre los miR maduros en plantas (resumido en [175]), con consecuencias en la afinidad por mRNAs blanco. La metilación de miR/miR\* estabiliza e impide la poliuridilación y consiguiente degradación; se ha demostrado competencia por HEN1 entre siRNAs y miRs [181], lo cual puede tener un efecto en la estabilidad de estos últimos si hay exceso de siRNAs. Éste no es el único punto en el cual los siRNAs pueden competir con los miRs, con quienes comparten en extenso la maquinaria celular de metabolismo de sRNAs. En un análisis bioinformático llevado a cabo recopilando los efectos transcriptómicos de la expresión exógena de siRNAs por transfección de células humanas [182] se demostró que la misma induce sobreexpresión de mRNAs que son preferentemente blanco de miRs. Esto lleva a pensar que la acumulación de siRNAs exógenos puede competir con los miRs endógenos por elementos proteicos que son compartidos por las vías de ambos sRNAs (Figura 1.24). Es posible hipotetizar que esta competición pueda estar ocurriendo en plantas, teniendo en cuenta el solapamiento existente entre ambas vías de generación y actuación de siRNAs y miRs jóvenes. Además, se han reportado roles regulatorios de miRs\* en plantas, lo que supone una fuente potencial de competencia adicional [183-184].



**Figura 1.24.** Competición por la maquinaria de sRNAs. A) La transfección de células humanas con siRNAs produce la regulación negativa de mRNAs con sitios complementarios para dichos siRNAs exógenos (sitios rojos), pero genera un efecto de acumulación preferente en mRNAs que poseen sitios blanco de miRNAs endógenos (sitios verdes). La competición por RISC es mostrada en este ejemplo como la causa de este efecto. B) La regulación de los mRNAs endógenos luego de la transfección depende del balance entre la cantidad de sitios exógenos (rojo) y/o endógenos (verde) que eventualmente posea. *Adaptado de [182].*

Incluso una vez formado el miR maduro funcional cargado en el complejo RISC, la regulación post-transcripcional del miR puede tener lugar. El mecanismo de “*target mimicry*” (mimetización del blanco) ha sido descrito primero en el sistema

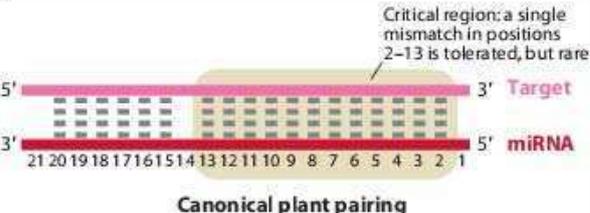
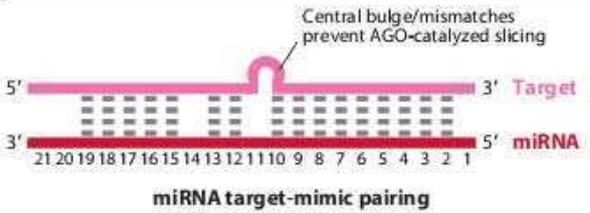
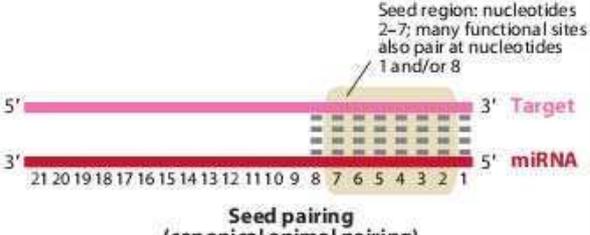
miR399/IPS1 [185]. Dicho mecanismo provoca la estabilización del par miR/mRNA blanco, secuestrando así al miR para su acción de corte e impidiendo su reciclado para actuar sobre otras moléculas blanco. MiR399 se induce por estrés por deficiencia de fosfato, favoreciendo el corte de su blanco PHO2, lo cual aumenta el contenido de fósforo en la planta; IPS1 también se induce por falta de fósforo. El transcripto de IPS1 es no codificante y posee complementariedad con miR399 y se une a él; sin embargo, un *mismatch* entre las posiciones 10-11 del miR impide el corte de IPS1, que actúa así “secuestrando” a miR399 y limitando el corte de PHO2 por éste [185] (Figura 1.26A). La síntesis experimental de otros RNAs con actividad de “*target mimicry*” usando el esqueleto de IPS1 se ha revelado como efectiva para el secuestro de otros miRs [186]. Recientemente, se ha encontrado evidencia que sugiere que este mecanismo de regulación es común para varios miRs (y miRs\*) en varias plantas [180, 187]. Por último, la vida útil de un miR maduro está influenciada por la adición en 3’ de uracilos o adeninas, que afectan su estabilidad negativa o positivamente, respectivamente. Incluso, el grado de complementariedad de miR/mRNA blanco influye sobre la estabilidad del miR (resumido en [175]).

## 5.5 –Modo de acción de miRs en plantas

Una vez cargado en el complejo RISC mediante su unión con AGO, el miR maduro ejerce su rol de regulador negativo de la expresión génica mediante diferentes mecanismos, relacionados con el tipo de interacción física del miR con su mRNA blanco.

### 5.5.1 –Requisitos de complementariedad miR/mRNA

Desde el comienzo de los estudios de miRs en plantas, se observó una alta complementariedad entre los mismos y sus mRNAs blanco, a diferencia de lo que suele ocurrir en animales [188]. A la fecha, se ha comprobado que la mayoría de los pares miR/mRNA poseen alta complementariedad, y si bien el apareamiento perfecto es raro, también lo es que posean más de 5 “*mismatches*” [137] (Figura 1.25). Recientemente, se ha visto no sólo que la guía madura de miR posee un grado de conservación más alto que el miR\*, sino que dentro de la secuencia de miR maduro, la región 5’ es la más conservada, sugiriendo que es la más importante para reconocimiento de mRNAs blanco y/o biogénesis del miR maduro [141]. En caso de existir, los *mismatches* suelen darse en el primer nucleótido de 5’ del miR y hacia la región 3’ del apareamiento (Figura 1.25, arriba). En la mayoría de los casos, los nucleótidos 9 a 11 (contando desde el 5’ del miR) aparean de modo perfecto. Otros tipos de complementariedad son menos frecuentes, por ejemplo cuando involucran la formación de un desapareamiento en la región central (Figura 1.25, medio). La existencia de una complementariedad muy estricta entre las bases 2 y 7 del miR (zona “semilla”), y el resto del emparejamiento siendo muy laxo, como se ha observado en animales, no ha sido reportado en plantas (Figura 1.25, abajo) [137].

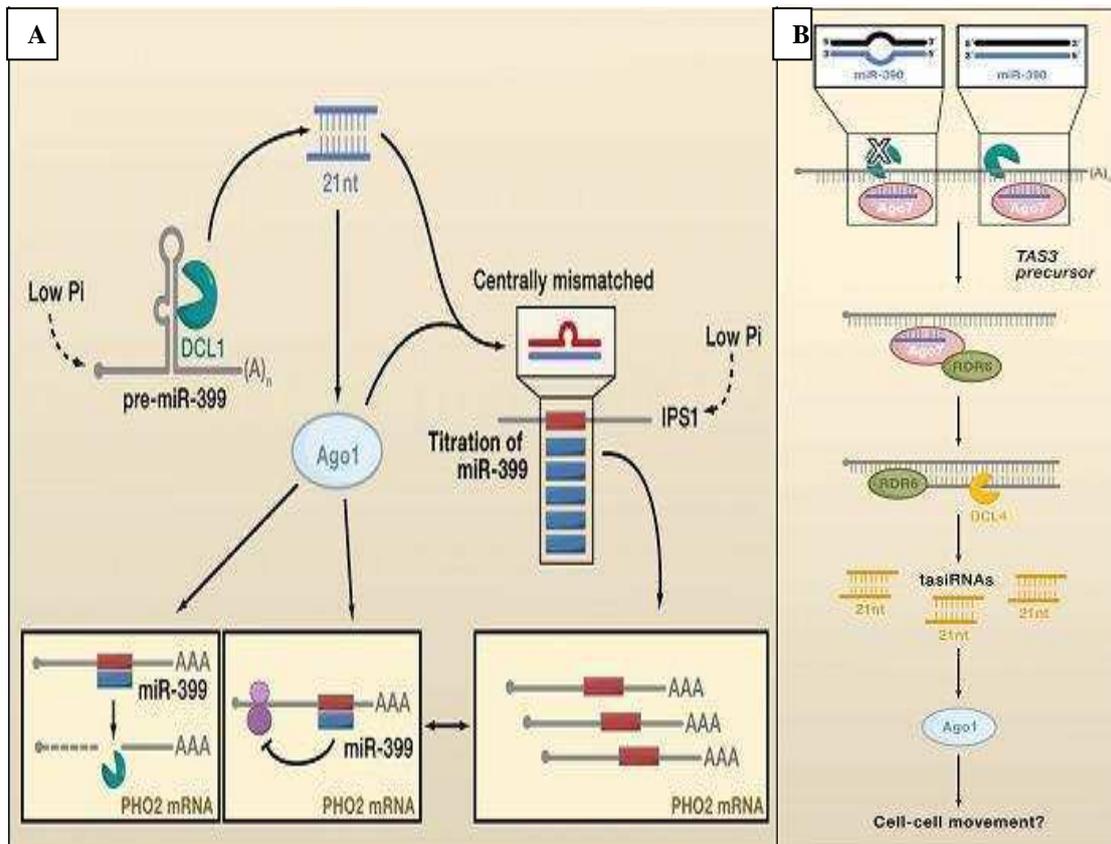
miRNA/target pairing pattern	Prevalence	Mechanisms of target repression
 <p>Canonical plant pairing</p>	Common in plants; very rare in animals	Slicing-dependent (and perhaps slicing-independent) reduction in mRNA accumulation, and/or translational repression
 <p>miRNA target-mimic pairing</p>	A few examples in plants; in animals, seed pairing is used instead	Competition for and sequestration of active AGO-miRNA complexes
 <p>Seed pairing (canonical animal pairing)</p>	No evidence in plants to date; common in animals	Translational repression followed by slicing-independent reduction in mRNA accumulation

**Figura 1.25.** Patrones de complementariedad funcionales entre miR/mRNA blanco comúnmente encontrados en plantas y animales. (Tomado de [137]).

### 5.5.2 –Mecanismos de regulación de mRNAs mediados por miRs

Se han descubierto cuatro resultados básicos posibles a partir de la carga de un miR en el complejo RISC [150]: 1) Desestabilización del mRNA blanco; 2) inhibición de la traducción del mRNA blanco; 3) secuestro del complejo miR/RISC, o 4) producción de siRNAs a partir del mRNA blanco. La actividad catalítica del complejo miR/RISC sobre los mRNA blanco ha sido descrita como un mecanismo ampliamente utilizado en plantas, ocurriendo el corte del mRNA en la región central de la interacción miR/mRNA [189], entre las bases 10 y 11 del miR [137]. Estos resultados han sido generalmente obtenidos mediante la técnica de 5' RACE, la cual permitió identificar el enriquecimiento en fragmentos de mRNA cortados en sitio específico luego del incremento de la acumulación de miRs regulatorios [189]. Sin embargo, 5' RACE es una técnica cualitativa que no permite indicar el grado de corte al que está siendo sometido el mRNA. El hallazgo de que la sobreexpresión del miR172 no disminuye la cantidad de mRNA blanco, pero sí la cantidad de proteína codificada por éste [190], fue un indicio de la existencia en plantas de otro modo posible de regulación mediada por miRs, la inhibición de la traducción. A pesar de los indicios a favor de una regulación de los mRNAs blanco de miR172 mediante inhibición de la traducción, análisis por 5' RACE demostraron que este miR es capaz también de catalizar el corte de dichos mRNAs, y una regulación dual ha sido sugerida para otros miRs [189-191]. La importancia del corte mediado por AGO1, sin embargo, está claramente demostrada por la incapacidad de las mutantes *ago1* de ser rescatadas por un alelo hipomórfico de

AGO1 que es capaz de inhibir la traducción, pero no posee actividad catalítica [192]. Actualmente se cree que muchos miRs pueden actuar mediante una combinación de ambos mecanismos, dependiendo de la distribución espaciotemporal de los mismos y de los factores que podrían influenciar el modo de acción de AGO [137, 140, 150]. Se ha sugerido que el corte, irreversible, sería más común en tejidos en activa diferenciación, mientras que la inhibición de la traducción podría ser un fenómeno transitorio vinculado con, por ejemplo, respuestas a estrés [140]. La unión sin corte de un miR a su blanco puede tener otras funciones en plantas. El mecanismo de “*target mimicry*” antes descrito es un ejemplo, cuya función es la regulación post-transcripcional de un miR. La unión de miRs a transcritos no codificantes se da también en el caso de la generación de otra clase de RNA pequeños, los trans-acting siRNAs (tasiRNAs). Los tasiRNAs son siRNAs endógenos regulatorios generados mediante las maquinarias moleculares celulares propias tanto de la biogénesis de siRNAs (como RDR6 y SGS3) como de los miRs (DCL1, DRB1, HEN1) [193-194]. Los tasiRNAs se originan cuando un miR cataliza el corte de un RNA no codificante. Un ejemplo clásico de este proceso lo da el par TAS3-miR390 [195-196] (Figura 1.26B). TAS3 posee dos sitios de unión a miR390, pero sólo uno de ellos provoca corte; el otro sitio une el complejo miR/RISC sin cortar, al poseer un *mismatch* entre los nucleótidos 9-11 [195]. miR390 es poco común en el sentido de que se une a AGO7, lo cual parece estar relacionado con el hecho de que posee adenosina en su extremo 5' [175]. Una vez cortado por miR390, TAS3 es sustrato de RDR6, la cual forma dsRNA. Este dsRNA entra en la vía de silenciamiento de RNA, siendo a su vez sustrato para el corte por DCL4, la cual produce siRNAs de 21 nt “en fase” (Figura 1.26B). Se dice que los tasiRNAs actúan en trans, ya que poseen complementariedad con mRNAs distintos a los RNAs que les dieron origen; en el caso mencionado, los tasiRNAs son complementarios a factores de transcripción de respuesta a auxinas ARF2, 3 y 4 [193, 196]. Se cree que, tal vez como consecuencia de su generación a partir de DCL4 [140], los tasiRNAs generados por miR390 son señales móviles, distinguiéndose así de los miRs y jugando un rol distintivo en el desarrollo [197].



**Figura 1.26.** Dos mecanismos de acción no canónicos de miRs. A) Secuestro de miRs mediante “*target mimicry*”. Bajo estrés por falta de fosfato (Pi) se inducen miR399 e IPS1, un RNA no codificante. En ausencia de IPS1, miR399 dirige el corte y la inhibición de la traducción del mRNA de PHO2. La presencia de IPS1 “secuestra” miR399, ya que compite con PHO2 por el mismo. A diferencia de PHO2, IPS1 posee un *mismatch* entre las posiciones 10-11 del miR que impide su corte, regulando la disponibilidad de miR399. B) Generación de tasiRNAs. TAS3 es RNA no codificante que posee dos sitios de unión a miR390. El sitio de unión en 5’ es esencial pero no provoca corte. El sitio a 3’ es cortado por el miR y se convierte en sustrato de RDR6, que sintetiza el dsRNA. Éste es reconocido por DCL4, que origina siRNAs que actúan en trans, ya que poseen complementariedad con mRNAs de ARF2, 3 y 4 y capacidad de movimiento célula-célula. *Adaptado de [140].*

### 5.5.3 –Discusión: Conexiones entre complementariedad mRNA/miR y mecanismo de represión

La cuestión de si el tipo de apareamiento que se da entre el miR y su mRNA blanco determina el modo de represión es debatida. Hasta cierto punto, sí lo es. Por ejemplo, el *mismatch* central en el apareamiento (bases 9-11 del miR) originará secuestro del miR (“*target mimicry*”), mientras que la restauración de la complementariedad inducirá el corte [185]. Similarmente, el corte mediado por AGO1 necesita complementariedad extensa, y la capacidad de corte depende de ella [137]. Además, la generación de tasiRNAs también necesita de características peculiares en el RNA TAS sujeto a corte (resumido en [137, 140]). En cuanto a la dicotomía entre degradación del mRNA blanco y la inhibición de su traducción, si bien se pensaba en un principio que en animales la regulación se daba por el segundo mecanismo y en plantas por el primero, casi exclusivamente, se ha visto que en ambos reinos los dos

mecanismos coexisten con frecuencia incluso para el mismo par miR/mRNA. Esta similitud de mecanismos no debe sin embargo llevar a confundir las diferencias, aún en pie, encontradas entre los requerimientos de complementariedad entre plantas y animales [137] (Figura 1.25).

## 5.6 – Rol de los miRs en el desarrollo

Comparados con los miRs de animales, los miRs de plantas tienden a tener pocos mRNA blancos, y éstos suelen ser factores de transcripción muy conservados, muchos de ellos vinculados a desarrollo [188, 198]. Incluso se ha visto recientemente mediante análisis bioinformático que los miRs están entre los sRNAs más conservados entre monocotiledóneas y dicotiledóneas, siendo miR396 el más conservado de todos [199]. El rol esencial de los miRs en procesos de desarrollo fundamentales se pone también de manifiesto al observar los fenotipos aberrantes o inviables producidos en mutantes con alteración en biogénesis o el rol regulatorio de los mismos (por ejemplo [200]). A pesar de que un mismo miR puede influenciar varios procesos a la vez, no sólo de desarrollo sino de respuesta a estímulos externos [201], puede simplificarse su acción categorizándolos según sus roles mejor conocidos en cada caso.

### 5.6.1 – Transición de fase

A medida que la planta avanza en su ciclo vital, se producen transiciones primero de la etapa vegetativa juvenil a la adulta y luego a la fase reproductiva. Cada una de estas etapas está caracterizada por la presencia distintiva de caracteres morfológicos propios. Dentro de estas transiciones de fase, es crucial el rol de la red formada por miR156, miR172 y sus genes blanco, una de las redes involucrando miRs mejor estudiadas en plantas [178]. Ambas familias de miRs son antagonistas en su accionar y se expresan de manera complementaria a lo largo del ciclo vital de la planta. Lo mismo puede decirse de sus genes blanco, los factores de transcripción de la familia SPL (controlados por miR156) y AP2 y TOE (controlados por miR172) (Figura 1.27A). Los SPLs promueven la transición a la fase reproductiva y la floración [202], mientras que AP2 y TOE promueven las características juveniles [190, 203]. Se ha visto que miR156 es epistático sobre miR172 ya que SPL9, uno de sus blancos, se une directamente al promotor de miR172b [204]. A medida que la planta entra a la fase adulta, la caída en la cantidad de miR156 (la causa de la cual aún se desconoce [205]) permite la síntesis de más factor de transcripción SPL9, causando activación de miR172. Esto inactiva AP2 y TOE, produciendo el disparo del cambio de fase y la floración [205]. Esta red de regulación de la floración estaría relacionada con otra formada por otro miR y sus blancos. MiR390 induce el corte de TAS3, generando tasiRNAs que tienen como blanco, entre otros, a ARF3. Mutantes que no producen tasiRNAs poseen niveles elevados de ARF3 y entran aceleradamente a la fase adulta, lo cual indicaría, junto con otras evidencias, una conexión de esta red con la de miR156/miR172 y sus mRNA blancos [201] (Figura 1.27A).

### 5.6.2 – Senescencia

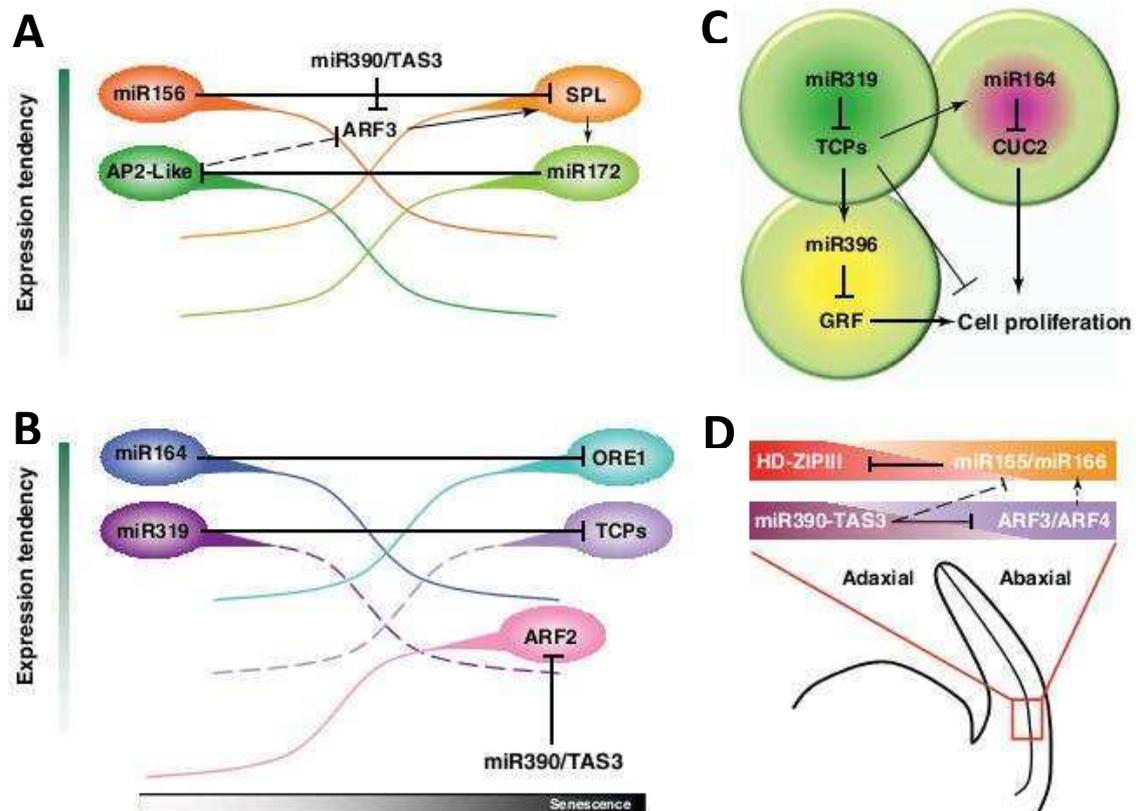
Durante la senescencia foliar, los recursos son reciclados para su exportación a partes en crecimiento de la planta [206]. Los miRs mejor estudiados relacionados con senescencia son miR164, que controla mayormente factores de transcripción de la familia NAC (resumido en [172]) y miR319, que controla algunos factores de transcripción de la familia TCP (resumido en [207]) (Figura 1.27B). Ambos miRs inducen el retraso de la senescencia cuando se los sobreexpresa y al menos en el caso de miR164 se ha visto que su acumulación declina con la edad de la hoja [172]. Se cree que miR319 retrasa la senescencia al reprimir a TCPs de clase II, entre ellos, TCP4. De este modo, lipoxigenasas como LOX2, que dependen de dichos TCPs y se inducen durante la senescencia, produciendo JA, permanecen inactivas [207]. Hay indicios de que estas dos redes podrían estar interconectadas vía la activación de miR164 por TCP3, aunque esta conexión no se ha probado en el contexto de senescencia [201]. Aparte de estas dos redes, miR390 parece jugar un rol en senescencia vía la generación de tasiRNAs a partir de su corte de TAS3. ARF2, un factor de transcripción importante en la respuesta a auxinas y regulador de la senescencia [208-209], es otro de los blancos de los tasiRNAs generados por TAS3 (Figura 1.27B).

### 5.6.3 – Morfología foliar

La importancia de los miRs en la morfología foliar se puso de manifiesto de manera evidente en un trabajo reciente en el cual se utilizó la tecnología basada en “*target mimicry*” para secuestrar selectivamente y por separado a los integrantes de todas las familias conocidas de miRs de *A. thaliana* [186]. De las 15 familias de miRs que, al ser secuestrados, evidenciaron fenotipos en la parte aérea, la mayoría corresponden a alteraciones foliares. El hecho de que estos miRs resulten ser los más conservados, incluso entre angiospermas y plantas sin flores, revela la importancia fundamental de los mismos en la arquitectura foliar. Entre los miRs que juegan un rol fundamental en morfología foliar se encuentra el miR164, a través de sus blancos CUC1 y 2. MiR164 suprime ambos CUC y así controla los límites del borde que separa, en los meristemas apicales de tallo, las células indiferenciadas de las ya determinadas [210]. Esto causa que plantas con este sistema afectado, ya sea por sobreexpresión de miR164 o por expresión de CUC resistente a corte, tengan defectos en la forma y el número de hojas, además de defectos en órganos florales [210]. Posteriormente, se vio que miR164 reprime CUC1 y 2 en los bordes de las hojas en *Arabidopsis* y de este modo, limita el aserramiento de hojas causado por la proliferación celular diferenciada en los márgenes de la misma [146]. Llamativamente, el fenotipo de aserramiento extremo es provocado también por la sobreexpresión de miR319, el represor de TCPs de clase II [200]. El hallazgo de que al menos uno de los TCPs controlados por miR319, TCP3, controla directamente transcripcionalmente a miR164a [211], permite establecer un nexo entre ambas redes de miRs (Figura 1.27C). Agregando otro nivel de regulación, miR396, que reprime los factores de crecimiento de la familia de GRF, es inducido por sobreexpresión de TCP4 [212]. MiR396 se expresa a niveles basales en primordios foliares, incrementando posteriormente su expresión y limitando el

crecimiento vía la represión ejercida sobre sus blancos GRFs. Tomados en su conjunto, estos tres nodos de miRs y sus blancos se interrelacionan en los tejidos meristemáticos, determinando así número, forma y tamaño foliar (Figura 1.27C).

Otro proceso de desarrollo foliar en el cual los miRs tienen un rol determinante bien estudiado, es la determinación de la polaridad abaxial/adaxial de la hoja [201]. También en este caso interactúa más de una pareja miR/blanco: mientras que miR165/166 restringe a sus blancos de la familia de TFs HD-ZIPIII a la parte adaxial de la hoja, los tasiRNAs derivados del corte de TAS3 por miR390 restringen ARF3 y 4 a la cara abaxial (Figura 1.27D). Se ha demostrado que miR390 maduro se acumula sólo en la parte adaxial de la hoja incipiente, independientemente de si la vía de biogénesis de los tasiRNAs está intacta o no, lo cual lo ubica epistático a los demás componentes del subsistema [171]. TAS3, que se acumula por una región más extensa, sólo es cortado allí donde miR390 maduro es abundante, de modo que tasiRNAs derivados pueden cortar ARF3 y 4 en la cara adaxial principalmente. Esto causa que estos TFs, que determinan la cara abaxial, sólo estén presentes en dicho dominio de la hoja. Se cree que estos ARFs a su vez inducen miR166 (ya que se ha visto que los tasiRNAs derivados de TAS3 determinan la restricción de miR166 a la cara abaxial [171, 213]). MiR166 a su vez limita la expresión de TFs de la familia HD-ZIPIII a la cara superior, generando características adaxiales (Figura 1.27D). Es decir, la polaridad de la hoja se establece mediante un patrón de acumulación inverso de miR390 y miR166, siendo miR390 epistático a miR166 [171]. Se ha sugerido que los tasiRNAs generados por miR390 pueden viajar a través del tejido foliar incipiente, generando un gradiente de inactivación de ARFs, determinando así las caras adaxial/abaxial de la hoja [197].



**Figura 1.27.** Acción coordinada de redes de miRs determinando cambios de fase y desarrollo. (A) Redes involucradas en transición de fase. (B) Redes involucradas en senescencia foliar. (C) Interacciones de tres miRs y sus blancos determinando la proliferación celular en hojas. (D) Interacciones miR–blanco en la determinación de la polaridad abaxial/adaxial en hojas. Las líneas saliendo de los óvalos indican la tendencia de expresión génica. Las líneas interrumpidas indican interacciones y comportamientos de expresión hipotéticos. Flechas indican inducción y líneas terminadas en forma de “T”, regulación negativa. Tomado de [201].

De manera interesante, al combinarse los efectos producidos por diferentes miRs vinculados a desarrollo, pueden observarse fenotipos que son el resultado de la suma de ambos. Por ejemplo, al obtener plantas de *A. thaliana* homocigotas que sobreexpresan dos miRs simultáneamente.

Cuando se realiza la cruce entre plantas sobreexpresantes de miR319 (que promueve el aserramiento de hojas) y sobreexpresantes de miR156 (que promueve la juvenalización de la planta e inhibe la transición al estadio reproductivo), se obtienen plantas con características compartidas (Figura 1.28):



**Figura 1.28.** La cruce de plantas parentales sobreexpresantes de miRs vinculados al desarrollo produce plantas descendientes que muestran fenotipos intermedios. Plantas de *A. thaliana* sobreexpresantes del miR156 (izquierda) y miR319 (centro-izquierda), fueron cruzadas para obtener plantas homocigotas 156X319 (centro-derecha). El fenotipo Col0 WT (fondo genético) se muestra a la derecha. *Fuente: Datos del Tesista no publicados. Semillas de miR156 y miR319 parentales sobreexpresantes, gentileza del Dr. J. Palatnik.*

Puede observarse en la Figura 1.28 que las plantas miR156 presentan un retraso en la floración respecto a los controles Col0 WT, además de un número mucho mayor de hojas, las cuales presentan un fenotipo juvenilizado, con una menor relación largo/ancho y un aspecto más redondeado. Las plantas miR319 también muestran un retraso en la floración, pero las hojas no son redondeadas sino fuertemente aserradas. La cruce de ambas exhibe retraso en la floración, mayor número de hojas que la Col0 WT, y hojas cortas pero sin aserramiento, sino con dobleces. Además, tal como se mencionó más arriba, miR156 y miR319 promueven la etapa vegetativa de la planta, estando la declinación de su acumulación asociada a la etapa reproductiva y la senescencia (Figura 1.27A, B). Coincidentemente, se observan indicios de una extremada longevidad de las plantas miR156XmiR319, las cuales aún presentan abundante tejido de roseta vivo 4 meses y medio después de su germinación (Figura 1.29) e incluso un mes más tarde. Esto contrasta con lo comúnmente observado para plantas Col0 WT, que alcanzan la senescencia completa en alrededor de 66 días en condiciones estándar de crecimiento [214-215].



**Figura 1.29.** La cruz *miR156XmiR319* dá como resultado plantas fértiles con un ciclo de vida mucho más largo que el de *Col0 WT*. Aquí se muestra la fotografía de una planta doble sobreexpresante de 4 meses y medio, bajo condiciones de día largo estándar.

#### **5.6.4 – Otros procesos de desarrollo influenciados por miRs**

Otros procesos morfológicos en los cuales los miRs juegan un rol conocido son desarrollo de vasculatura, desarrollo reproductivo y radicular [201]. En este último caso, es importante destacar que muchos miRs están relacionados con el control de factores de respuesta a auxinas ARFs (miRs 160, 164, 167, 390, 393), y se sabe que estas hormonas cumplen un papel esencial en el desarrollo radicular.

#### **5.7 – Rol de los miRs en respuestas a estreses abióticos y bióticos**

Un gran número de miRs importantes para el desarrollo de la planta varían su expresión ante diferentes estreses. De este modo, la planta adapta su crecimiento y desarrollo a las condiciones externas cambiantes [168].

### **5.7.1 – Sequía y salinidad**

La sequía y la salinidad excesiva del suelo son estreses principales que bajan la producción de grano en el mundo; por ende, la búsqueda de genes de resistencia a ambas condiciones de crecimiento es continua. Sin embargo, la búsqueda de un gen específico para controlar dicha respuesta ha sido elusiva, lo que lleva a pensar que el mecanismo de regulación debe ser complejo. Varios miRs se acumulan diferencialmente ante estos estreses [216]. Sin embargo, los resultados son de difícil interpretación. Suele ocurrir que, en una especie vegetal dada, diferentes integrantes de una misma familia de miRs responden de modo distinto, a veces opuesto, ante un estímulo de estrés. Incluso, se ha hallado que en distintos tejidos de la misma planta sometida a estrés, un determinado miR responde de manera diferente, subrayando la conveniencia de realizar análisis más precisos de la expresión génica, que contemplen muestreos de tejidos bien individualizados por separado [168, 217]. Entre los miRs sensibles a estrés hídrico, miR169 es uno de los candidatos más sólidos a jugar un rol esencial en la respuesta a dicho estrés, regulando a su blanco NFYA5, el cual a su vez controla una red de respuesta a sequía [217].

### **5.7.2 – Nutrientes**

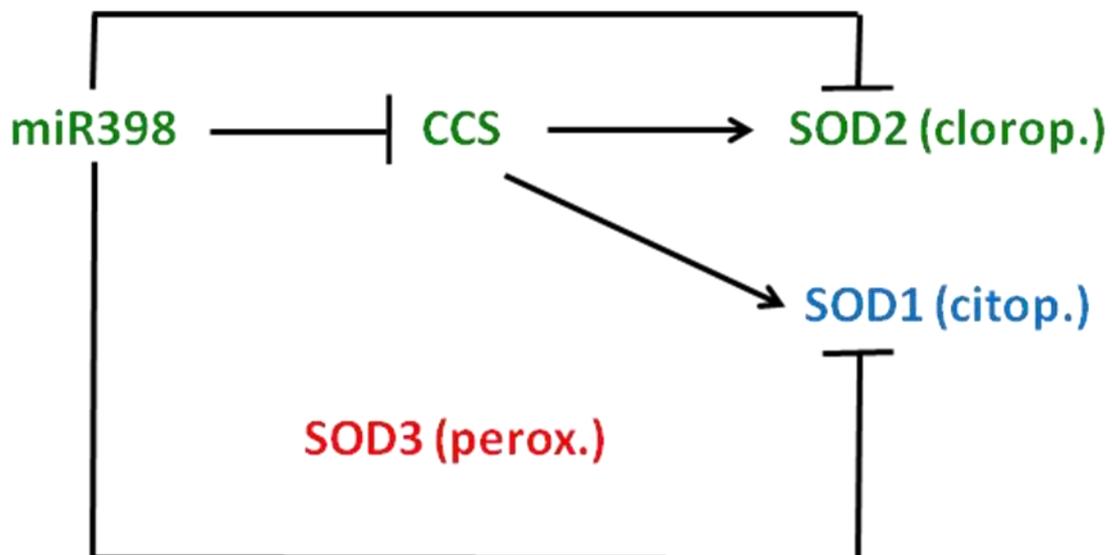
Ante la carencia de nitrógeno, la planta tiene como estrategia modificar su estructura radicular, lo cual le permite entrar en contacto con zonas del suelo más ricas en este nutriente. Se ha visto que el nitrato, fuente principal de nitrógeno en el suelo, influencia la arquitectura de la raíz. Un bucle regulatorio implica la inducción del receptor de auxinas AFB3 (un blanco de miR393) por nitrato, seguida de la inducción de miR393 por metabolitos nitrogenados. AFB3 inducido aumenta la sensibilidad a auxinas y promueve el desarrollo de raíces laterales en un suelo rico en nitrato cuando la cantidad de metabolitos endógenos de N es baja. De este modo, la planta modifica su raíz en presencia de nitrato y detiene el proceso cuando la concentración endógena de asimilados del nitrógeno es alta [218]. Recientemente se han identificado miRs que responden a la falta de N, entre los que se encuentran varios que también cambian su acumulación ante la falta de otros nutrientes (S, P, Cu) [219].

Varios miRs modulan su expresión ante la carencia de fósforo (Pi), otro macronutriente esencial [168]. El mejor estudiado de todos es el miR399. Éste regula post-transcripcionalmente a PHO2, el cual limita la toma de Pi en condiciones normales. Ante el déficit de Pi, miR399 se acumula y PHO2 es regulado, permitiendo la absorción de más Pi [220]. Como miR399 maduro puede viajar por el floema, cuando la hoja sufre un déficit de Pi, se activa la síntesis de miR399, que viaja a la raíz, inactiva PHO2 y determina mayor absorción y transporte de Pi desde allí.

El azufre, otro macronutriente esencial, se encuentra biodisponible bajo la forma de sulfato. Entre las varias respuestas de las plantas a estrés por carencia de sulfato, los miRs también participan [168]. Entre los miRs encontrados como respondedores a este estrés, miR395 es el mejor estudiado. Hay una correlación negativa entre niveles de miR395 maduro y APS1, uno de sus blancos [198]. APS1 pertenece a la familia de las ATP sulfurilinas, que junto con algunos transportadores

de sulfato de raíz, son blancos de miR395 [168]. MiR395 se induce por déficit de azufre, regulando así el metabolismo del mismo dentro de la planta, tanto en su destinos bioquímicos como en su distribución dentro de diferentes tejidos de la planta [221].

Como micronutriente, el cobre es esencial para la planta ya que forma parte de una enzima fundamental para el proceso de fotosíntesis: la plastocianina. Por otro lado, el cobre es parte de otras proteínas transportadoras de electrones, o de enzimas, que sí tienen una contrapartida en proteínas que contienen hierro en un grupo hemo y por lo tanto no son estrictamente irremplazables. Por ejemplo, las superóxido dismutasas de cobre-zinc (Cu-Zn SODs) *versus* las de hierro (Fe-SODs) [222]. Las SODs de cobre-zinc (CSDs) son de gran importancia para el sistema enzimático de defensa contra el  $O_2^{\bullet-}$ . MiR398 tiene como blancos a la CSD1 (que es citosólica) y a la CSD2 (cloroplástica) y a una chaperona (CCS1) que facilita la entrega de cobre y el correcto plegamiento de ambas proteínas CSDs [223-225], pero no a la CSD3, que es peroxisomal e independiente de CCS1 [226] (Figura 1.30).



**Figura 1.30.** MiR398 regula post-transcripcionalmente a dos CSDs tanto de manera directa, mediante corte, como indirecta, mediante inhibición de CCS1, la chaperona que entrega cobre a las apoproteínas CSD1 y 2. CSD3, peroxisomal, no se encuentra sujeta a ninguna de estas regulaciones por miR398.

MiR398 también regula a la citocromo c oxidasa mitocondrial (COX5b-1), que también posee cobre. MiR398 es inducido ante el estrés de cobre [227]; de esta manera, limitaría la síntesis de enzimas no esenciales que poseen cobre (las Cu-Zn SODs son reemplazadas por Fe-SODs en el cloroplasto) y se mantienen niveles aceptables de cobre para el transportador de electrones plastocianina, que es insensible al corte por este miR [222]. Esta idea es reforzada por el hecho de que otros miRs que se inducen ante la falta de este micronutriente (miRs 397, 408 y 857) también poseen como blanco proteínas con cobre, como lacasas y la plantocianina [228]. Por otro lado, se ha visto que miR398 es reprimido durante el estrés oxidativo [223, 229]. Dado que el estrés oxidativo determina con frecuencia la acumulación de  $O_2^{\bullet-}$ , un radical libre peligroso, la disminución de miR398 en este caso posee el valor adaptativo de permitir la síntesis de más proteínas CSDs, lo cual a su vez acelera el

proceso de detoxificación. Sin embargo, es importante notar que la correlación negativa entre miR398 y CSD1 y 2 no se da siempre, indicando que la regulación de ambos blancos es diferente en al menos algunos casos, lo cual podría tener que ver, entre otras cosas, con diferencias en la complementariedad de bases entre el miR y sus blancos [229].

### **5.7.3 – Especies reactivas de oxígeno**

Las ROS están asociadas con frecuencia con otros estreses comunes en plantas, como irradiación UV, alta intensidad lumínica, extremos de temperatura, metales pesados, sequía, estrés salino y estrés mecánico [230], por lo que los miRs inducidos por muchos de esos estreses son con frecuencia los mismos. Dentro de los mejor caracterizados en la respuesta ante estrés oxidativo, podemos citar nuevamente al miR398, el cual se reprime al aumentar las ROS.

### **5.7.4 – Hormonas**

El nexo entre estreses, cambio de expresión de miRs y fenotipos visibles es ejemplificado por los sistemas de regulación mediante miRs que se relacionan con auxinas. La auxina es una hormona de crecimiento bien caracterizada. Muchos miRs (miR160, 167, 390 y 393, por ejemplo) son sensibles a estreses y sus blancos son factores de transcripción de las familias ARF y TIR, que cumplen un rol clave en la percepción y homeostasis de las auxinas. Aunque no se sabe en detalle el rol preciso de cada ARF en la respuesta a estrés, es probable que el atenuamiento de crecimiento de plantas bajo estrés, se vincule con la regulación de estos factores por los miRs [168]. Otra hormona importante en estos procesos es ABA, que es importante en plantas bajo estrés. Los tratamientos de aplicación de ABA dan lugar a una inducción de varios miRs en distintas especies de plantas (resumido en [222, 230]). A pesar de que los cambios hormonales juegan un rol importante en la regulación de los miRs, aún es poco lo que se sabe acerca de la respuesta de miRs ante la aplicación de otras hormonas [222].

### **5.7.5 – Estrés biótico**

En plantas, la respuesta de acumulación de miRs ante estrés biótico está mejor caracterizada ante el desafío con péptidos bacterianos o bacterias [231-232]. Se ha visto que varios miRs regulados por infección bacteriana se vinculan con la homeostasis de auxinas, principalmente, pero también de otras hormonas [168, 222]. Se han encontrado miRs respondedores ante infecciones fúngicas o virales, aunque la información existente de la respuesta ante estos patógenos aún es escasa [222, 230].

### **5.7.6 – Conclusión: estreses, miRs y su impacto en el fenotipo**

Debido a que en muchas ocasiones los miRs altamente conservados, cuyos factores de transcripción blanco participan en procesos importantes de desarrollo, responden a estrés, estas respuestas tienen como resultados cambios visibles en el fenotipo. De hecho, la detención del crecimiento, o un crecimiento anormal, son consecuencias muy comunes ante varios estreses. Desde el punto de vista adaptativo, tiene sentido la detención del crecimiento, y la redirección de esfuerzos metabólicos de la planta ante el estrés, priorizando la supervivencia en detrimento de un crecimiento óptimo [168, 230]. Los defectos en el crecimiento observables en mutantes que tienen alterada la regulación de blancos de miRs, o la expresión normal de miRs, dan una idea del posible origen de los fenotipos aberrantes observados en plantas bajo estrés, cuando esos mismos miRs que afectan al desarrollo, se encuentran expresados de manera diferencial como respuesta a estreses varios [230]. La redirección de los recursos de la planta hacia la supervivencia mediante la superación del estrés, posee penalidades para el normal desarrollo. En estas decisiones vitales de la planta, los miRs pueden jugar un rol central.

### **5.8 – MiRs y VSRs**

Los VSRs son, como se mencionó anteriormente, proteínas virales que han evolucionado en el sentido de contrarrestar la maquinaria de silenciamiento en plantas, que tiene un rol antiviral fundamental. La escasa conservación y alta variabilidad de dichos VSRs indican su origen evolutivo reciente en diferentes linajes virales, evidenciando una adaptación veloz a sus huéspedes [233]. Diferentes VSRs pueden actuar a distintos niveles en la ruta de biosíntesis de vsiRNAs (ver Figura 1.20 para algunos ejemplos). Sin embargo, la forma más común de acción de VSRs descrita hasta la fecha, es el secuestro de ds siRNAs, previniendo el ensamblaje del complejo RISC y el posterior corte y amplificación del silenciamiento [233]. El VSR más estudiado a la fecha, la proteína p19 de Tombusvirus, actúa de esta manera. Funciona como homodímero y cristalográficamente se ha podido determinar que su forma de pinza “calibra” siRNAs, secuestrando selectivamente los que poseen doble cadena, sin distinción de secuencia específica. Muestra mayor afinidad por ds siRNAs con 21 nt de longitud, teniendo menos afinidad por los de mayor longitud (23-26 nt). Reconoce específicamente la región de 19 nt de la doble cadena del ds siRNA, quedando 2 nt en 3' protruyentes [234]. La proteína HC-Pro de potyvirus, presente en TuMV, actúa a este mismo nivel y con requerimientos muy similares [235]. Ambos (y otros) supresores pueden, de este modo, secuestrar dúplex miR/miR\* de 21 nt, ya que bioquímicamente son indistinguibles de los vsiRNAs en este punto [235-236]. La estabilización de los dúplex de ds siRNAs y miR/miR\* tiene como consecuencia el impedimento de formación de complejos RISC maduros, que puedan actuar mediante corte de las secuencias blanco complementarias [236]. La expresión de VSRs tiene como resultado no sólo la supresión del silenciamiento antiviral, sino que ocasiona evidentes síntomas en las plantas afectadas, a niveles de morfología foliar y desarrollo reproductivo [189, 236].

Aunque se ha asociado frecuentemente la generación de síntomas por expresión de supresores a su capacidad de secuestrar miRs y así alterar el normal desarrollo de la planta, hay evidencias que apuntan a que estos síntomas son en gran medida independientes de la vía de los miRs [237-238]. Además, el estudio del efecto producido *in vivo* por la expresión de diferentes VSRs mostró que todos ellos actuaban interfiriendo con la carga de siRNAs a AGO1, pero no de dúplex miR/miR\*, lo que puede señalar conjuntos separados de proteínas AGO1 que se encargarían de cargar selectivamente siRNAs y miRNAs [239]. Estudios recientes demostraron que las infecciones virales tienen como efecto la inducción de miR168 (cuyo blanco es AGO1). El mRNA de AGO1 no es particularmente afectado, pero sí disminuyen los niveles de proteína AGO1. Esto puede ser la causa de los síntomas similares a los vistos en plantas transgénicas mutantes en las vías de miRs. En efecto, la baja disponibilidad de AGO1 alteraría toda la acumulación de miRs, con efectos pleiotrópicos sobre el fenotipo [240-241]. Se ha visto en *Arabidopsis* que HC-Pro también es capaz de interferir con el silenciamiento antiviral mediante su unión física a RAV2, un factor de transcripción endógeno de la planta. La expresión de RAV2 es necesaria para determinar todos los síntomas en órganos reproductivos, y parcialmente necesaria para determinar los síntomas en roseta, originados de la expresión transgénica de HC-Pro. Sin embargo, la vía de los miRs no está afectada por RAV2, ni en la acumulación de miRs ni en su efecto sobre sus mRNAs blanco [238]. La asociación entre HC-Pro y RAV2 es necesaria para la inducción de factores supresores del silenciamiento endógenos de la planta. Su asociación le permite inducir la síntesis de genes de defensa, los cuales podrían ser causantes de la disminución de la eficacia del silenciamiento, permitiendo así la propagación viral [238].

En conclusión, los VSRs virales pueden alterar la acumulación o la acción de los miRs endógenos como un efecto colateral en su rol de supresores del silenciamiento antiviral, probablemente causando algunos de los síntomas que exhiben las plantas infectadas. Esta acción puede desarrollarse afectando a diferentes niveles la biogénesis o acumulación de los miRs. Por otro lado, la inducción específica de miRs como el miR168 por parte de los VSRs de virus, pueden indicar una ventaja adaptativa de reprimir AGO1, lo cual a su vez determina un efecto secundario en la biosíntesis de otros miRs, originando defectos de desarrollo pleiotrópicos. Sin embargo, otros factores, incluyendo endógenos de la planta, pueden estar originando buena parte de los síntomas. Sin embargo, los resultados obtenidos de plantas que sobreexpresan supresores deben ser tomados con precaución, debido a que en una infección natural, los VSRs son expresados siguiendo un patrón espacial y temporal específico en la planta, y no de manera constitutiva y pleiotrópica [233, 242].

## 6 – Senescencia

Entre las consecuencias de las infecciones virales se encuentra el disparo prematuro de la senescencia [243]. La senescencia de la hoja es un proceso lento y muy ordenado, que determina la muerte de las células permitiendo el previo reciclado y la reutilización de recursos valiosos [244]. La senescencia es un proceso degenerativo complejo que está bajo estricto control genético, y que comienza con el desmantelamiento del cloroplasto, seguido por el catabolismo de macromoléculas

como las clorofilas, proteínas, lípidos y RNA [206, 245-247] y por la desestabilización de la membrana [248]. Nutrientes tales como nitrógeno, fósforo y metales, que habían sido invertidos en el desarrollo de la hoja ahora senescente, son relocalizados hacia hojas jóvenes y otros posibles tejidos en crecimiento como tubérculos, flores o semillas [249-250]. El proceso de senescencia se dispara por el avance de la edad y el desarrollo [251] y responde a señales endógenas [252] pero también es influenciado por factores externos como el fotoperiodo, la intensidad de la luz, la disponibilidad de nutrientes o el estrés biótico [253-260]. Por otro lado, estímulos de desarrollo y ambientales, como estrés por alta temperatura, salinidad, frío o ataques de patógenos, son conocidos disparadores de la acumulación de niveles altos de ROS, de las cuales el  $H_2O_2$  es aparentemente un elemento regulador de la senescencia. [261-264].

### **6.1 – Pigmentos fotosintéticos y senescencia**

Durante la senescencia, el cambio más temprano en la estructura celular es el desmantelamiento del cloroplasto, el cual posee un 70% de la proteína total de la célula [206]. En consecuencia, el cambio en composición más temprano detectable ante un proceso de senescencia es la disminución del contenido de clorofila, de modo que este metabolito puede ser utilizado como un indicador de senescencia y reciclado de nutrientes [265]. El aumento del cociente de Clorofila b/Clorofila a, parece ser el primer paso de la ruptura de la clorofila, seguida por la pérdida del cofactor  $Mg^{2+}$  [266]. Se sabe que los genes responsables de la biosíntesis de clorofilas y carotenoides están entre los primeros en ser subregulados al comienzo del proceso de senescencia, así como que los genes implicados en la degradación de estos pigmentos fotosintéticos se sobreexpresan antes de que los primeros síntomas de senescencia sean evidentes [267]. Además, la biosíntesis de estos pigmentos está determinada por la expresión altamente coordinada de los genes implicados en su ruta [268]. De este modo, la utilización de ambos pigmentos como marcadores de senescencia resulta pertinente, especialmente en el caso de la clorofila.

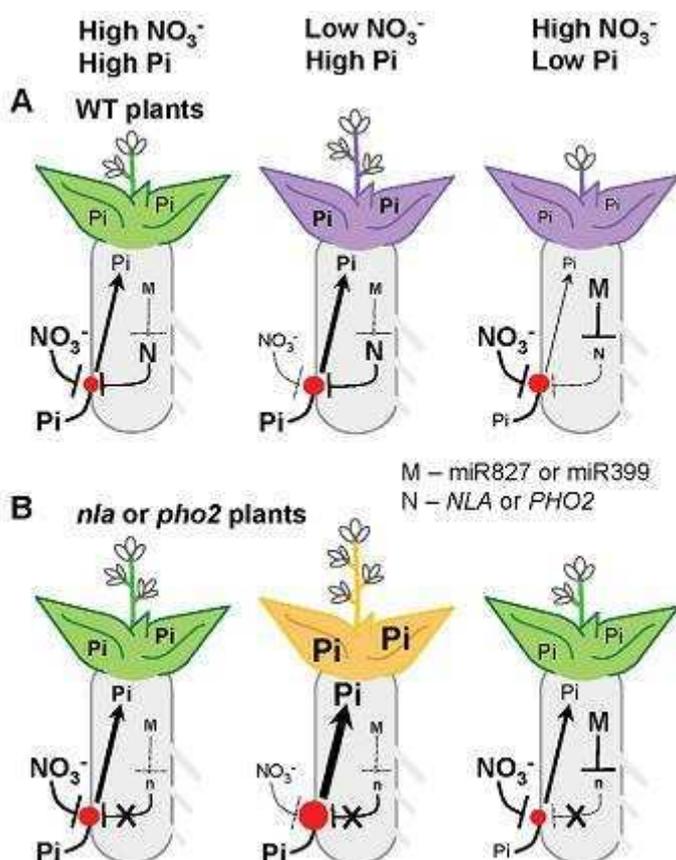
### **6.2 – Antocianinas y senescencia**

Las antocianinas son un grupo de metabolitos secundarios responsable de una amplia gama de colores vistos en las plantas. Principalmente notables son en las flores, donde dan cuenta de casi toda la gama de colores, especialmente rojos, azules, violetas y naranjas, pero también en frutos. Mientras que en las flores y frutos su presencia es explicada por su papel de atrayentes de polinizadores y dispersores de semillas, respectivamente, en las hojas y los tallos el rol de las antocianinas aún es debatido [269]. Al parecer, pueden funcionar como repelentes visuales de insectos y/o como escudos fotoprotectores.

Estos flavonoides vacuolares, que comparten parte de la vía biosintética que conduce a las ligninas [270], son responsables del color rojo, azul y violeta (dependiendo del pH vacuolar) de las hojas senescentes de *Arabidopsis* y otras muchas plantas [269]. Su efecto fotoprotector está ampliamente documentado en plantas

[271]. Al actuar repeliendo el exceso de luz, protegen al aparato fotosintético de las hojas senescentes y permiten el reciclado de nutrientes, especialmente nitrógeno, de dichas hojas [272-273]. Las antocianinas no sólo se inducen durante la senescencia: se sabe que aumentan su concentración ante una amplia gama de estreses bióticos y abióticos [274], y se inducen por el aumento de ROS [275].

Las antocianinas se han visto vinculadas a estreses de nitrógeno (N) y fósforo (Pi) en recientes trabajos [270, 276-277]. Al parecer, en mutantes *nla*, incapaces de resistir el estrés de falta de nitrógeno y deficientes en antocianinas, la vía de los fenilpropanoides se desvía de la síntesis de antocianinas a la de ligninas; de esta manera, la ausencia de fotoprotección provocaría los fenotipos de disminución del crecimiento y senescencia temprana observados [277]. Así, la síntesis de antocianinas se reveló como clave para superar el estrés de déficit de nitrógeno en *Arabidopsis*. El efecto deletéreo de *nla* depende de la existencia de altas cantidades de Pi en el sustrato, que actúa como tóxico en ausencia de N en las plantas *nla*. En efecto, los déficits combinados de N y Pi restauran en plantas *nla* el fenotipo salvaje. Más adelante, fue visto que *NLA* es blanco de regulación de miR827, el cual se induce por disminución de Pi. De este modo, se pudo establecer un nodo regulatorio de N y Pi, dos importantes nutrientes de la planta, en los cuales participa un miR [277]. En este mismo trabajo, se pudo detectar que tanto *NLA* como *PHO2* funcionan en el mismo sentido, es decir, suprimen la toma de Pi en la planta. El esquema puede verse en la Figura 1.31. Recientemente [219] se ha visto que miR399 responde a la carencia de N de manera inversa que a la de Pi: disminuye su acumulación ante la falta de N, pero aumenta ante Pi. Esta podría ser una manera mediante la cual plantas WT evitan la hiperacumulación de Pi cuando no hay N, evitando la toxicidad por Pi.



**Figura 1.31.** Modelo hipotético de acción de los genes *NLA* y *PHO2* y de la interacción entre  $\text{NO}_3^-$  y Pi. A) En plantas WT, *NLA* y *PHO2* reprimen la toma de Pi, el cual compite con el  $\text{NO}_3^-$  del suelo. MiR827 y miR399 reprimen *NLA* y *PHO2*, respectivamente, y se inducen ante la falta de Pi, permitiendo la toma incrementada de Pi desde el suelo. Hojas violetas indican acumulación de antocianinas debido al déficit de Pi o  $\text{NO}_3^-$ . B) Las mutantes *nla* o *pho2* son hiperacumuladoras de Pi. En estas plantas, la escasez de  $\text{NO}_3^-$  en el suelo provoca una acumulación interna de Pi a niveles tóxicos (representado por plantas de hojas naranjas). Además,  $\text{NO}_3^-$  y Pi tienen efectos antagónicos en la floración. Tomado de [277].

### 6.3 – SAGs y senescencia

La senescencia está caracterizada por cambios en la expresión de muchos genes, incluyendo los de función regulatoria [263-264, 267, 278-279]. Factores de transcripción consistentemente sobreexpresados durante el proceso de senescencia se categorizan como “genes asociados a senescencia” (SAGs por su nombre en inglés). Varios SAGs también responden a estreses ambientales, y de este modo, puede hipotetizarse que algunos de ellos funcionan como integradores de las vías de señalización que controlan por un lado respuestas de estrés y por otro senescencia dependiente del desarrollo. Otros pueden no estar involucrados en señalización, sino ser disparados por señales de estrés que son típicas en células senescentes [254, 280]. Las familias de TFs NAC y WRKY están entre los grupos más grandes relacionados con senescencia [267, 278], sugiriendo que cumplen roles destacados durante este proceso. Recientemente, se ha descubierto que varios TFs de la familia NAC cumplen roles clave en redes importantes de senescencia disparada tanto por respuesta a estrés como por la edad, principalmente ORE1 [172, 280], su parálogo ORS1 [263] y JUB1 [261]. Mientras que ORE1 es regulado post-transcripcionalmente por miR164, ORS1 no lo es. Es interesante el hallazgo de que los análisis de promotores revelaron que no sólo ORE1 y ORS1 comparten elementos regulatorios comunes en *A.thaliana*, sino también que hay una conservación muy alta de dichas secuencias regulatorias entre diferentes representantes de la familia Brassicaceae. Esto sugiere que la mayoría de los elementos de estos promotores están bajo una fuerte presión de selección positiva [263]. La mayoría de estos elementos están predichos bioinformáticamente como de respuesta a estrés, daño mecánico o ácido salicílico (SA), incluyendo motivos W-box y WRKY-box. Además, experimentalmente se ha comprobado que ORS1 y JUB1 responden a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estos resultados sugieren que estos NACs no son idénticos en su regulación. Los regulones de ORE1 y ORS1, ambos con numerosos integrantes, también son diferentes y sólo un pequeño porcentaje de genes se han visto como co-regulados por ambos TFs [263]. Por otro lado, la familia WRKY (con 74 integrantes en *Arabidopsis*) parece estar involucrada en varios procesos fisiológicos, incluyendo la defensa de la planta y la senescencia. Hasta la fecha, varios TFs de la familia WRKY se han caracterizado funcionalmente como reguladores de la senescencia, incluyendo WRKY70 [281-283]. La importancia de WRKY70 en la integración de la señalización hormonal durante procesos de defensa está reportada [284-285]. WRKY70 es sensible al SA, pero no al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y su expresión durante el proceso de senescencia es parcialmente dependiente de SA [283]. Diferentes integrantes de la familia WRKY, siendo algunos reguladores positivos y otros negativos de la senescencia, poseen diferentes sensibilidades al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y al SA [283].

### 6.4 – Hormonas y senescencia

Varias hormonas cumplen un rol importante durante la senescencia; las más estudiadas son tal vez ABA, SA y JA. Estudios de desarrollo de la senescencia han

encontrado que estas 3 hormonas siguen tendencias generales de aumento a lo largo del proceso, aunque con patrones de cambio característicos diferenciados entre ellas [267]. Más que aumentar de manera escalonada a través del proceso de senescencia, estas hormonas muestran altibajos en su acumulación a través del mismo, posiblemente activando diferentes genes de senescencia secuencialmente. La importancia del SA en la regulación de la senescencia se pone de manifiesto en el fenotipo de senescencia retardada que poseen las plantas transgénicas de *Arabidopsis* NahG [279, 286], deficientes en acumulación de SA. Otra hormona bien conocida, el etileno, tiene relevancia en el proceso de senescencia. Por ejemplo, EIN2 (un factor respondedor de etileno) forma un bucle regulatorio que implica también a miR164 y ORE1, determinando en parte el disparo de la senescencia [172]. El rol del JA durante la senescencia es menos claro: a pesar de que las mutantes *aos* y *opr3* (defectuosas en la vía metabólica que conduce al JA) no muestran alteraciones en la progresión de la senescencia [207], genes de las familias TCP y LOX (que son a la vez, participantes de la vía biosintética de JA y se inducen por él) muestran cambios en los perfiles de expresión durante el desarrollo [267]. Además, plantas mutantes que no acumulan TCP4 ni LOX2 (y que por consiguiente acumulan mucho menos JA) tienen la senescencia retrasada [207] y la aplicación de JA exógeno induce la senescencia. En su conjunto, estos datos han inducido a pensar que el JA cumple un rol en la senescencia, aunque no esencial en condiciones normales de plantas wt [207].

Adicionalmente, se ha visto que hay genes cuya expresión depende positiva o negativamente de más de una hormona y que en ocasiones, diferentes hormonas ejercen efectos contrapuestos en genes asociados a senescencia [279]. En resumen, si bien hay SAGs caracterizados por su respuesta a hormonas, en muchos casos su expresión va a depender del balance hormonal que posea el tejido analizado en cuestión en un momento dado, es decir, de la integración de potencialmente una multitud de señales externas e internas cuya suma determinará su nivel de expresión.

## HIPÓTESIS

Las infecciones virales compatibles en plantas disparan cambios metabolómicos y transcriptómicos tempranos a nivel sistémico en avance de la infección, los cuales involucran a genes clave en procesos de desarrollo, determinando la severidad de los síntomas producidos en tejidos jóvenes sistémicos.

*Hipótesis anexa 1)* Existe un componente transcripcional en la acumulación diferencial de los microRNAs producida por infecciones virales compatibles en plantas.

*Hipótesis anexa 2)* Hormonas clave en procesos de desarrollo son diferencialmente alteradas por virus distintos, determinando cambios en la severidad de los síntomas observados.

## OBJETIVO GENERAL

Analizar de manera espacio-temporal los cambios transcriptómicos de microRNAs, sus genes blanco y otros genes relevantes para procesos de desarrollo y la producción de síntomas en diferentes patosistemas planta-virus y asociar los mismos con los cambios a nivel fenotípico provocados por la infección.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar el perfil de expresión espacio-temporal del miR164a. Estudiar el impacto de infecciones virales y el tratamiento con fitohormonas sobre la actividad del promotor del miR164a en *Arabidopsis* y relacionar las respuestas transcripcionales observadas con el nivel de acumulación del miR164 maduro, sus mRNAs blanco y el nivel de sintomatología desencadenado ante diferentes cepas de un tobamovirus.
- 2) Analizar los perfiles transcriptómicos de acumulación de microRNAs durante la infección sistémica de *N. tabacum* con TMV y relacionarlos con los cambios metabolómicos producidos en los mismos tejidos ante la infección.
- 3) Estudiar la relación entre la capacidad de dos tobamovirus de inducir síntomas de distinta severidad en plantas de *N. tabacum* y el impacto que dichos virus provocan en la acumulación de microRNAs y sus genes blanco con relevancia en procesos de desarrollo.
- 4) Caracterizar la sintomatología de dos cepas de TuMV que infectan *A. thaliana* dando lugar a síntomas diferenciales (severos y suaves) mediante el análisis de parámetros morfológicos y bioquímicos. Relacionar dichas diferencias con los cambios a nivel transcriptómico de genes clave en los procesos de senescencia, desarrollo y respuesta a hormonas, a diferentes tiempos posinfección en tejidos sistémicos.

- 5) Estudiar la dependencia de los cambios morfológicos y bioquímicos diferenciales detectados en *Arabidopsis* ante infecciones con ambas cepas de TuMV respecto de vías hormonales de defensa.

## **CAPÍTULO 2: LAS INFECCIONES VIRALES ELEVAN LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR DEL MIR164A EN ARABIDOPSIS.**

La expresión de de supresores virales del PTGS da como resultado fenotipos de alteración del desarrollo en plantas explicados en parte por la alteración de la acumulación de miRs maduros [189, 236]. Además, infecciones virales naturales también causan cambios en acumulación de miRs y fenotipos aberrantes en la planta [189, 236, 287], en ocasiones sin depender de la existencia de una proteína viral reportada como VSR [288]. Sin embargo, los mecanismos por los cuales los virus interfieren en la vía de los miRs aún no están claros, ni tampoco la consecuencia de esta interferencia. En algunos patosistemas estudiados, el resultado de esta alteración es bastante sugerente: la infección de plantas de *Brassica sp.* con el potyvirus TuMV, por ejemplo, determina la inducción de miR1885, el cual tiene como blanco el mRNA codificante para una proteína TIR-NBS-LRR, involucrada en procesos de defensa [289]. Como diversas hormonas están involucradas en la respuesta a virus, influyendo en la interacción del virus y el huésped con artrópodos vectores, y a su vez dichas alteraciones hormonales dependen en parte de los niveles de expresión de algunos miRs (ver resumen en [290]), reviste importancia investigar más en detalle la alteración de miRs ante infecciones virales o tratamientos con hormonas.

Básicamente, la acumulación de miRs puede ser afectada por cambios en niveles transcripcionales o post-transcripcionales (en este último caso, dependiendo del procesado de precursores, acumulación y estabilidad del miR maduro). Aunque como se mencionó antes, se han publicado diversos trabajos acerca del efecto post-transcripcional observable sobre los miRs maduros ante infecciones virales, los posibles efectos transcripcionales sobre miRs ante infecciones virales no habían sido estudiados a la fecha de realización de este trabajo.

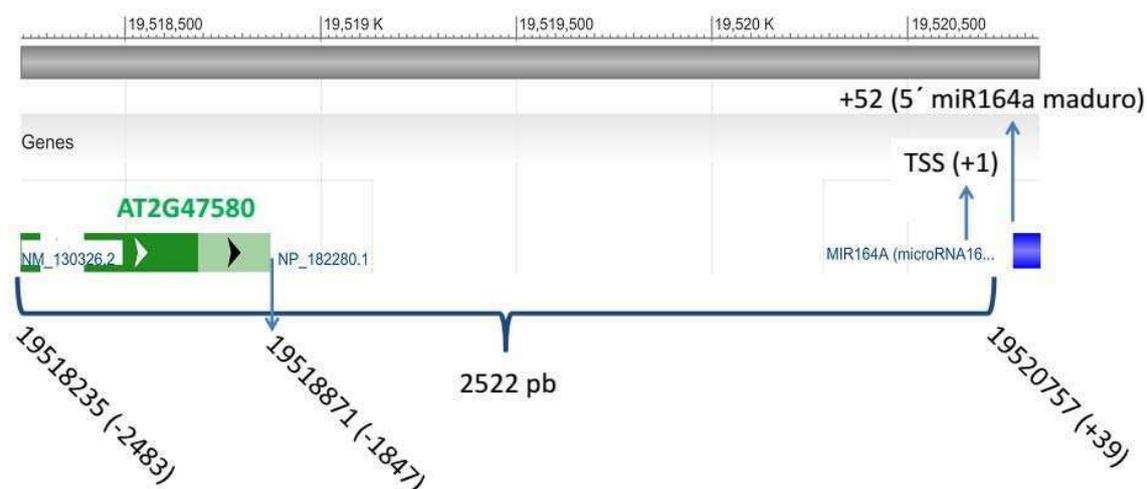
En el presente Capítulo 2 de esta Tesis, se presentarán los resultados de experimentos que estudiaron el efecto de regulación transcripcional del promotor del miR164a de Arabidopsis ante infecciones virales y tratamientos con fitohormonas. Se seleccionó el miR164a para el estudio debido a varias razones. Por un lado, reportes previos indicaron el incremento de la acumulación de miR164 maduro ante la infección por TMV [288, 291]. Por otro, miR164 está involucrado en el desarrollo de la planta y sus mRNAs blanco son bien conocidos [144-146, 210], siendo importante para regular morfología foliar y determinar el número de órganos florales entre otros procesos, como se mencionó previamente en la Introducción. Además, miR164 es un miR muy conservado en plantas, de origen evolutivo ancestral [142-143] y que, por lo tanto, era de esperar que presentara niveles altos de expresión promedio [148], lo cual facilitaría los análisis cuantitativos comparativos. En el presente Capítulo 2 de la Tesis, se describe el clonado del probable promotor extenso de miR164a río arriba del gen reportero *uidA*, obteniendo el transgén PmiR164a:GUS, para transformar plantas de *A. thaliana* y estudiar la expresión espaciotemporal del promotor del miR164a. Además, se analizó la actividad del PmiR164a y la acumulación de pre-miR164a, miR164 maduro, y mRNAs de sus genes blanco CUC ante infecciones virales y tratamientos con hormonas.

Como resultado de estas investigaciones, se publicó en la revista *BMC Plant Biology* un trabajo del cual soy segundo autor ([292]). A fin de lograr una mejor comprensión del mismo en su conjunto, detallaré a continuación el trabajo completo, indicando mi aporte en cada caso y poniendo especial énfasis explicativo en los experimentos de los cuales fui responsable.

## Resultados

### 2.1 – Análisis bioinformáticos y clonado de la probable región promotora extensa del miR164a

En los genes transcritos por la RNA polimerasa II la mayoría de los sitios de unión a factores de transcripción ligados a secuencias promotoras están ubicados dentro de 800 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS) [176]. Sin embargo, en el caso del miR164a se comprobó que es necesaria una región promotora más extensa para complementar el fenotipo de plantas mutantes nulas para miR164a y restaurar la actividad total del miR [146]. Se decidió amplificar por PCR un fragmento de 2522 pb, correspondiente a la secuencia de DNA genómico desde la posición -2483 a la +39 ubicada río arriba del miR164a, considerando la posición +1 como el sitio de inicio de la transcripción (TSS) del Pri-miR164a descrito previamente [146]. Este fragmento fue posteriormente clonado y secuenciado y se verificó su identidad. A partir de aquí me referiré a dicho fragmento como el promotor del miR164a (PmiR164a). La Figura 2.1 muestra el esquema de la región clonada, con sus referencias genómicas, según se visualiza con la herramienta Sequence Viewer del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/sviewer/>).



**Figura 2.1.** Representación esquemática del *locus* del miR164a de Arabidopsis en su contexto genómico. La posición del miR164a en el cromosoma 2 de Arabidopsis se muestra, junto con referencias al gen más próximo ubicado río arriba. Se señala la posición del fragmento amplificado de 2522 pb río arriba del miR maduro, que constituye el PmiR164a extenso clonado. Las posiciones están referidas al TSS = sitio de inicio de la transcripción.

Como puede observarse, parte de la secuencia clonada contiene el extremo 3' del gen ubicado río arriba (AT2G47580) ubicada en la posición genómica 19518871 del cromosoma 2, por lo que la probable secuencia promotora del miR164a se reduce a 1847 pb. Usando la base de datos PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) [293] y tomando 1500 pb río arriba del TSS, se identificaron bioinformáticamente elementos regulatorios ubicados en la secuencia clonada, como primera aproximación a la caracterización del PmiR164a. El análisis *in silico* reveló numerosos sitios predichos de unión a factores involucrados en diversas respuestas a luz y a hormonas como MeJA, ácido giberélico (GA) y ABA. Se identificaron elementos vinculados a la regulación mediante factores de transcripción del tipo WRKY (varios de ellos inducibles ante ataque de patógenos y de ácido salicílico) y numerosos elementos *enhancers* de la transcripción (Tabla 2.1).

**Tabla 2.1:** Secuencias canónicas de sitios de unión a factores de transcripción por estímulo predichos en la región promotora de miR164a. Los motivos de reconocimiento teóricos se hallaron usando el programa PlantCare para analizar la cadena positiva. (Se seleccionó una puntuación de matriz  $\geq 5$  para cada elemento).

Estímulo	Nombre del sitio	Descrito por primera vez en (organismo)	Posición	Secuencia
Respuesta a ABA	ABRE	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-878	TACGTG
Regulación de fitocromo	Motivo AAGAA	<i>Avena sativa</i>	-507	GAAAGAA
Parte de un motivo conservado involucrado en respuesta a luz	Box 4	<i>Petroselinum crispum</i>	-1436, -1361, -1171, -1125, -1060, -999, -778, -54	ATTAAT
Elemento de respuesta a luz	Box I	<i>Pisum sativum</i>	-271	TTTCAA
Elemento común en zonas promotoras y <i>enhancers</i>	CAAT-box	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-1147	CCAAT
Respuesta a MeJA	Motivo TGACG	<i>Hordeum vulgare</i>	-829	TGACG
Respuesta a luz	G-Box	<i>Antirrhinum majus</i> <i>Daucus carota</i>	-878 -1372	CACGTA TACGTG
Respuesta a giberelina	P-box	<i>Oryza sativa</i>	-813	CCTTTTG
Motivo requerido para otorgar altos niveles de expresión en endosperma	Motivo Skn-1	<i>Oryza sativa</i>	-1163	GTCAT
<i>Enhancer</i>	Región rica en repeticiones TA	<i>Nicotiana tabacum</i>	-669	TATATATAT ATATATATA TATA
Secuencia consenso de inicio de la transcripción por RNA Pol II	TATA-box		-669, -667, -665, -663, -661, -659, -657, -655, -653, -34	TATA(A/T)A( T/A)A
Respuesta a daño y ataque de patógenos. Unos factores de transcripción de la familia WRKY	W-box	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-809	TTGACC

Por otro lado, al analizar la secuencia de -800 pb río arriba del TSS usando las matrices de pesado posicional (PWMs) [176] se encuentran (aparte de las TATA boxes) 2 motivos en cis: uno de unión a SORLIP2 (5' GGGCC 3') ubicado a -39 y otro, de unión a AtMYC2 BS in RD22 (5' CACATG 3') ubicado a -790. Al buscar en la base de datos AGRIS (<http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/AtcisDB/bindingsites.html>) la función descrita para los TFs cuyas secuencias canónicas de unión se hallaron, se observa que SORLIP2 está relacionado con respuesta a luz mientras que AtMYC2 BS in RD22 con respuestas a estrés por sequía y ABA. Este último forma parte de los 5 TFs que se han hallado sobrerrepresentados en promotores de miRs por sobre los de proteínas [176]. El menor número de sitios encontrado con el algoritmo basado en las PWMs se debe en gran medida al carácter más restrictivo de este análisis con respecto del planteado por el PlantCARE. Tomados en su conjunto, estos datos de análisis in silico de promotores indican un enriquecimiento de secuencias de unión a TFs relacionados con respuesta a estreses y hormonas para el PmiR164a respecto del conjunto de secuencias halladas en promotores de genes codificantes para proteínas, o de secuencias genómicas de Arabidopsis tomadas al azar.

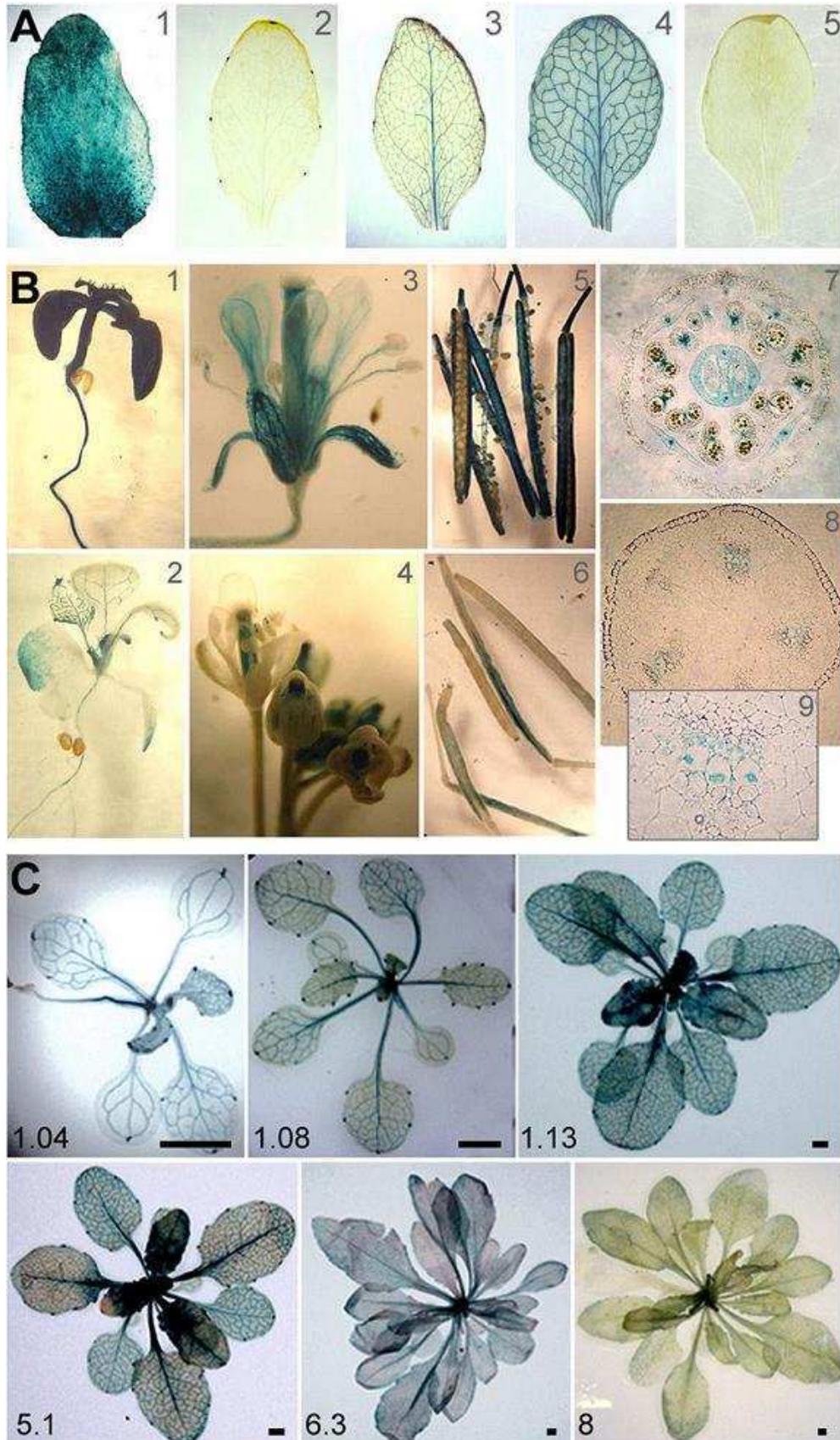
## **2.2 – El PmiR164a se expresa principalmente en el tejido vascular, y su expresión está regulada durante el desarrollo**

Para estudiar la actividad transcripcional normal del PmiR164a, se transformaron plantas de *A. thaliana* que expresaban GUS, producto del transgén *uidA*, bajo su regulación (construcción PmiR164a:GUS). Se usaron como controles positivos y negativos plantas transgénicas conteniendo GUS bajo el control del promotor constitutivo fuerte 35S de CaMV (*Cauliflower mosaic virus*), llamada de aquí en más 35S:GUS, o conteniendo GUS sin secuencias regulatorias río arriba (EV:GUS, EV = *empty vector*), respectivamente. De las 65 líneas transgénicas independientes transformadas con la construcción PmiR164a:GUS, se seleccionaron tres (L35, L50 y L56). Cada una de ellas exhibió diferentes niveles de expresión (L35, baja expresión; L50, expresión media y L56, alta expresión) pero todas mostraron un patrón espacial de expresión similar, según lo visto mediante tinciones histoquímicas (Figura 2.2, A2-A4). La elección de varias líneas independientes sirvió también a la hora de comprobar que los resultados obtenidos no se debían a efectos de la posición de inserción del transgén, sino a respuestas específicas del PmiR164a ante diversos estímulos. Las tres líneas segregaron en la T2 en una relación 3:1, indicando un solo locus de inserción del transgén. Además, una línea representativa de transgénicas 35S:GUS y una de EV:GUS se seleccionaron como controles (Figura 2.2A1 y A5, respectivamente).

Las líneas seleccionadas se llevaron a homocigosis y la presencia de los promotores 35S o PmiR164a y secuencias de GUS fueron verificadas por PCR (experimento realizado por otros integrantes del grupo, no mostrados en esta Tesis). A continuación, se observó la actividad espacial y temporal de GUS en las diferentes líneas transgénicas. La tinción histoquímica reveló actividad de GUS en la vasculatura de la planta (Figura 2.2A2-A4 y B2) y en los hidátodos de las hojas (Figura 2.2A2-A4 y C), como se había descrito previamente [146]. En los órganos reproductivos, la tinción

de GUS se detectó en todos los tejidos compuestos de los carpelos y más fuertemente en su vasculatura (Figura 2.2B4 y B7). Asimismo, las vainas mostraron precipitado de GUS (Figura 2.2B6), así como los pétalos, el tejido vascular del estamen y el septum que separa los lóbulos de cada teca de las anteras (Figura 2.2B7). No se observó tinción de GUS en los sépalos. Al examinar en detalle los tallos, se vio que la actividad GUS estuvo restringida a los vasos del xilema en desarrollo (Figura 2.2B8 y B9).

Se procedió luego a estudiar la expresión del transgén a través del tiempo en tejido de roseta de plantas enteras. Para ello, se procedió a teñir rosetas de plantas de *Arabidopsis* a diferentes estadios de desarrollo, determinados según [215]. Los resultados revelaron que las tres líneas PmiR164a mostraban expresión del transgén desde su etapa de plántulas hasta alrededor del estadio 6.3. La expresión fue máxima alrededor de los estadios 1.12 a 5.1, para luego declinar y hacerse casi indetectable en el estadio 8 de desarrollo (Figura 2.2C). Estos datos sugieren una regulación del PmiR164a a lo largo del desarrollo normal de *Arabidopsis*.



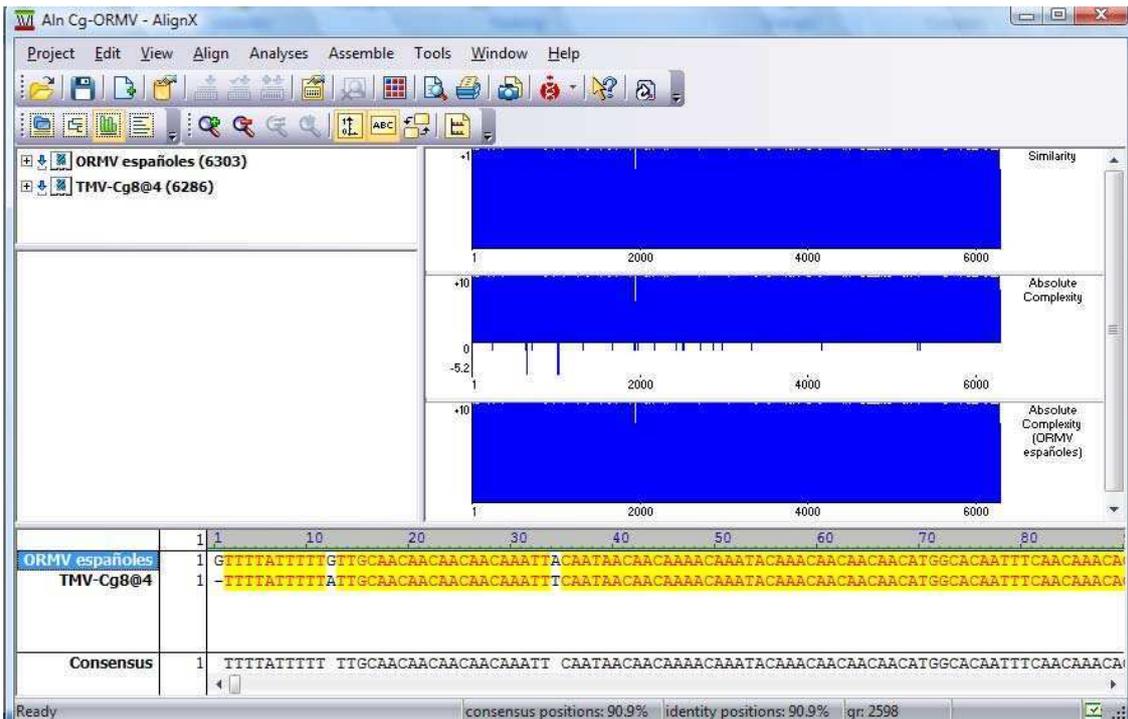
**Figura 2.2.** Patrones espaciotemporales de expresión del gen reportero GUS bajo el control del PmiR164a en plantas de *Arabidopsis* transgénicas (continúa en la página siguiente).

(continúa pie de la Figura 2.2). (A) Hojas de plantas de 4 semanas de las diferentes líneas usadas en este trabajo. A1: Línea control de Arabidopsis transgénica 35S:GUS. A2, A3 y A4: tres líneas independientes de Arabidopsis transgénicas transformadas con la construcción PmiR164a:GUS, mostrando actividad de GUS baja, media o alta (líneas L35, L50 y L56, respectivamente). A5: Línea control EV:GUS de Arabidopsis transgénica, sin detección de GUS. (B) Tinción de GUS de plantas enteras, órganos o secciones de tejidos de líneas transgénicas de Arabidopsis. Se muestran controles 35S:GUS (B1, B3 y B5) y plantas PmiR164a:GUS L56 (B2, B4 y B6 a B9). B2 corresponde a tinción de plantas de una semana, B4 a flores maduras e inmaduras, B6 muestra el detalle de la zona de dehiscencia de las vainas. B7 muestra una sección transversal de la flor, mostrando la actividad del gen reportero en el septo que divide ambos lóbulos de cada teca. En B8 y B9 se ven secciones transversales que exhiben tinción de GUS en los vasos del xilema joven. (C) Actividad del PmiR164a a través del tiempo, detectada mediante tinciones de GUS de rosetas de Arabidopsis de diferentes estadios de desarrollo. Las plantas teñidas estuvieron en el rango de 1.04 a 8 de estadio de desarrollo. Barra = 0.5 cm.

*Paneles A y B, realizados por otros integrantes del grupo.*

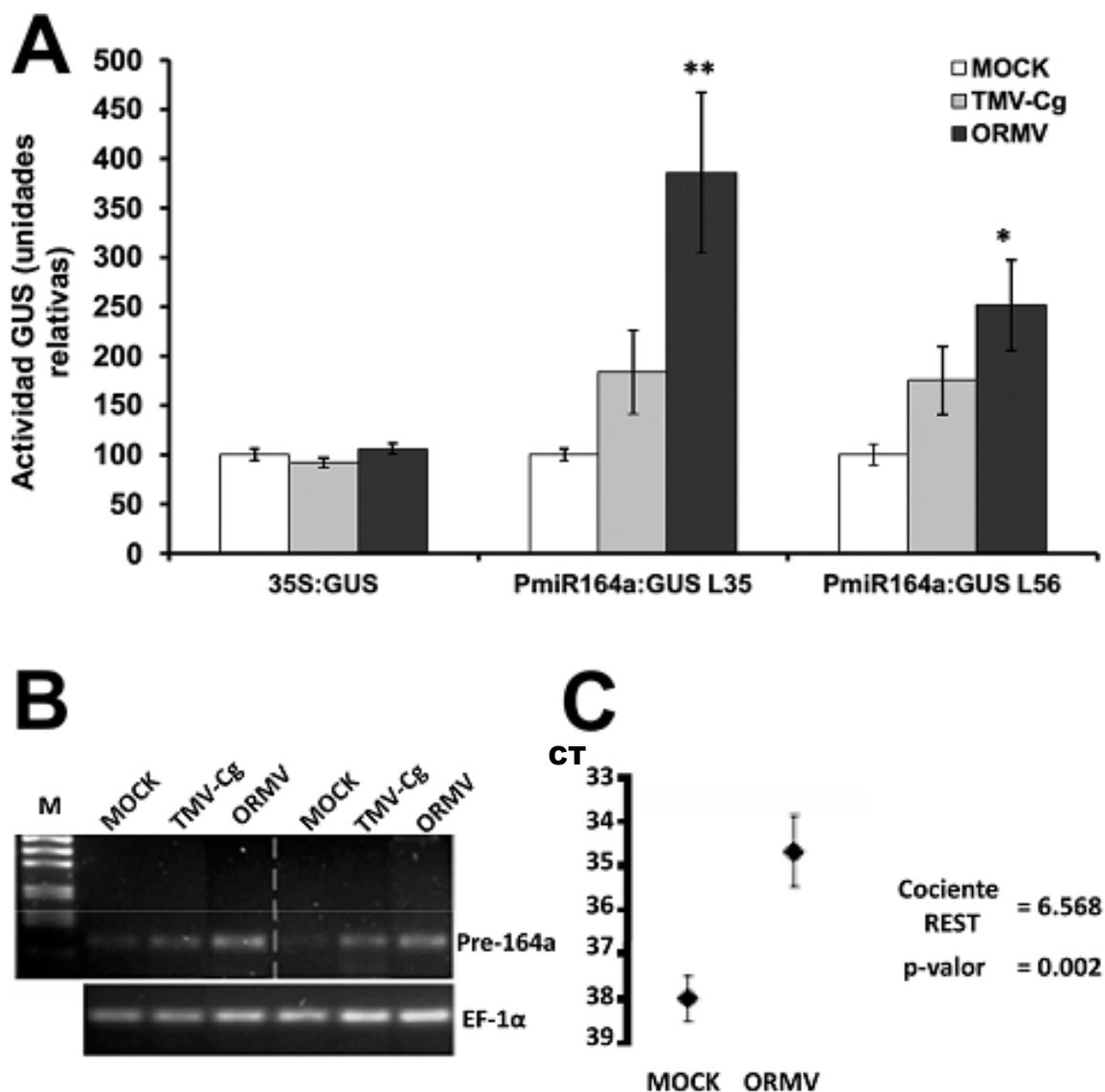
### 2.3 – El PmiR164a es activado por infecciones virales

Previos reportes habían mostrado una acumulación alterada de miRs maduros en plantas bajo el efecto de infecciones virales [189, 288-289, 291]. Con el objetivo de estudiar el efecto de las infecciones virales sobre la vía de los miRs a nivel transcripcional, se procedió a cuantificar la actividad del PmiR164a ante infecciones virales en Arabidopsis. Con este propósito, se realizaron inoculaciones virales (o tratamientos control, de inoculación con solución buffer) de plantas transgénicas para PmiR164a L35 o L56 (para descartar un efecto de posición de la inserción del transgén del T-DNA por el distinto contexto genómico sobre los resultados). Como controles se utilizaron las líneas 35S:GUS y EV:GUS. Los virus escogidos para los tratamientos fueron *Oilseed Rape Mosaic Virus* (ORMV) o TMV-Cg. Estos dos virus se eligieron porque ambos son tobamovirus, cuya familia posee integrantes ya descritos como capaces de alterar el nivel de miRs maduros en plantas de tabaco y Arabidopsis infectadas ([288, 291]). Además, la severidad de síntomas que producen en Arabidopsis es diferente; TMV-Cg presenta síntomas más suaves que ORMV, a pesar de que se ha sugerido que ambos virus son en realidad cepas virales [294-295] por su alto grado de homología de secuencia (Figura 2.3).



**Figura 2.3.** Análisis de homología de secuencia entre ORMV y Cg. Se usó el programa AlignX del Vector NTI, que utiliza ClustalX. Se indica el 90.9% de identidad a nivel nucleotídico hallado.

Estos tobamovirus son de fácil inoculación mecánica, debido a su mecanismo dispersivo natural, por contacto; los porcentajes de inoculación que dan lugar a infecciones establecidas son superiores al 95% en todos los casos, en las condiciones utilizadas, al medir por ELISA la proporción de plantas que resultan positivas. De las plantas inoculadas con virus, sólo las que resultaron positivas por ELISA se utilizaron para posteriores análisis. También se verificó que las infecciones virales no modifican el patrón espacial de expresión de GUS, mediante tinciones histoquímicas. A continuación, se procedió a la extracción de proteínas totales de rosetas enteras de plantas sujetas a los diferentes tratamientos y se cuantificó la actividad GUS mediante fluorimetría en tiempo real (Figura 2.4A). En ella se puede observar que la actividad GUS resultó mayor de manera estadísticamente significativa en plantas infectadas con el virus más severo (ORMV) en ambas líneas PmiR164a:GUS probadas. Con el virus TMV-Cg la alta dispersión de los valores obtenidos determinó que la prueba estadística no resultara significativa ( $p > 0.05$ ), si bien también se observó un incremento consistente en ambas líneas en la actividad GUS. Como se esperaba, la actividad GUS no mostró cambios entre tratamientos en la línea control 35S:GUS, indicando la especificidad de la inducción del PmiR164a ante la infección viral.



**Figura 2.4.** Efectos de infecciones virales sobre la actividad del PmiR164a. Plantas de las líneas transgénicas control 35S:GUS (Panel A), las líneas PmiR164a:GUS L35 (Panel A) o L56 (Paneles A y B) o plantas Col0 sin transformar (Panel C) fueron inoculadas con ORMV (Paneles A, B y C), TMV-Cg (Paneles A y B) o inoculadas con buffer (MOCK) para cuantificar la alteración producida en la actividad del PmiR164a. (A) Gráfico de barras mostrando los valores promedio de actividad de  $\beta$ -glucuronidasa (GUS), expresados como valores relativos de fluorescencia detectados en un ensayo fluorimétrico medido en tiempo real.  $n \geq 10$  para cada grupo y tratamiento. Valores obtenidos a partir de al menos dos experimentos independientes, luego de normalizar y relativizar los valores para cada línea al promedio de los valores obtenidos con tratamiento con buffer (MOCK). Las barras de error indican error estándar (SE). Las comparaciones estadísticas se hicieron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, con la prueba a posteriori de Dunn. \*=  $p < 0.05$ ; \*\*=  $p < 0.001$ . (B) Resultados representativos de RT-PCR del transcrito endógeno pre-miR164a en plantas de la línea L56. Como control interno se amplificó el mRNA del gen *housekeeping* EF-1 $\alpha$ . (C) QRT-PCR de los niveles de pre-miR164a endógeno en plantas *A. thaliana* Col 0 infectadas con ORMV comparadas con el control. El gráfico muestra los CTs normalizados  $\pm$  SE para ambas condiciones analizadas y el cociente del nivel de expresión entre ellas calculado según el algoritmo REST. *Paneles B y C, realizados por otros integrantes del grupo.*

Cabe destacar que durante el proceso de análisis por fluorimetría de la actividad GUS en las diferentes muestras, encontramos dificultades de tipo técnico que

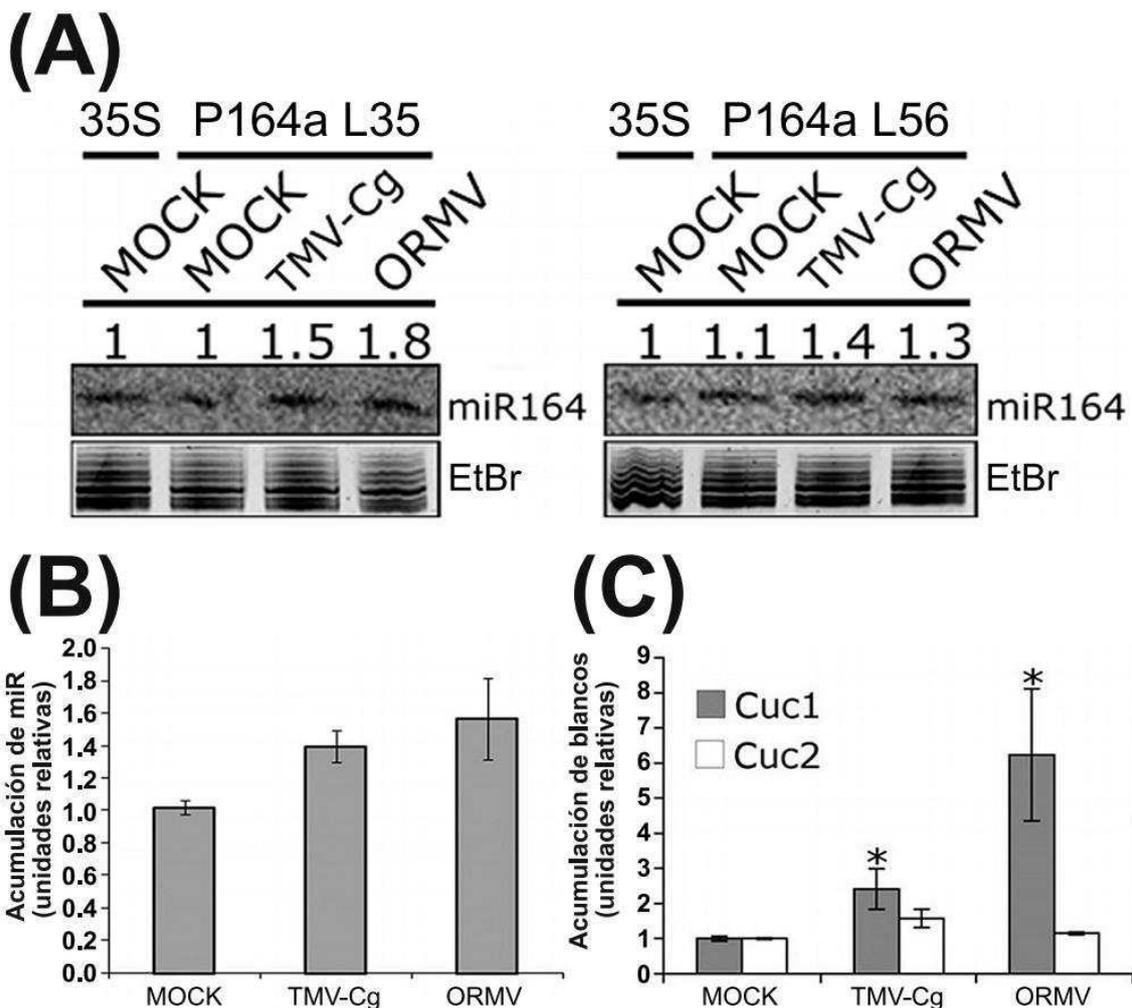
hacían muy difícil mediciones fiables. La resolución del problema quedó a mi cargo, y tras varias pruebas pude concluir que dichas dificultades tenían su origen (al menos en parte) en un enmascaramiento de la fluorescencia, o efecto de *quenching*, sobre el producto fluorescente 4-MU originado por la enzima  $\beta$ -glucuronidasa. Desarrollé un protocolo modificado que permitió obtener resultados reproducibles, minimizando la fuente de error. De este modo, obtuve una solución empírica al problema. Tanto el origen del error previamente observado, como las correcciones adoptadas, estuvieron en línea con dos reportes técnicos [296-297] publicados poco después de nuestro trabajo, en los cuales se aborda de manera específica la problemática referida. El desarrollo de un protocolo modificado fue lo que nos permitió realizar ensayos fluorimétricos en tiempo real de GUS que constituyeron el núcleo de los resultados y conclusiones más relevantes de nuestra publicación [292]. El detalle de los problemas técnicos hallados, los experimentos realizados para superarlos y las conclusiones más relevantes pueden consultarse en el Apéndice A de esta Tesis.

Como evidencia adicional de la activación transcripcional sobre el PmiR164a ante las infecciones con ambas cepas virales, se analizó por RT-PCR a tiempo final el nivel del transcrito pre-miR164a endógeno luego de los tratamientos (Figura 2.4B). Puede observarse un claro incremento de la acumulación del pre-miR164a en plantas infectadas con ORMV, respecto de las plantas control (MOCK) y un incremento menos marcado en las plantas infectadas con TMV-Cg, usando dos réplicas biológicas para cada tratamiento, usando plantas de la línea L56. Similares resultados fueron obtenidos usando plantas de la L35. Cabe destacar que si bien en principio se podrían haber utilizado plantas tipo salvaje (Col0) no transgénicas para estas mediciones, la intención fue la de usar un fondo genómico idéntico para poder comparar directamente diferentes resultados, mostrando diferentes técnicas, que mostrarán el efecto de los tratamientos sobre el PmiR164a.

El análisis cuantitativo del transcrito precursor fue realizado por la técnica de qPCR, y se evaluó el efecto de la infección con ORMV versus control en la cantidad de pre-miR164a en plantas de Arabidopsis Col0 (Figura 2.4C). Los resultados muestran una inducción marcada del precursor ante la infección (más de 6 veces) con una alta significancia estadística del resultado ( $p = 0.002$ ). Tomados en su conjunto, los datos indican que las infecciones virales aumentan la actividad del PmiR164a, evidenciando que los virus son capaces de alterar la vía de los miRs a un nivel transcripcional y que la cepa viral productora de síntomas más severos (ORMV) provoca una inducción más fuerte del PmiR164a.

## **2.4 – Las infecciones virales afectan el nivel de acumulación del miR164 maduro y sus genes blanco**

Luego de comprobar que las infecciones virales inducían un aumento en la actividad del PmiR164a, decidimos averiguar si dicha activación se traducía en una mayor acumulación del miR164 maduro, así como en la medida en que esto podría afectar los niveles de acumulación de mRNAs de sus genes blanco. El nivel de acumulación de miR164 maduro se analizó mediante la técnica de Northern blot y se cuantificó mediante densitometría (Figura 2.5A).



**Figura 2.5.** Efecto de las infecciones virales en la acumulación de miR164 maduro y sus genes blanco. (A) Acumulación de miR164 maduro, medida por Northern blot, en plantas transgénicas L35 y L56 con los tres tratamientos, y en la línea control 35S:GUS inoculada con buffer sólo. Los valores fueron normalizados respecto de la cantidad de rRNA en cada caso, y los valores para plantas infectadas, relativizados respecto de los obtenidos para plantas control (MOCK). (B) Promedios de acumulación relativa de miR164 ante infecciones virales de dos a cuatro réplicas biológicas para cada tratamiento de ambas líneas transgénicas L35 y L56. (C) Acumulación relativa de CUC1 y CUC2, blancos de miR164, ante infecciones virales. Se efectuaron qPCRs de los mRNAs de ambos genes y su cantidad se normalizó respecto del gen *housekeeping* EF-1 $\alpha$ . Luego, los niveles de CUC1 y CUC2 en muestras provenientes de plantas infectadas se relativizaron respecto de los valores obtenidos de muestras provenientes de plantas no infectadas (MOCK). n=4 réplicas biológicas para cada tratamiento. Barras indican SE. (\*) indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.008$ ) en acumulación de mRNA de CUC1 en plantas infectadas con TMV-Cg respecto a controles (MOCK). *Panel C, realizado por otros integrantes del grupo.*

La cantidad de miR164 maduro presente en las muestras provenientes de plantas de la línea 35S:GUS inoculadas con buffer fue arbitrariamente establecida como igual a 1.0 y se utilizó para relativizar miR164a para todos los demás tratamientos. Se cuantificó el nivel de miR164 endógeno de 2 plantas por tratamiento de líneas L35 y L56, para mantener el fondo genético a través de los diferentes análisis. Puede observarse que la cantidad de miR164 maduro es prácticamente la misma en plantas inoculadas con buffer tanto de la línea 35S:GUS como L35 o L56. Tanto para la

línea L35 como para la L56 los resultados indican un aumento de la acumulación relativa de miR164 ante infecciones virales. En la Figura 2.5B, se observa en un gráfico de barras el resultado obtenido al sumar mayor cantidad de réplicas biológicas, promediando los resultados (comparables) conseguidos con las líneas L35 y L56. Ambos tobamovirus inducen la acumulación de miR164 maduro, siendo nuevamente ORMV, el virus más severo, el que produce una acumulación mayor. Esto hace pensar en que la mayor activación transcripcional provocada por ORMV (Figura 2.4A) puede estar causando este efecto, si bien esta conclusión debe matizarse teniendo en cuenta que el miR164 maduro medido tiene contribuciones que corresponden a la transcripción de los genes de miR164b y (en menor medida al ser tejido de roseta) de miR164c.

Finalmente, se analizó el efecto de las infecciones virales en la actividad del miR164 maduro, midiendo la acumulación relativa de dos genes blanco mediante qPCR (Figura 2.5C). Los oligonucleótidos cebadores fueron diseñados a cada lado del sitio de corte del miR164 en los mRNAs de CUC1 y CUC2, de manera de amplificar mensajeros sin cortar. CUC2 no mostró diferencias en su acumulación con ninguno de los dos virus, pero CUC1 mostró un aumento en su acumulación relativa en plantas infectadas, aumento que resultó mucho más marcado en el caso de infecciones con ORMV.

En conclusión, a pesar de que las infecciones con ambas cepas virales inducen la actividad del PmiR164a (Figura 2.4A), la acumulación del pre-miR164a (Figura 2.4B y C) y la acumulación de miR164 maduro (Figura 2.5A y B), los niveles de mRNA de CUC1 también aumentan (Figura 2.5C). Estos resultados sugieren que, a pesar de una inducción inicial del PmiR164a, las infecciones con estos tobamovirus producen como resultado final una reducción de la actividad reguladora de miR164.

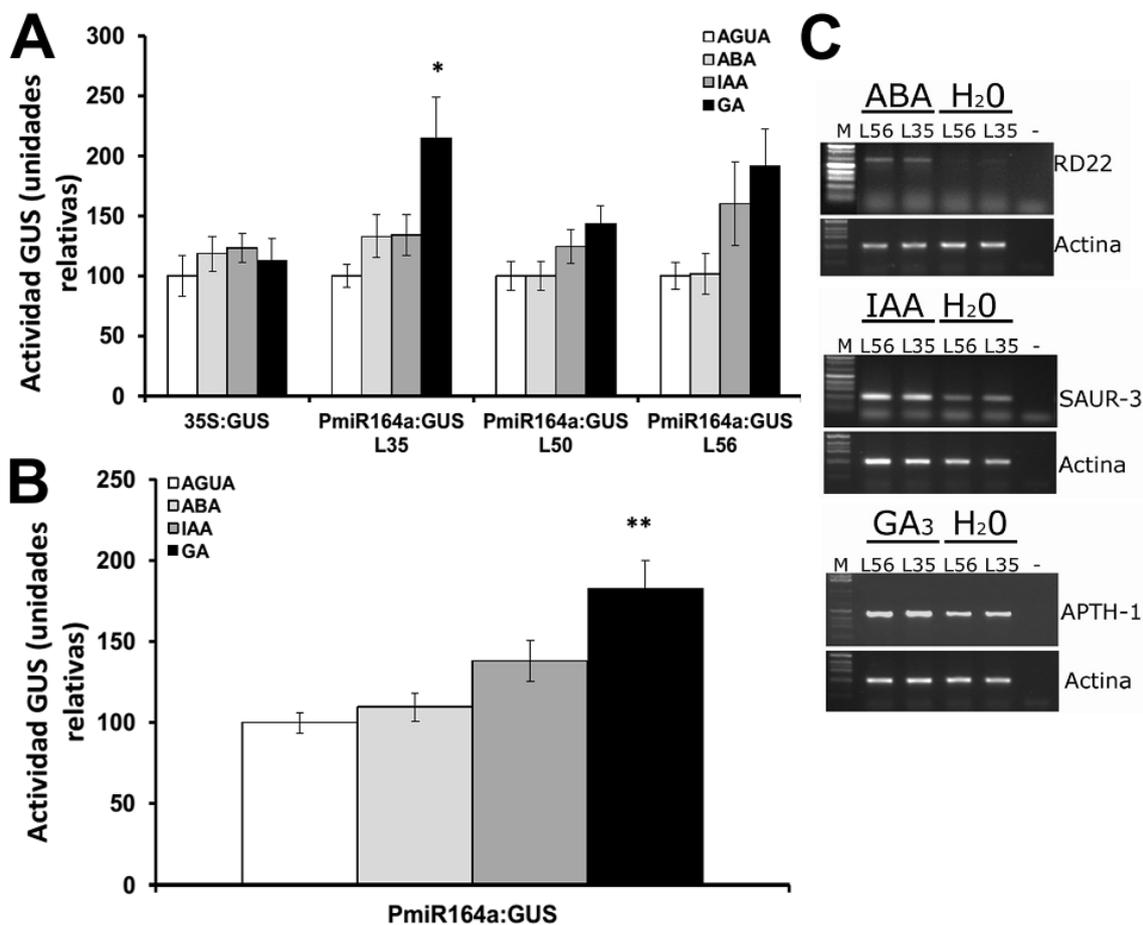
## 2.5 – El ácido giberélico induce la actividad del PmiR164a

El ataque de patógenos, incluyendo virus, modifica los niveles de fitohormonas de las plantas, como ABA, ácido giberélico o auxinas (resumido en [298]), lo cual da lugar a la activación de genes de defensa. Los análisis *in silico* realizados sobre el PmiR164a, a su vez demostraron la existencia de probables sitios de unión a factores de transcripción regulados por estas hormonas (Tabla 2.1). Para ampliar la caracterización del PmiR164a y el conocimiento acerca de su respuesta ante distintos estímulos, así como para estudiar una probable vía mediante la cual el PmiR164a se activa ante las infecciones virales, analizamos la respuesta del mismo ante tratamientos con las hormonas ABA, ácido giberélico (GA3) o auxinas (IAA). A tal fin, se trataron con dichas hormonas plantas transgénicas para el PmiR164a:GUS L35 o L56 así como controles 35S:GUS, esparciendo sobre las rosetas un aerosol conteniendo una dilución de cada una de las hormonas mencionadas o agua solamente, como control. Se verificó que el tratamiento con hormonas no cambiaba el patrón espacial de expresión de GUS en las plantas de líneas transgénicas (resultados obtenidos por otros integrantes del grupo, datos no mostrados en esta Tesis). Luego se procedió con el análisis fluorimétrico para cuantificar la actividad GUS ante distintos tratamientos (Figura 2.6A). Puede observarse que GA3 induce el aumento de actividad del PmiR164a de manera estadísticamente significativa en la L35, mientras que para la L56 la

tendencia es la misma, aunque la prueba estadística arroja  $p > 0.05$ . Similares resultados fueron obtenidos utilizando la L50, de expresión intermedia. Si bien los resultados mostraron una tendencia coherente para las tres líneas transgénicas (inducción del PmiR164a ante el tratamiento con GA3) sólo una de ellas evidenció resultados estadísticamente significativos (L35). A fin de otorgar mayor robustez a las conclusiones de este experimento, decidí analizar los datos de todas las líneas transgénicas en conjunto, comparando entre los diversos tratamientos (Figura 2.6B). Es posible juntar los datos, a pesar de los diferentes niveles de expresión del PmiR164a en las diferentes líneas (Figura 2.2, Panel A2-A4) debido a que los resultados de actividad  $\beta$ -glucuronidasa se reportan normalizados respecto al control (tratamiento con agua) para cada línea y no en unidades absolutas de actividad enzimática. Por otro lado, al haber verificado previamente que los perfiles de cambio de actividad ante tratamientos son similares para las tres líneas y sólo difieren en magnitud (Figura 2.6A), pude asegurarme de estar sumando datos de experimentos comparables. La Figura 2.6B muestra que GA3 claramente induce PmiR164a, de manera muy significativa ( $0.001 < p < 0.01$ ). Los tratamientos con ABA o IAA no alteraron de manera evidente la actividad del promotor. Ningún tratamiento pudo modificar la expresión de GUS en la línea de expresión constitutiva 35S, indicando que este promotor no es sensible al tratamiento con las hormonas ensayadas (Figura 2.6A).

Por otro lado, la efectividad del tratamiento con hormonas se verificó mediante la amplificación por RT-PCR de mRNAs de genes reportados como de respuesta a cada una de las hormonas utilizadas (Figura 2.6C).

De este modo, la principal conclusión de estos experimentos es que GA3 induce la actividad del PmiR164a en Arabidopsis.



**Figura 2.6.** Efecto de los tratamientos con hormonas en la actividad del PmiR164a. (A) plantas de *A. thaliana* transgénicas L35, L50 y L56 y de la línea 35S:GUS control, fueron rociadas con una solución conteniendo las hormonas ABA, IAA o GA3 o agua (control) y la actividad GUS fue cuantificada por fluorimetría en extractos proteicos de rosetas como se describe en la sección de materiales y métodos. Las barras de los gráficos indican los valores medios de actividad. Los valores están normalizados a las plantas tratadas con agua (control de tratamiento) para cada línea.  $12 \leq n \leq 27$  para cada grupo y tratamiento. (B) Datos promedio de los resultados obtenidos para las tres líneas PmiR164a:GUS de forma conjunta, normalizados respecto al tratamiento con agua para cada línea.  $44 \leq n \leq 58$  para cada tratamiento. Se muestran barras de error estándar (SE). Pruebas de Kruskal-Wallis con pruebas a posteriori de Dunn fueron realizadas y las diferencias estadísticas están marcadas con asteriscos: \* =  $0.01 < p < 0.05$ ; \*\* =  $0.001 < p < 0.01$ . (C) Eficacia de los tratamientos con cada una de las hormonas aplicadas. M = marcador de DNA de 1Kpb. (-) indica el control negativo de PCR sin DNA. Ver detalles en la sección de materiales y métodos. *Panel C, realizado por otros integrantes del grupo.*

## Discusión

En el presente capítulo de esta Tesis, se caracterizó el patrón espaciotemporal de expresión del PmiR164a en plantas de *Arabidopsis* mediante el uso de la construcción reportera PmiR164a:GUS, así como su respuesta ante estímulos, en particular infecciones con dos cepas de tobamovirus y diversas hormonas.

MiR164 constituye una familia multigénica de tres integrantes en *A. thaliana*; estudios previamente realizados con mutantes de un solo integrante, dos o los tres, indican una redundancia parcial y una especialización funcional y espacial también parcial entre ellos [144]. Mientras que mutantes nulas *miR164a* presentan aserramiento más acentuado de los bordes de las hojas maduras, fenotipo originado

por la desregulación de CUC2 [146], la mutante *miR164b* fue descrita en plántulas, estadio en el cual no presentaron defectos de desarrollo evidentes [299]. Estos datos, sumados a que la secuencia de miR164a y b maduros es idéntica, llevaron a postular una redundancia funcional entre ambos. Por otro lado, plantas mutantes *miR164c* desarrollan número extra de pétalos [145], fenotipo que es fuertemente acentuado en la triple mutante *miR164abc* [144], indicando una redundancia parcial en la función de los tres miRs en inflorescencias, pero con rol preponderante de miR164c.

En el presente trabajo, el análisis de expresión espacial del PmiR164a (Figura 2.2, Panel B) coincidió en parte con dominios tisulares en los cuales previamente se había detectado actividad del mismo, como la vasculatura de flores y hojas y los órganos reproductivos [144, 146, 300]. Los dominios de expresión del miR164a son parcialmente solapantes con los del miR164c, pero diferentes de los del miR164b, el cual está excluido de los tejidos meristemáticos [300]. Sin embargo, los tres integrantes son capaces de regular todos sus mRNAs blanco descritos hasta el momento, tanto en tejidos reproductivos como vegetativos [144].

El estudio de la expresión del PmiR164a más allá del estadio de plántulas, incluyendo los tejidos plenamente desarrollados (Figura 2.2) nos permitió completar el perfil espacial de expresión de este gen respecto de los citados reportes previos, principalmente acotados en su estudio a los eventos tempranos de desarrollo y por ende, a estadios de desarrollo incipientes de los tejidos. Además, se realizó un análisis temporal mucho más extenso de la actividad del PmiR164a en tejidos foliares (Figura 2.2C). El mismo cubrió desde las etapas iniciales del desarrollo de la plántula, hasta estadios en los cuales la planta entra en senescencia. Una observación de importancia fue la detección de niveles máximos de actividad del PmiR164a en el tejido vascular de las plantas entre los estadios de desarrollo 1.12 a 5.1. Esta etapa corresponde a la transición vegetativa/reproductiva [215], durante la cual se producen importantes cambios en niveles relativos de hormonas, en la preferencia de destino de fitoacumulados y otros cambios fisiológicos de relevancia. Esta transición también es relevante para las interacciones planta-virus, incluyendo el patosistema Arabidopsis-ORMV, ya que se produce detención de la replicación viral y cambio de localización tisular [301]. El patrón de expresión “de más a menos” hallado para el PmiR164a, y la fuerte reducción en la actividad GUS detectada en estadios más tardíos, como el 8.0 (Figura 2.6C), coinciden bien con el perfil de acumulación reportado para el miR164 maduro a lo largo del desarrollo foliar normal de Arabidopsis. Como regulador negativo de ORE1, un factor de transcripción NAC asociado a senescencia, la acumulación de miR164 maduro desciende a etapas tardías del desarrollo, coincidiendo con la entrada en senescencia [172].

El análisis *in silico* de la secuencia promotora del miR164a (Figura 2.1 y Tabla 2.1) mediante el programa PlantCARE muestra que la misma presenta sitios de unión a factores proteicos vinculados a respuestas a dos de las hormonas utilizadas en el presente estudio (ABA y GA3). Mientras que la aplicación de ABA no produjo cambios perceptibles en la actividad del PmiR164a, GA3 indujo fuertemente su expresión (Figura 2.6A y B). La falta de respuesta ante el tratamiento con ABA puede explicarse de varias maneras. La respuesta del PmiR164a ante la aplicación de ABA podría estar dada en otros tejidos, pero no en roseta. Es posible también que el estadio de desarrollo en el cual el PmiR164a es sensible al tratamiento con ABA sea diferente del

utilizado en los ensayos. O la secuencia promotora podría necesitar otros estímulos además de ABA para cambiar su actividad. Por otro lado, al análisis más estricto mediante el uso de PWMs también encontró una secuencia promotora vinculada con regulación mediante ABA. Sin embargo, es importante notar que estas predicciones bioinformáticas son siempre tentativas, y que deben ser corroboradas por experimentos para ser validadas. En el presente trabajo, estas predicciones no se verificaron para el caso de ABA, pero sí para GA3, demostrando que el PmiR164a es sensible al tratamiento con hormonas.

PmiR164a no presenta motivos predichos de unión a factores de respuesta a auxinas (Tabla 2.1 y resultados obtenidos utilizando PWMs). Sin embargo, se caracterizó la respuesta del PmiR164a a estas hormonas (IAA) ya que está reportado un aumento en acumulación de miR164 maduro (y una concomitante reducción del mRNA del gen blanco NAC1) en raíces de *Arabidopsis* tratadas con NAA, otra auxina [302], lo cual hace razonable pensar en un efecto de activación transcripcional sobre al menos un integrante de la familia miR164. Por otro lado, está reportado previamente que miR393a regula genes de respuesta a auxinas, aumentando los niveles de resistencia a bacterias patógenas, en los que fueron los primeros reportes que indicaron un nexo entre ataque de patógenos, inducción de un miR y efecto sobre la resistencia en plantas [231-232]. Además, las infecciones virales con tobamovirus habían mostrado previamente la capacidad de alterar niveles de varios miRs maduros, entre ellos miR160 y miR167, cuyos genes blanco (de la familia ARF de TFs) están directamente involucrados con la respuesta a auxinas [288] y las auxinas parecen determinar al menos en parte los síntomas de infección disparados por tobamovirus [303-304]. La aplicación de auxinas, sin embargo, no resultó más que en un leve incremento de los niveles promedio de actividad del PmiR164a, sin significancia estadística (Figura 2.6A y B). Nuevamente, los argumentos expuestos más arriba para explicar la ausencia de cambios ante el tratamiento con ABA pueden esgrimirse; sin embargo, para el caso de las auxinas, la ausencia de motivos predichos en secuencias promotoras podrían estar indicando que el PmiR164a de hecho no responde a estas hormonas. El hallazgo mediante uso de PWMs de que PmiR164b y PmiR164c poseen un sitio de unión ARF ([176] y elaboración propia, ver más adelante en esta Tesis) en sus promotores, podría indicar que estos integrantes de la familia multigénica son los responsables de la acumulación del miR164 maduro ante la aplicación exógena de auxinas previamente reportada [302], sin un rol para el miR164a en dicha respuesta. En caso de comprobarse esta hipótesis, sería un interesante refuerzo para la teoría de subfuncionalización de la familia miR164 [144].

El hallazgo de que las infecciones virales pueden alterar la actividad del promotor de un miR (Figura 2.4) suma un nivel más de complejidad a la respuesta de las plantas ante los virus. Entre los eventos moleculares disparados por las infecciones virales se pueden mencionar cambios en la expresión génica de la planta, en el metabolismo y el desarrollo [7, 69, 305-308]. Algunos de estos procesos pueden ser necesarios para la replicación y dispersión viral, otros pueden ser adaptativos como defensa para la planta, y otros pueden simplemente ser un efecto colateral de la invasión viral. A su vez, estos cambios a nivel molecular y bioquímico pueden ser la causa de los síntomas ocasionados por los virus en su huésped. Los miRs han emergido como candidatos a modular este tipo de respuestas ante la invasión viral, por su

conocido rol en la morfogénesis de órganos de plantas, así como por su acumulación diferencial ante infecciones virales diversas [200-201, 288, 291]. Se ha visto que factores proteicos virales, los VSRs, con capaces de alterar la acumulación de miRs, y esto se relaciona con el desarrollo de evidentes síntomas en las plantas afectadas, a niveles de morfología foliar y desarrollo reproductivo [189, 236]. Los mecanismos postulados por los cuales las infecciones virales o la expresión transgénica de VSRs causan cambios en la acumulación o la actividad de los miRs involucran por lo general regulaciones del tipo post-transcripcional de los mismos [189, 236, 287-288, 291]. Esto implica que dichos procesos tendrían lugar en el citoplasma, luego del procesamiento de los precursores por DCL1 y otros factores proteicos y su exportación a través de los poros nucleares. Este trabajo demostró por primera vez que las infecciones virales pueden afectar el nivel de acumulación de miR164 maduro a través de la modificación de la actividad del PmiR164a, revelando un nuevo mecanismo de interferencia viral en la biogénesis y acumulación de miRs en plantas.

A pesar de que la mayor acumulación del pre-miR164a detectada ante infecciones con ORMV (Figura 2.4B y C) podría ser también el resultado de un cambio en la velocidad nuclear de procesamiento del precursor, es improbable que este mecanismo sea el causante único de dicha acumulación. La actividad GUS aumentada detectada en las líneas PmiR164a L35 y L56 (Figura 2.4A) indica que la infección viral puede directa o indirectamente interferir con la regulación transcripcional del promotor, aunque no se puede descartar que hubiera un efecto adicional de afectación del procesamiento del pre-miR164a. El análisis por qPCR de acumulación del pre-miR164a (Figura 2.4C) muestra en plantas Col0 tipo salvaje una acumulación cerca de 6 veces mayor en plantas infectadas con ORMV, indicando también que la inducción observada en las líneas transgénicas L35 y L56 no correspondía a un efecto espurio de la utilización de dichas plantas o de la inserción del transgén. Estos experimentos muestran que los efectos transcripcionales deben ser tenidos en cuenta a la hora de analizar las causas del cambio en acumulación de miRs observado en plantas ante infecciones virales. Esto está en línea con reportes previos que habían mostrado que en plantas de *Arabidopsis* mutantes *hst-15* (en las cuales la capacidad de exportar miRs maduros desde el núcleo hacia el citoplasma está comprometida) el tobamovirus cr-TMV induce la acumulación de miRs maduros [309]. Como los tobamovirus replican en el citoplasma, estas observaciones podrían indicar que la inducción transcripcional podría estar jugando un rol en la acumulación de miRs maduros observada luego de la infección, además del mecanismo de secuestro de miRs maduros ya descrito para VSRs citoplasmáticos.

Los resultados obtenidos indican que la alteración de la actividad del PmiR164a es mayor con el virus que produce los síntomas más severos, ORMV (Figuras 2.4A y B). También con este virus el nivel de alteración de la acumulación observado para el miR164 maduro y el mRNA de su gen blanco CUC1 es el más alto (Figura 2.4C y Figura 2.5). Por otro lado, la infección con TMV-Cg aumentó en menor medida (o no produjo cambios en) la actividad del PmiR164a, la acumulación de miR164 maduro o la de mRNA de CUC1. Estos resultados parecen indicar una correlación entre el nivel de severidad de la infección ocasionada por el virus y el nivel de alteración sufrida por la vía de los miRs y apoyan la idea de que los miRs juegan un rol en la determinación de la sintomatología desarrollada en plantas infectadas. Estos resultados están de

acuerdo con reportes previos obtenidos infectando tomate con dos cepas de CMV (una severa y otra leve) que mostraron una alteración diferencial de miRs maduros y de varios genes blanco claves para el desarrollo [310]. Dicha alteración resultó en general mayor en plantas infectadas con la cepa severa y los factores de transcripción blanco de los miRs más alterados resultaron ser aquellos con roles en la determinación de la morfología foliar. El hecho de que los virus que producen los síntomas más severos sean aquellos que producen los efectos más acusados en la acumulación de mRNAs de genes clave en desarrollo, posee pleno sentido desde el punto de vista fisiológico.

Un resultado llamativo consistió en el descubrimiento de que, a pesar de acumular mayores niveles de miR164 maduro, las plantas infectadas con ORMV presentaban también mayor acumulación de mRNA de CUC1 (Figura 2.5). A la fecha, no se han reportado casos de miR164 actuando como inhibidor de la traducción. Sin embargo, se ha mencionado en la Introducción de esta Tesis que se ha sugerido que el corte, irreversible, sería más común en tejidos en activa diferenciación, mientras que la inhibición de la traducción podría ser un fenómeno transitorio vinculado con, por ejemplo, respuestas a estrés [140]. Otra explicación al fenómeno observado puede intentarse desde el punto de vista de la interferencia clásica de los virus con la vía del silenciamiento, y con la acumulación de sRNAs en general. La reducción en la actividad observada de los miRs ha sido repetidamente señalada como causada por las proteínas VSRs [236, 287]. Las mismas suelen actuar interfiriendo el complejo RISC ya ensamblado [125]. La actividad supresora de tobamovirus se ha localizado en la proteína p126k de TMV; uno de los varios modos de acción propuestos en la actualidad es a través de la unión a dsRNA cortos antes de ser cargados a RISC [309, 311]. Esta unión, y la consecuente estabilización del miR sin actividad catalítica, podría explicar las observaciones reportadas en este trabajo al respecto.

Debido a que no se conocen casos de proteínas de tobamovirus localizadas en el núcleo celular, el mecanismo de activación del PmiR164a mediada por las infecciones virales probablemente sea indirecto. Es en este sentido en el cual las posibles modificaciones de las fitohormonas que se produzcan por la invasión viral pueden estar jugando un rol en la activación de dicho promotor. Por ejemplo, hay reportes que indican que ante la infección por TMV, reguladores de la respuesta a auxinas se traslocan al núcleo, en donde inducen cambios en la transcripción de genes vinculados al desarrollo [303-304]. Se conoce el rol de varios miRs en la regulación de genes relacionados con respuestas a hormonas, como claves en respuestas de determinación del desarrollo, pero también ante estreses bióticos y abióticos [216]. Estas interacciones aparecen como probables mecanismos regulatorios maestros de la expresión génica ante situaciones en las cuales se redirecciona el esfuerzo fisiológico y metabólico de la planta de manera radical. Por otro lado, también es posible hipotetizar un mecanismo de regulación mediante retroalimentación del PmiR164a, mediado por la abundancia de mRNA de CUC1. En este escenario, la reducción de la actividad de miRs por la acción de VSRs induciría una acumulación de mRNA blanco, la cual a su vez podría ser el disparador del PmiR164a. Si este fuera el caso, en el presente estudio cabe señalar que la mayor síntesis de miR164a no alcanza a sobrepasar la capacidad de secuestro de sRNAs del VSR de ORMV, ya que el efecto neto observado sobre mRNA de CUC1 es de sobreacumulación. Asimismo, hay que tener presente que tanto los miRs como sus genes blanco se expresan en dominios

tisulares específicos en etapas particulares del desarrollo, proceso particularmente bien estudiado para miR164 y sus genes blanco de la familia CUC [144-146, 300]. Poco ha sido estudiado de estas interacciones más allá del estadio de plántula, y en nuestro estudio plantas enteras fueron utilizadas para los análisis de actividad del PmiR164a y de acumulación del miR maduro, su precursor y sus genes blanco. Esto evidencia la posibilidad de que CUC1 y miR164a estén ambos inducidos en tejidos diferentes, escapando CUC1 de la regulación esperada ante la acumulación de más miR164 maduro.

Estas hipótesis necesitan de más experimentos para verificarse, como pueden ser la medición directa en plantas infectadas con ORMV de hormonas clave en procesos de senescencia y respuesta a patógenos (SA, MeJA, ABA, IAA) o GA3, que demostró ser capaz de inducir fuertemente el PmiR164a. En este sentido, la utilización de plantas mutantes, como *aos* (que no producen ningún metabolito de la vía del MeJA) o *NahG* (que degradan SA y no permiten su acumulación endógena), podrían determinar la dependencia de este tipo de respuestas de ciertas hormonas. Asimismo, la utilización de otros virus podría ser útil para intentar verificar la generalización de este tipo de respuestas.

La acumulación del miR164 maduro resulta del procesamiento de los precursores de los tres integrantes de la familia en *Arabidopsis* (miR164a, b y c). Los análisis por northern blot probablemente reflejen el aporte de los tres miRs (debido a la casi exacta homología de secuencia entre los tres miR164 maduros), lo cual dificulta la cabal comprensión del aporte de la activación del PmiR164a al conjunto de miR164 maduro. Los análisis de los promotores de los PmiR164b y c, la cuantificación por tiempo real de los precursores de los mismos, así como la determinación de las contribuciones relativas de cada precursor al total, permitirían completar mucho más el panorama de la respuesta disparada por virus que involucra al miR164 y sus genes blanco, tanto en desarrollo como en senescencia. Este trabajo, que subraya por primera vez la importancia de la respuesta transcripcional de un PmiR ante el ataque de patógenos, abre un camino en esa dirección. Los experimentos posteriores que sigan la dirección de este trabajo, deberán encaminarse a establecer el mecanismo de acción por el cual los virus pueden afectar transcripcionalmente la vía de biosíntesis de miRs en plantas, así como la relevancia biológica para la interacción virus-planta que dicha inducción implica.

## Conclusión

Este trabajo demostró por primera vez que, además de los previamente descritos efectos post-transcripcionales sobre la acumulación de miRs maduros ante la infección viral (dependientes de VSRs), existe un elemento de inducción transcripcional que afecta la acumulación de un miR maduro ante dichas infecciones. El análisis del PmiR164a permitió identificar motivos relacionados con respuesta a la hormona GA3, la cual efectivamente indujo la actividad de dicho promotor.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Construcciones génicas y obtención de plantas transgénicas

La obtención de plantas transgénicas poseyendo el promotor del miR164a de *A. thaliana* o el 35S de origen viral río arriba del gen bacteriano *uidA* que codifica para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (GUS), así como de las plantas control que no expresan GUS (EV:GUS) fueron realizadas por otros integrantes del equipo de trabajo. Aquí efectúo una breve descripción a los fines de la mejor comprensión del trabajo realizado en esta Tesis.

Para obtener el PmiR164a:GUS y la construcción vacía equivalente de control (EV:GUS), se amplificó un fragmento de 2522 pb río arriba de la estructura plegada del miR164a (AT2G47585) a partir del DNA genómico de *A. thaliana* ecotipo Col0. Se usaron cebadores específicos del promotor de dicho miR tanto en sentido (conteniendo un sitio de restricción de PstI) como antisentido. El fragmento amplificado fue clonado en un plásmido pGEM-T Easy (Promega) y secuenciado para confirmar identidad e integridad. El inserto fue cortado con la enzima EcoRI y clonado en dicho sitio del plásmido pAKK 1431, río arriba del gen *uidA* para producir el PmiR164a:uidA y el anti-PmiR164a:uidA. Se verificaron las orientaciones del inserto y las versiones sentido y antisentido del plásmido recombinante intermediario fueron cortadas con la enzima PstI. El inserto fue luego subclonado en el sitio de corte de PstI del plásmido pCambia2300 (<http://www.cambia.org/daisy/cambia/2066.html?bra>), dando origen al PmiR164a:GUS y al EV:GUS, respectivamente. Todas las construcciones fueron electroporadas en bacterias *Agrobacterium tumefaciens*, cepa GV3101. Plantas de *A. thaliana* ecotipo Col0 fueron transformadas utilizando el método de inmersión floral [312] y las plantas individuales transgénicas fueron seleccionadas por resistencia a kanamicina y tinción histoquímica positiva para GUS. Adicionalmente, se verificaron mediante análisis por PCR utilizando cebadores específicos para comprobar presencia y dirección de los insertos de secuencias promotoras, así como presencia del gen *uidA* originario del plásmido pAKK 1431. Como control interno, se amplificó por PCR el gen endógeno de *Arabidopsis actina-2* (AT3G18780).

### Material vegetal y ensayos de infecciones virales

Las plantas *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col0 y transgénicas T3 fueron crecidas en cámaras de crecimiento bajo condiciones estándar (fotoperiodo 16:8 h, T (°C)= 23/21 durante periodos de día/noche, respectivamente) durante 4 a 5 semanas. La intensidad de luz a la altura de la roseta fue de 100-120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Los aislados virales TMV-Cg y ORMV se mantuvieron en plantas *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col0. Las plantas transgénicas expresando el gen *uidA* o los controles EV:GUS fueron infectadas con alrededor de 5  $\mu\text{L}$  por planta de extracto de tejido de plantas Col0 infectadas previamente con los aislados virales TMV-Cg u ORMV, triturado con buffer  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM, pH = 7. Se les agregó carborundo de grado fino y se raspó manualmente con cuidado para favorecer la entrada de partículas virales al tejido

foliar. En el caso de controles mock-inoculados, el tratamiento fue similar pero el inóculo consistió exclusivamente en 5  $\mu$ L de buffer. Las muestras fueron tomadas a 7 dpi en el caso de plantas inoculadas con ORMV, o 9 dpi (plantas tratadas con TMV-Cg). La infección de las plantas fue verificada mediante ELISA.

### **Cuantificación de proteínas**

La determinación de la concentración de proteínas totales se realizó utilizando el *Bio-Rad protein assay* de Bio-Rad, basado en el método de Bradford [313], según las especificaciones del fabricante. La proteína de las curvas de calibración fue BSA, la cual se diluyó en cada caso en el buffer de extracción pertinente. Se utilizaron placas transparentes de 96 pocillos de Greiner Bio-one. Un espectrofotómetro Multiskan Spectrum (Thermo Corporation) fue usado para medir absorbancia a 595 nm.

### **Detección por DAS-ELISA de CP virales**

Para realizar la detección por DAS-ELISA de CP de ORMV y Cg se utilizó el kit anti-RMV de Agdia/Biofords y para la detección de CP de TuMV se utilizó el kit anti-Potyvirus de BIOREBA, en ambos casos siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Se utilizaron placas transparentes de 96 pocillos de Agdia/Biofords (detección de CP de ORMV y Cg) y placas Nunc MaxiSorp® (detección de CP de TuMV). Un espectrofotómetro Multiskan Spectrum (Thermo Corporation) fue usado para medir absorbancia a 405 nm.

### **Ensayos histoquímicos y fluorimétricos de actividad $\beta$ -Glucuronidasa (GUS)**

Los ensayos histoquímicos cualitativos de actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) y los ensayos fluorimétricos cuantitativos de la misma, fueron realizados como está previamente reportado ([314]). Como sustratos enzimáticos para tinción histoquímica o ensayo fluorimétrico se utilizaron X-glu (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-glucurónico, Inalco S.P.A., Milán, Italia) o 4-MUG (4-metilumbeliferil-  $\beta$ -D-glucuronido, Fluka, BioChemika, UK), respectivamente. En este último caso, una curva estándar con el producto de la reacción 4-MU (4-metilumbeliferona de sodio) se utilizó para calibrar. Para los ensayos fluorimétricos, la técnica se adaptó para el uso en una placa FLUOTRAC™ 200 de 96 pocillos opaca color negro (Greiner Bio-one) para una medición en tiempo real de la fluorescencia de 4-MU, producto de la actividad enzimática, en un espectrofluorómetro SpectraMax® GEMINI EM (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA). Los datos fueron extraídos utilizando el software Soft Max Pro 5. Para un protocolo detallado de la puesta a punto del procedimiento de medición fluorimétrica, ver el Apéndice A en esta Tesis.

Para analizar la expresión espaciotemporal del gen *uidA* en plantas PmiR164a:GUS, hojas individuales o rosetas de plantas enteras a diferentes estadios de desarrollo fueron colocadas en cajas de Petri de 6 cm de diámetro y se cubrieron con

solución de tinción histoquímica de GUS (X-Glu 0,5 mg/mL,  $H_2Na_2PO_4$  100 mM, EDTA 10 mM, ferrocianuro de potasio 5 mM, ferrocianato de potasio 5 mM, Tritón X-100 0,1% , pH = 7). Luego, se incubaron a 37 °C durante 18 h con agitación suave y se observó la presencia de un precipitado azul sobre el tejido. Las reacciones se detuvieron mediante la remoción de la solución de tinción y su reemplazo por la adición de etanol:agua 70% y luego 96% (v:v). Se realizaron repetidos lavados hasta blanquear las hojas, removiendo los pigmentos orgánicos.

### Tratamientos con hormonas

Se utilizaron plantas de las tres líneas transgénicas (164 L35, L50 y L56 expresando GUS), un control positivo de línea transgénica sobreexpresando el gen *uidA* bajo el promotor viral 35S (35S:GUS) y la línea transgénica transformada con vector vacío (EV:GUS), todas homocigotas T3. Se aplicaron en aerosol las hormonas a las rosetas de las plantas de 4-5 semanas antes de la transición al estadio reproductivo. En cada caso, se aplicaron (por planta) 0.5 mL en aerosol de 100  $\mu$ M ácido abscísico (ABA), 100  $\mu$ M ácido indolacético (IAA), 50  $\mu$ M ácido giberélico (GA3) o agua pH = 7 y las plantas se incubaron durante 6 h. Luego, se separaron al menos 4 plantas de cada línea y tratamiento para realizar una tinción histoquímica de GUS de acuerdo a un reporte previo ([314]), para verificación, mientras 12 plantas de cada línea se muestrearon para congelar inmediatamente en  $N_2$  (l) y almacenar posteriormente las muestras a -80 °C hasta su utilización para extracción de RNA o proteínas totales. Al menos 2 ensayos independientes se realizaron para cada línea transgénica y las líneas control 35S:GUS y EV:GUS. Se calcularon los valores promedio de las fluorimetrías para cada tratamiento luego de normalizar los datos al promedio de las plantas control inducidas con agua para cada línea. La efectividad de cada tratamiento fue confirmada mediante RT-PCR usando APT1 (AT1G27450), el cual es inducible por GA3 [315], RD22 (AT5G25610), inducible por ABA [316] o SAUR-AC1 (S70188), inducible por IAA [317]. El gen actina-2 (AT3G18780) fue amplificado en este caso como control (ver Figura 2.6C).

### Cuantificación de miR maduro por Northern blot

La fracción de sRNAs totales conteniendo miRs maduros fueron extraídos a partir de conjuntos de al menos tres hojas de roseta de *Arabidopsis* usando el kit comercial mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion®). Luego, se cuantificó la cantidad de sRNAs extraídos mediante el uso de un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Las muestras se diluyeron hasta alcanzar todas similares concentraciones para homogeneizar la carga inicial y a continuación 20  $\mu$ g de sRNAs fueron sembrados en geles de PAA al 17% con urea 7 M. Después de la electroforesis, los sRNAs fueron transferidos a una membrana Gene-Screen Plus (Perkin Elmer Life Sciences, USA). Se marcaron sondas homólogas al miR164a maduro de *Arabidopsis* usando [ $\gamma$ 32P] ATP y PNKinase. La sonda marcada fue separada del [ $\gamma$ 32P] ATP sin incorporar mediante el Qiaquick Nucleotide Removal kit (QIAGEN). El oligonucleótido con marca incorporada fue incubado con la membrana en buffer conteniendo 3 $\times$  SSC,

5/ SDS y 10× de solución de Denhardt a 50 °C durante 16 h. Se lavó la membrana 2 veces con el mismo buffer de incubación por más de 30 minutos y se dejó en exposición por una noche. La intensidad de cada banda se cuantificó usando un aparato Typhoon Trio (Amersham Biosciences, USA). El mismo fue también usado para calcular la carga total de RNA de cada pocillo mediante el escaneo (previo a la transferencia a la membrana) del gel teñido con bromuro de etidio y detección de bandas de rRNA. Los datos de estos análisis se utilizaron para normalizar la intensidad de la marca radioactiva de cada banda, basado en la cantidad total de sRNAs cargados en cada pocillo. El valor para la cantidad de miR164 maduro detectado en muestras provenientes de plantas mock-inoculadas fue establecido arbitrariamente como igual a 1.0 y los demás datos se calcularon relativos a este valor en base a su intensidad relativa.

### **Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)**

Se aisló RNA total a partir de conjuntos de hojas de tres plantas de *Arabidopsis* usando RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), se cuantificó usando NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) y se trató con DNase I (Invitrogen). La primera cadena de cDNA se sintetizó utilizando Superscript III (Invitrogen) y oligo d(T)20, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cebadores utilizados en qPCR se diseñaron de manera tal que amplificaran un fragmento del mRNA blanco conteniendo el sitio de reconocimiento complementario del miR164. Los experimentos fueron realizados usando 4 réplicas biológicas en un equipo de análisis de qPCR Applied Biosystems 7500. El gen de referencia usado fue el factor de elongación 1 $\alpha$  de *Arabidopsis* (EF-1 $\alpha$ , AT5G60390). La obtención de valores promedio y errores estándar ( $\pm$  SE) se lograron mediante el uso de un algoritmo desarrollado a tal efecto y reportado previamente ([318]). A continuación, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar la existencia de diferencias significativas estadísticamente en los niveles de expresión de genes blanco de miRs en muestras sujetas a tratamiento versus los controles. Para ello se usó el paquete estadístico de InfoStat (InfoStat (2008). InfoStat versión 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Valores de  $p < 0.05$  se consideraron significativos estadísticamente.

Para la detección por RT-PCR del fragmento de 91 pb del pre-miR164a se sintetizó el cDNA como se describe más arriba para el procedimiento de qPCR. El ciclo de PCR consistió en 94 °C por 5 min seguido por 35 ciclos de 94 °C 30 s; 60 °C 30 s, 72 °C 30 s.

### **Análisis estadísticos**

Las comparaciones estadísticas de actividad GUS relativa entre los diferentes tratamientos (infecciones virales y tratamientos con hormonas) fueron llevadas a cabo mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con la prueba a posteriori de Dunn usando el programa GraphPad Prism versión 5.03 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) y el paquete estadístico de

InfoStat (InfoStat (2008). InfoStat versión 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

### **Cebadores para PCR y qPCR**

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para PCR, RT-PCR y qPCR se diseñaron utilizando el programa Primer Express 2.0 (Applied Biosystems). Están listados en las Tablas F1 y F2 del Apéndice F de esta Tesis.

### **CAPÍTULO 3: LA ACUMULACIÓN DE MIRS MADUROS EN TEJIDOS SISTÉMICOS DE *N. TABACUM* INFECTADAS CON TMV SIGUE UN PERFIL TEMPORAL BIFÁSICO.**

Como fue mencionado en la Introducción de esta Tesis, la interacción planta-virus da lugar a una serie de mecanismos de defensa en los cuales las fitohormonas juegan un rol preponderante, pudiendo producir la detención de la replicación viral o el confinamiento a unas pocas células (HR), o el montaje de una respuesta de SAR, mediante la cual tejidos sistémicos que no han entrado en contacto con el virus, adquieren resistencia en avance a la infección. El impacto a nivel fisiológico y morfológico para la planta es grande, y se ha determinado la importancia del desbalance de las hormonas en estos efectos, aunque los cambios a nivel metabólico, incluyendo los de metabolitos precursores de importantes hormonas de defensa, están poco estudiados aún [319]. A pesar de que hace mucho se conoce la importancia en los procesos de infección viral de fitohormonas como SA o MeJA, los efectos de dichas infecciones sobre sus precursores metabólicos u otros metabolitos de interés en el montaje de una respuesta ante virus son mayormente desconocidos. Esto cobra especial relevancia al considerar que aún es debatida la naturaleza de la señal, o conjunto de señales, que desde la hoja inoculada inicialmente con virus, parten hacia tejidos sistémicos y son determinantes del montaje de la SAR [86-90]. Más aún, diferentes hormonas podrían estar involucradas en etapas tempranas y tardías de la infección [91]. En este sentido, comprender los cambios metabólicos producidos a lo largo de la infección viral en tejidos sistémicos, sobre todo a etapas tempranas de la infección, es de interés para revelar las bases de las respuestas originadas en las plantas ante las infecciones virales.

Por otra parte, los resultados obtenidos en el Capítulo 2 de esta Tesis habían subrayado la importancia de las hormonas en la regulación transcripcional del miR164a (Tabla 2.1 y Figura 2.6), así como el carácter transcripcional de la inducción del mismo ante infecciones virales (Figura 2.4). Estos resultados se suman a reportes bibliográficos que indican tanto una respuesta hormonal como la frecuente acumulación diferencial de miRs maduros ante infecciones virales. En muchos casos, gran parte de los síntomas desarrollados por las plantas infectadas con virus tienen su origen en la alteración de la acumulación y/o actividad de miRs que se origina como resultado de la misma [288, 291-292, 310]; ésta a su vez puede ser un efecto secundario de la acumulación diferencial de metabolitos u hormonas que puedan regular transcripcionalmente la biogénesis de miRs.

En su conjunto, estas evidencias sugieren que el estudio de los cambios metabólicos sufridos por la planta ante infecciones virales, especialmente de aquellos metabolitos relacionados con vías hormonales, puede ser de interés si se los correlaciona con cambios en acumulación de miRs, los cuales podrían estar respondiendo al menos en parte a aquéllos. En el presente Capítulo 3 de esta Tesis, se muestran los resultados de un abordaje sistemático a los cambios metabólicos, así como a los cambios transcriptómicos de miRs maduros, producidos en tejidos sistémicos de plantas de *N. tabacum* infectadas con el virus TMV. Mediante técnicas de cromatografía líquida y gaseosa acopladas a espectrometría de masa (LC-MS y GC-MS,

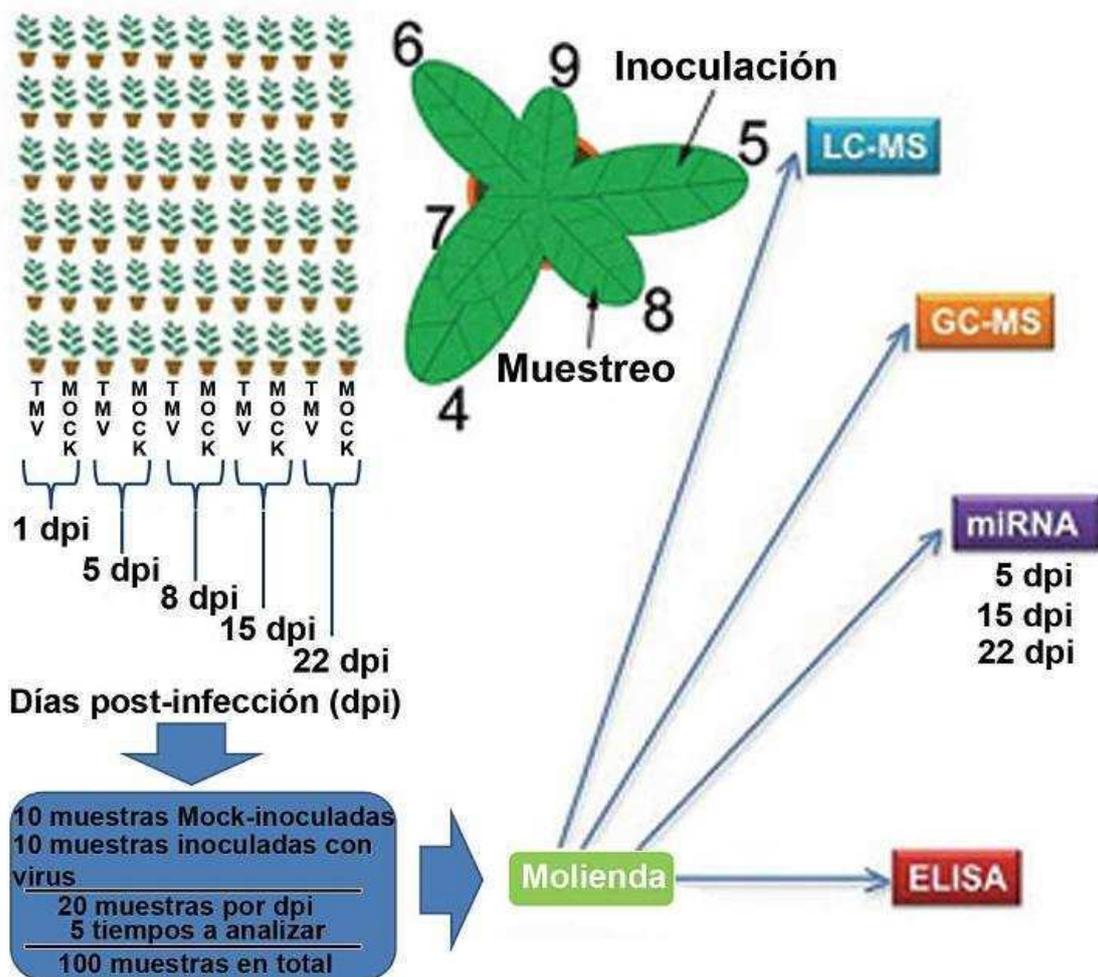
respectivamente), un amplio conjunto de metabolitos fueron analizados y comparados en situaciones de planta infectada versus no infectada, en diferentes estadios de avance de la infección viral. Similarmente, la acumulación de miRs maduros totales fue comparada entre tratamientos, utilizando la técnica de hibridación de microarreglos. Se halló que durante la infección de *N. tabacum* con TMV la respuesta, tanto a nivel metabólico como de acumulación de miRs maduros, posee dos fases bien diferenciadas, la primera producida a tiempos tempranos de la infección, antes de la llegada del virus a tejidos sistémicos, y la segunda producida a etapas tardías, coincidiendo con la acumulación sistémica de virus. A continuación, se usaron análisis de correlación para vincular los cambios de acumulación entre metabolitos y diferentes miRs, de manera de hallar posibles vínculos entre ellos en la respuesta ante la infección viral.

Como resultado de estas investigaciones, se publicó en la revista *PlosOne* un trabajo del cual soy segundo autor ([320]). De modo similar a lo establecido en el Capítulo 2 de esta Tesis, a fin de lograr una mejor comprensión del trabajo en su conjunto, detallaré a continuación el trabajo completo, indicando mi aporte en cada experimento y poniendo especial énfasis explicativo en los experimentos de los cuales fui responsable.

## Resultados

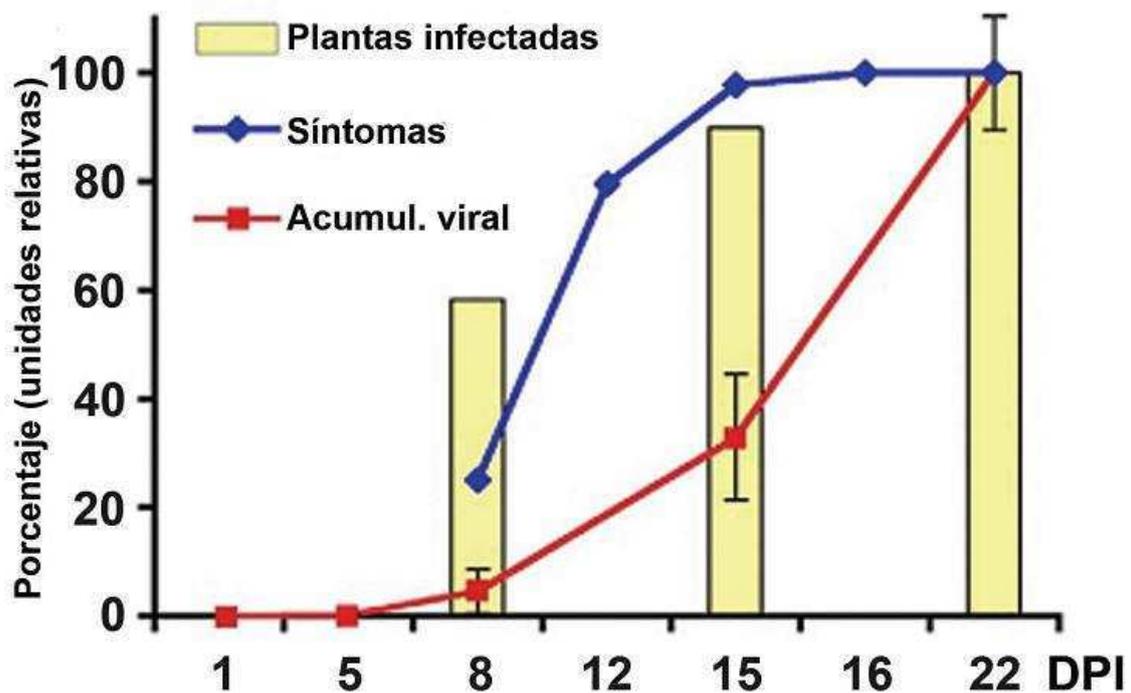
### 3.1 – Diseño experimental y caracterización de la progresión de la infección con TMV

Para analizar el impacto metabólico y el cambio en el perfil de expresión de los miRs maduros en plantas ante infecciones virales, el patosistema elegido consistió en plantas de *N. tabacum* cv. Xanthi (nn) infectadas con el virus del mosaico del tabaco, TMV. Las hojas número 5 (contando desde abajo) fueron inoculadas con TMV, o con buffer solamente (mock), y la tercera hoja sistémica (8ª) fue elegida como el tejido sistémico a muestrear a los diferentes días post-inoculación (dpi): 1, 5, 8, 15 y 22 (Figura 3.1). Cabe destacar que por ser una hoja aún en desarrollo y ubicada formando un ángulo pequeño respecto de la hoja 5ª (inoculada), la hoja 8 es considerada un destino preferencial de fotoasimilados procedentes de la inoculada. El tejido muestreado para cada planta se subdividió en 4 alícuotas: una fracción proteica que permitió tanto confirmar la infección de las plantas inoculadas con TMV, como la cuantificación de la CP viral mediante ELISA; dos fracciones para uso en metabólica, una de ellas para la medición de metabolitos primarios y otra para metabolitos secundarios (GC-MS y LC-MS, respectivamente); y una fracción para extracción de sRNAs y cuantificación de miRs.



**Figura 3.1.** Representación esquemática del diseño experimental. Se utilizaron cerca de 100 plantas de *N. tabacum*, las cuales se dividieron en dos grupos de igual tamaño. En uno de ellos las plantas se inocularon mecánicamente con extracto de plantas infectadas con virus TMV, en el otro se raspó el tejido con buffer solamente (mock-inoculación). Los detalles de inoculación y muestreo se mencionan en el texto principal y en la sección de Materiales y Métodos de este Capítulo.

El análisis de la CP del virus TMV mediante ELISA (Figura 3.2) demostró que a 1 y 5 dpi la misma es indetectable en tejidos sistémicos; por otro lado, si bien a 8 dpi el pasaje sistémico del virus es detectado en el 60% de las plantas inoculadas con TMV, los niveles de acumulación viral sólo alcanzan un 4% en promedio, respecto de los valores que habrían de observarse al final del experimento (22 dpi). A 15 dpi casi la totalidad (90%) de las plantas inoculadas con TMV presentan virus sistémicos, con un 32% de título viral máximo.



**Figura 3.2.** Progresión temporal de la infección por TMV. Barras amarillas indican el porcentaje de plantas en las cuales se detecta virus sistémico presente en la hoja número 8 por ELISA a diferentes dpi. Línea azul: porcentaje de plantas inoculadas con TMV que muestran síntomas característicos a diferentes dpi. Línea roja: promedios de los porcentajes de carga viral en las plantas inoculadas con TMV a lo largo del tiempo, expresados relativizados a los valores promedio finales de acumulación, medidos por ELISA.  $n = 10$  para cada tratamiento y dpi. *Figura correspondiente a experimentos realizados por otros integrantes del grupo.*

La progresión de los síntomas, mientras tanto, indica una abrupta subida desde el primer día en el cual son detectados suaves mosaicos a ojo desnudo (8 dpi) en un 20% de las plantas, hasta un 80% a 12 dpi. A 22 dpi todas las plantas inoculadas con TMV muestran los síntomas severos característicos (Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Síntomas producidos por TMV en tabaco a 22 dpi en tejidos sistémicos. La foto de la izquierda corresponde a una planta inoculada con buffer (NI) y la de la derecha a una planta inoculada con TMV, mostrando el síntoma de mosaico característico.

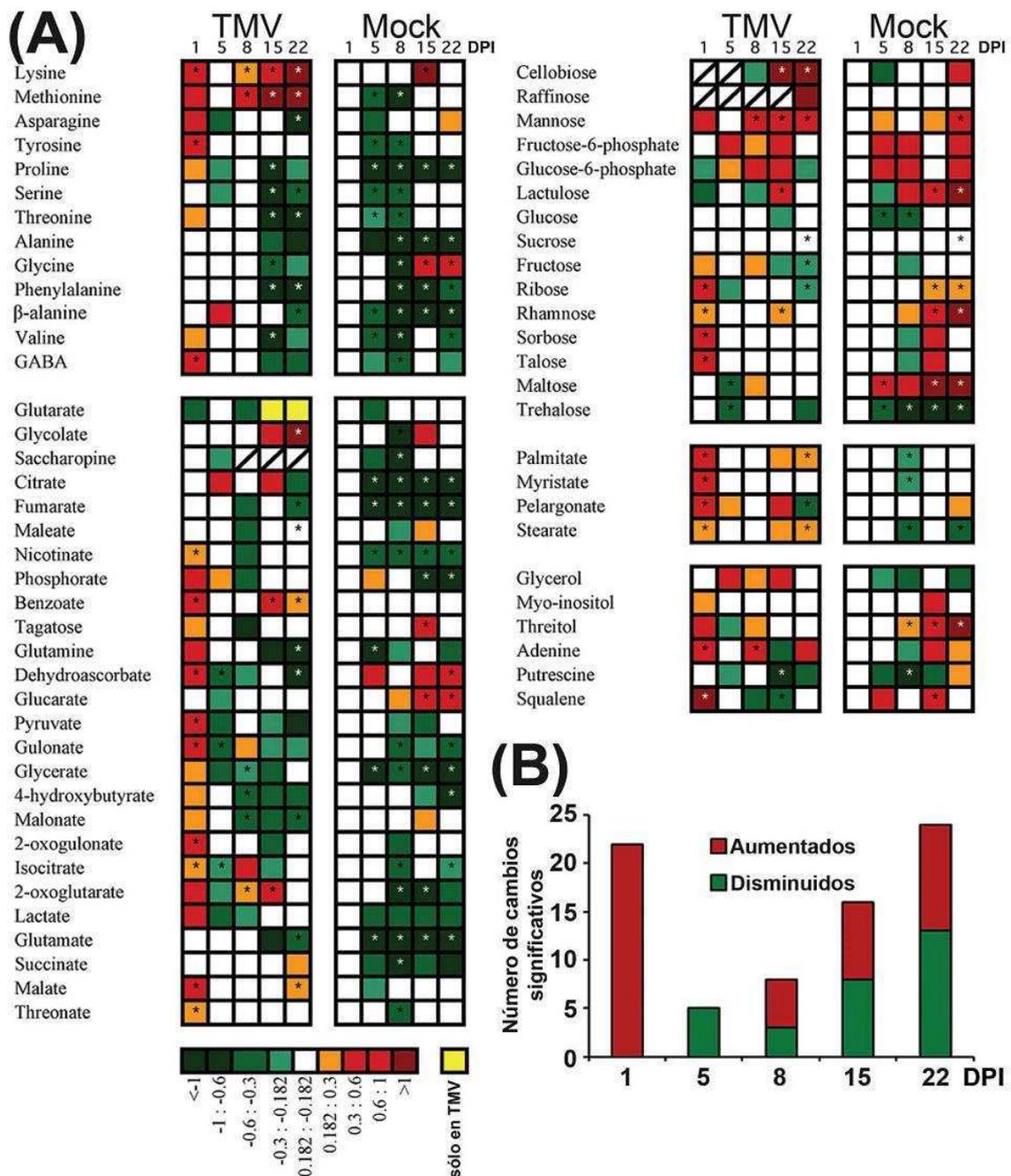
### **3.2 – TMV produce una alteración bifásica en la acumulación de metabolitos primarios en la hoja sistémica**

Con el objetivo de detectar el impacto de la infección con TMV en las hojas sistémicas de tabaco, se llevaron a cabo análisis de 64 metabolitos primarios y 34 secundarios mediante las técnicas de GC-MS (Figura 3.4) y LC-MS (Figura 3.5), respectivamente, a lo largo del período de 22 días de infección. La Figura 3.4A muestra los resultados para las comparaciones entre muestras provenientes de plantas inoculadas con virus versus muestras de plantas mock-inoculadas a diferentes dpi (paneles de la izquierda) y las comparaciones realizadas entre plantas mock-inoculadas a diferentes dpi, respecto de las mock-inoculadas a 1 dpi (paneles de la derecha). De esta manera, mientras que los paneles de la izquierda reflejan los cambios en acumulación relativa para cada metabolito analizado disparados por la infección con TMV en la hoja 8 (sistémica), los paneles del lado derecho reflejan los cambios en acumulación de los mismos metabolitos producidos de manera natural, a lo largo del proceso de desarrollo en la misma hoja obtenido en la planta mock inoculada. Notablemente, los cambios metabolómicos inducidos por TMV mostraron un perfil bifásico de alteración; a 1 dpi los metabolitos analizados mostraron en su conjunto una inducción (de hecho, los únicos metabolitos significativamente alterados por el virus resultaron inducidos respecto a los controles). Sin embargo, a etapas tardías de la infección (15-22 dpi) diferentes metabolitos mostraron cambios significativos, evidenciando tanto aumento como disminución de la acumulación. La figura 3.4B resume la cantidad de metabolitos que aumentan o disminuyen significativamente su acumulación entre tratamientos a diferentes dpi. Este gráfico permite una visión global de los cambios, observándose que a etapa muy temprana (1 dpi) se da un cambio brusco en dirección al aumento de varios metabolitos en plantas infectadas. A partir de 5 dpi, se detecta un marcado descenso en el número de metabolitos que cambian su acumulación entre tratamientos, y a 8 dpi se produce un perfil de cambios más equilibrado, con un número similar de metabolitos aumentando y descendiendo su acumulación entre tratamientos; este perfil se mantiene hasta el final del experimento, si bien la cantidad total de metabolitos que experimentan cambios significativos aumenta constantemente a lo largo del proceso infeccioso (Figura 3.4B), correlacionando con la acumulación viral (Figura 3.2). Por otro lado, el análisis detallado de los metabolitos alterados durante la infección permite obtener importante información acerca del impacto de la infección en la planta y su respuesta. Tres grupos de metabolitos primarios revisten particular importancia, dentro de aquéllos significativamente aumentados en plantas infectadas con TMV a 1 dpi: los metabolitos relacionados con la vía del ascorbato, los ácidos grasos y los compuestos fenólicos (Figura 3.4A, paneles de la izquierda). De la vía del ascorbato, un importante antioxidante, fueron inducidos por TMV el dehidroascorbato, el gulonato y el 2-oxogulonato. Los ácidos grasos aumentados (palmitato, miristato, pelargonato y estearato) son precursores de la vía biosintética del MeJA, mientras que el benzoato, un precursor del SA, también fue inducido fuertemente a 1 dpi y mantuvo niveles estadísticamente superiores en plantas infectadas a 15 y 22 dpi. Además, otra

molécula relacionada con respuestas a estrés, el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), se indujo transitoriamente a 1 dpi.

Por otra parte, también mostraron una inducción a 1 dpi un grupo de azúcares (ribosa, ramnosa y sorbosa) y varios ácidos orgánicos relacionados con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) o ciclo de Krebs (malato, isocitrato y piruvato).

A 5 dpi, muy pocos metabolitos mostraron cambios significativos de acumulación entre tratamientos (5/64); todos ellos disminuyeron en plantas infectadas respecto de no infectadas. A 15 y 22 dpi, en cambio, puede observarse una segunda fase de cambios para los metabolitos primarios, la cual correlaciona con los niveles mayores de acumulación viral. Consistentemente, el grupo de metabolitos que experimentó los mayores cambios fue el de los aminoácidos, de los cuales más de la mitad de los analizados, mostraron cambios en acumulación. En el grupo de los ácidos grasos también se vieron cambios significativos, lo cual puede estar relacionado con la ruptura o producción de componentes de endomembranas, fenómeno previamente reportado durante la replicación y movimiento de virus [321-322].

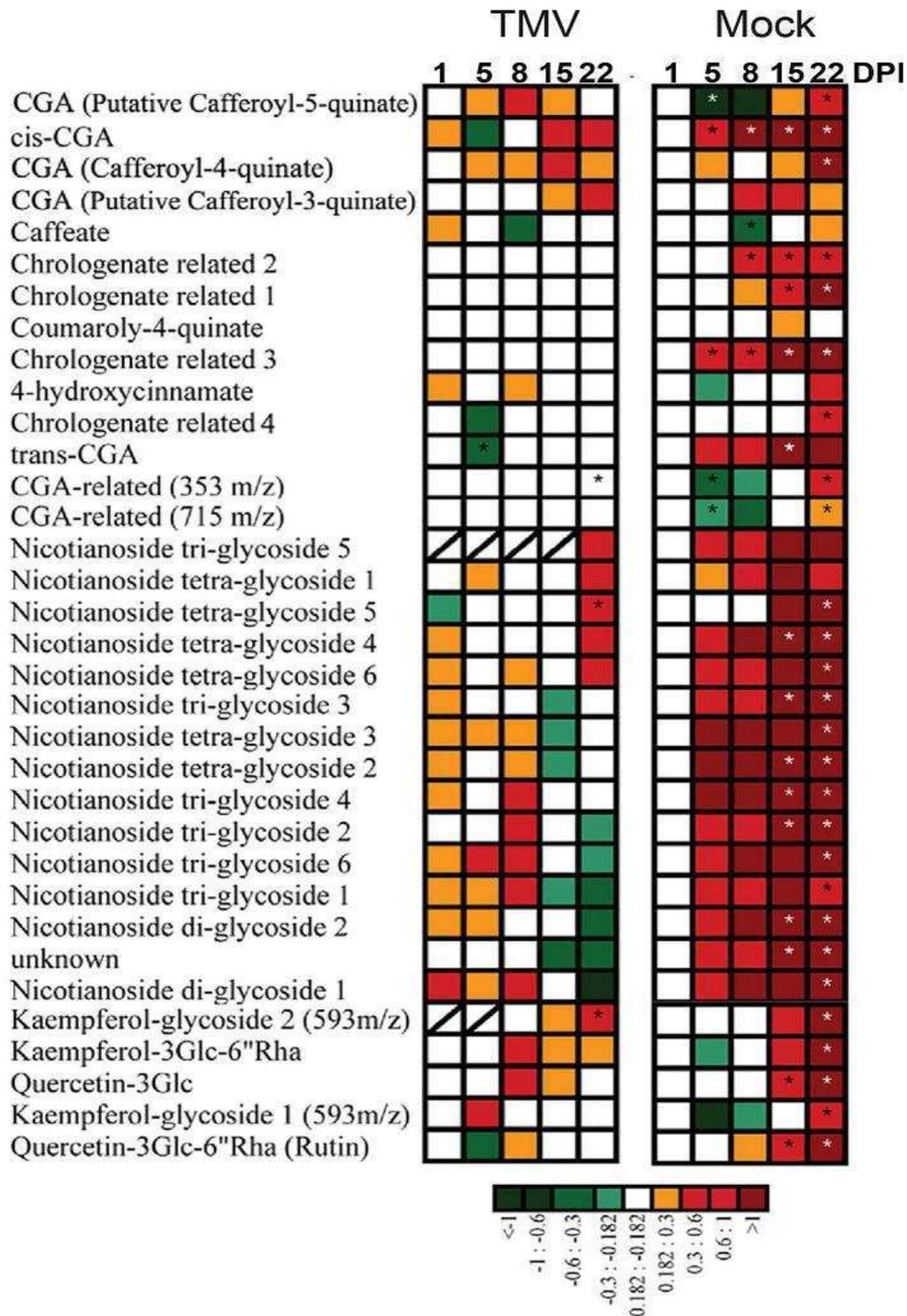


**Figura 3.4.** Cambios en la acumulación de metabolitos primarios en hojas de tabaco medidos por GC-MS ante la infección con TMV y durante la progresión del desarrollo. A) *Heatmaps* representando el nivel de cambio de los 64 metabolitos primarios analizados en hojas de tabaco durante la infección con TMV (paneles a la izquierda) y a través del desarrollo y senescencia de las plantas mock-inoculadas (paneles a la derecha). En la comparación entre tratamientos, la acumulación promedio fue calculada para cada metabolito en  $4 \leq n \leq 6$  réplicas biológicas por tratamiento y dpi y se calculó el  $\log_2$  del cociente entre los valores promedio obtenidos para muestras infectadas versus no infectadas. Para la comparación entre diferentes dpi en plantas no infectadas (paneles de la derecha), el análisis fue similar, comparando en cada caso el nivel de acumulación de cada metabolito a un dpi determinado respecto al valor del mismo a 1 dpi, que por definición adopta el valor de cambio de 0. Los asteriscos muestran los casos de comparaciones significativas al realizar la prueba estadística t de Student para cada comparación, con un umbral de  $p < 0.01$ . B) Número de metabolitos que mostraron cambios significativos en acumulación entre muestras de plantas infectadas y no infectadas a lo largo del experimento, usando los datos extraídos de los paneles de la izquierda de la parte A). Ver Apéndice B para más detalles.

En contraste con los acentuados cambios observados en metabolitos primarios desde el comienzo de la infección, ningún metabolito secundario analizado mostró cambios significativos a 1 dpi entre tratamientos (Figura 3.5, panel izquierdo). El número de cambios significativos fue muy bajo incluso a etapas avanzadas de la infección, y sólo 3 compuestos muestran inducción por TMV a 22 dpi. Sin embargo, la tendencia general es hacia el aumento en la acumulación de estos metabolitos en plantas infectadas. Es interesante notar que varios de ellos son flavonoides. Estos compuestos han sido reportados en roles diversos como la protección foliar ante la progresión de la senescencia [269] o en la respuesta ante la privación de nutrientes, particularmente fósforo y nitrógeno [270, 276-277]. Además, las antocianinas, algunos de los flavonoides más extendidos, se inducen por estrés, incluyendo el estrés oxidativo, el cual es una consecuencia frecuente de la infección viral, o de la expresión de proteínas virales [274, 323]. Si bien los cambios observados no son muy marcados, la tendencia general está en línea con lo esperado teóricamente ante la infección viral, aunque experimentos más específicos y detallados deberían realizarse para especificar el rol y la importancia de los flavonoides ante la infección por TMV. Los cambios relativos de acumulación para cada metabolito ante la infección a los diferentes dpi analizados se detallan en el Apéndice B1.

Los paneles de la derecha de las Figuras 3.4A y 3.5 muestran los cambios normales provocados en los metabolitos primarios y secundarios, respectivamente, por el desarrollo y envejecimiento de la hoja 8 en plantas mock-inoculadas, es decir, los cambios metabolómicos producidos por mecanismos exclusivamente endógenos en la planta. Los cambios en nivel de acumulación por metabolito están expresados en dichas figuras en relación a los niveles observados para cada metabolito a 1 dpi. Entre los resultados hallados, varios ácidos orgánicos relacionados con el ciclo de Krebs disminuyen con el tiempo (citrato, fumarato, isocitrato, 2-oxoglutarato y succinato). Se puede destacar el hecho de que, excepto la glicina y la lisina, los aminoácidos que cambian significativamente a 15-22 dpi (7/13) disminuyen su acumulación respecto a 1 dpi. Los cambios relativos de acumulación para cada metabolito durante el desarrollo a los diferentes dpi analizados se detallan en el Apéndice B2.

Es de destacar que la Figura 3.5 muestra una masiva inducción de prácticamente todos los metabolitos secundarios (particularmente clorogenatos, flavonoides y nicotianósidos) analizados en plantas no infectadas a través del tiempo, especialmente a etapas tardías del mismo (15-22 dpi). Como se mencionó antes, estos compuestos están en su mayoría relacionados con la vía de los fenilpropanoides y son relevantes durante la senescencia y la defensa. Estos resultados, junto con la disminución en la concentración de aminoácidos, que es consistente con la entrada en senescencia de las hojas y su consiguiente reciclado de nutrientes [206, 246-247], muestran la capacidad de los análisis realizados para detectar cambios fisiológicos de relevancia en los tejidos muestreados. Asimismo, estos resultados podrían indicar que la no sobreacumulación de los metabolitos asociados a senescencia en plantas infectadas con TMV se debiera a un nivel basal muy elevado de los mismos en plantas no infectadas a 15 y 22 dpi. Alternativamente, dichos resultados pueden señalar que TMV no dispara la acumulación de estos compuestos en esta infección compatible.

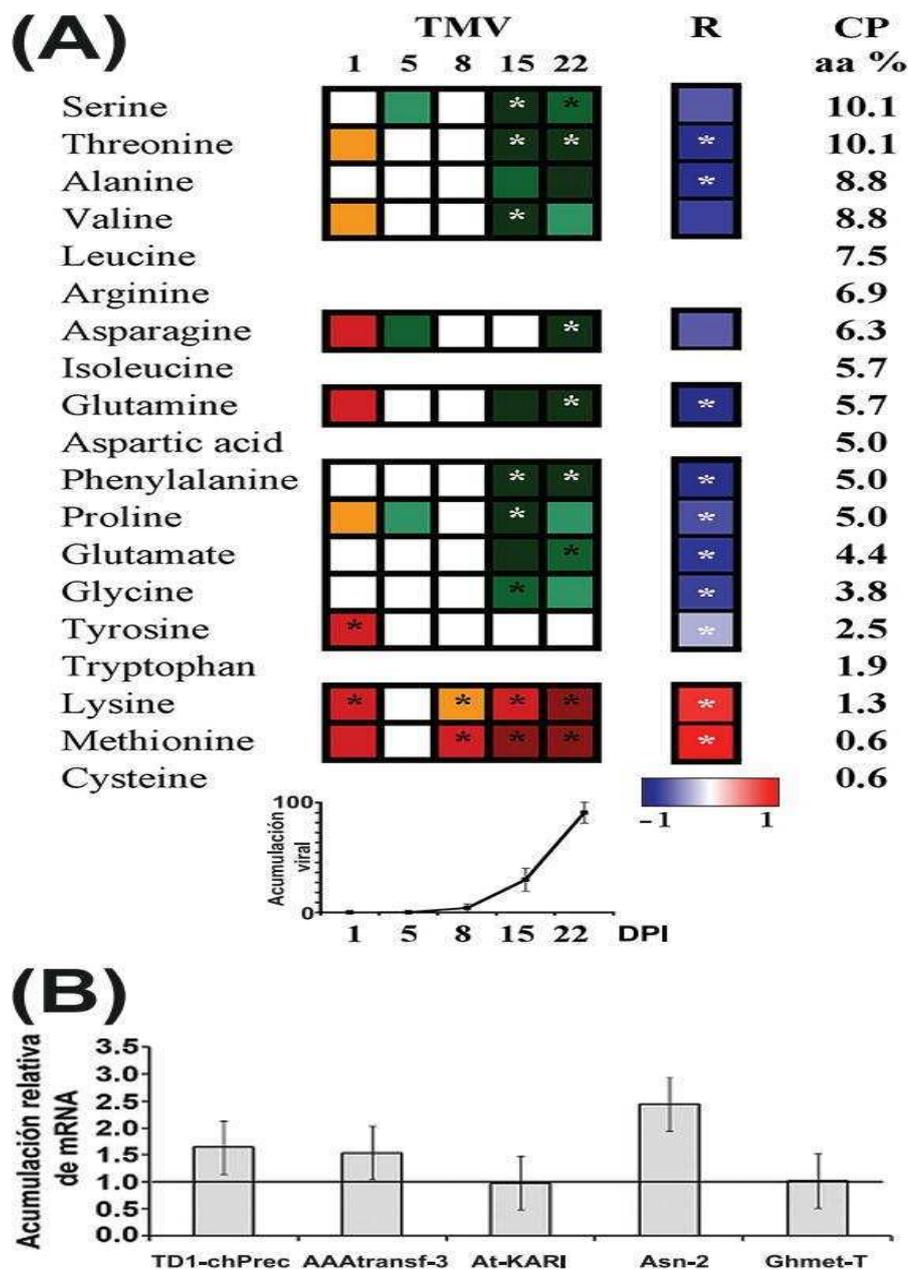


**Figura 3.5.** Heatmaps representando los niveles de cambio en la acumulación de los 34 metabolitos secundarios analizados por LC-MS en hojas de tabaco durante la infección con TMV (panel de la izquierda) y a través del desarrollo y senescencia de las plantas mock-inoculadas (panel de la derecha). El número de réplicas biológicas y el tratamiento matemático y estadístico de los datos fue análogo al utilizado para los metabolitos primarios de la Figura 3.4. Ver Apéndice B para más detalles.

### 3.3 – La acumulación de CP de TMV correlaciona con el agotamiento de los aminoácidos que la constituyen en la hoja sistémica

Como se observó al analizar la acumulación relativa de metabolitos primarios ante la infección por TMV (Figura 3.4A, paneles de la izquierda), varios aminoácidos analizados cambiaron su acumulación, en particular a etapas tardías de la infección. Un análisis más detallado del perfil de cambios de los aminoácidos junto con el análisis por ELISA de la cantidad de CP acumulada a los diferentes dpi (como indicador del nivel de acumulación viral) se observa en la Figura 3.6A. La misma muestra que en general, a través del tiempo hay una correlación negativa entre el nivel de acumulación viral y el nivel de acumulación de aminoácidos libres, en particular de aquéllos aminoácidos que en mayor proporción componen la CP de TMV. Dichas correlaciones (calculadas para cada aminoácido) con frecuencia resultaron estadísticamente significativas (columna “R”). Cuando se realizó un segundo análisis de correlación, esta vez único y tomando como variables por un lado los resultados del valor de  $r$  para cada aminoácido del primer análisis de correlación (entre acumulación de aminoácidos y acumulación de CP a través del tiempo) y por otro la proporción de CP constituida por cada aminoácido en particular, nuevamente se observó una correlación ( $r = -0.82$ ) estadísticamente significativa ( $p < 0.002$ ). Este resultado indica que cuanto más abundante es un aminoácido en la CP de TMV, más negativa es la correlación entre la cantidad de dicho aminoácido libre y la cantidad de CP acumulada.

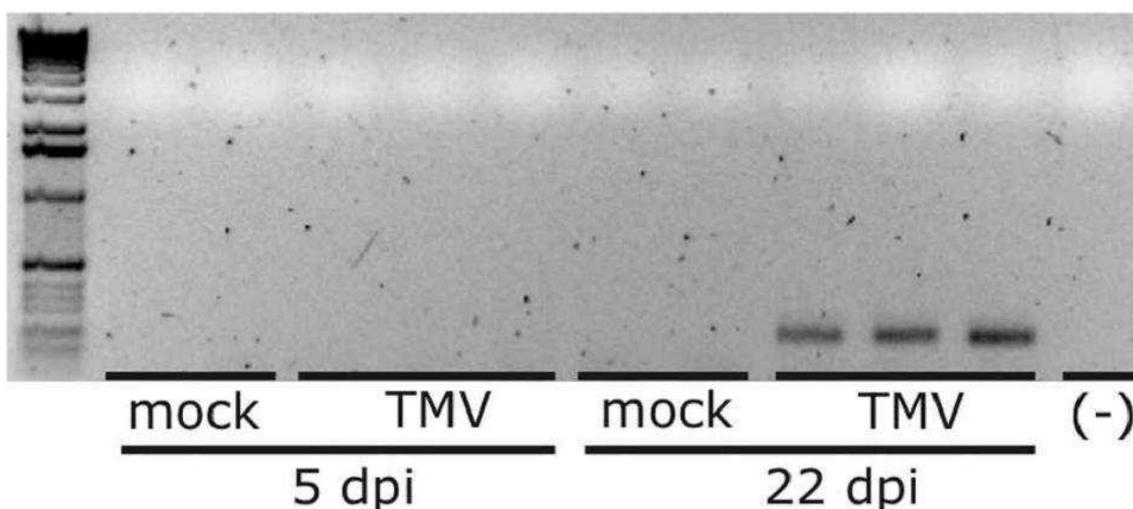
Con el fin de determinar si los cambios de acumulación de aminoácidos disparados por TMV se relacionan con cambios en la expresión de los genes implicados en su biosíntesis, se analizó la acumulación de varios mRNAs de genes clave en biosíntesis de aminoácidos (Figura 3.6B). Se midieron las cantidades relativas de mRNA del precursor de la treonina deaminasa 1 cloroplástica (TD1-chPrec), la aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada (AAtransf 3), la reductoisomerasa ketol-ácida (KARI), la asparagina sintasa 2 (ASN2) y la glicina hidroximetiltransferasa (GhMetT), por qPCR a 22 DPI. La selección de estos genes se basó en la búsqueda de rutas biosintéticas de aminoácidos en *Arabidopsis* y luego se buscaron sus ortólogos en bases de datos de *N. tabacum* para obtener sus secuencias para el diseño de cebadores de qPCR. La Figura 3.6B muestra que en ningún caso se detectaron diferencias significativas de expresión de estos genes a 22 dpi al comparar plantas infectadas (barras grises) con mock-inoculadas (línea de base = 1). Este resultado puede indicar que la diferencia en acumulación de aminoácidos no se debe a una menor biosíntesis de los mismos en plantas infectadas, sino a un agotamiento de sus cantidades libres debido a su masiva incorporación a la CP de TMV.



**Figure 3.6.** Abundancia relativa de aminoácidos libres ante la infección por TMV. A) los datos de cambios en acumulación de distintos aminoácidos en plantas infectadas versus no infectadas (panel de la izquierda, mismos datos que en Figura 3.4A) y los de acumulación de la CP en plantas infectadas (gráfico de líneas debajo) a lo largo de experimento, fueron utilizados para calcular, para cada aminoácido, un coeficiente de correlación de Pearson (columna "R"). Asteriscos de dicha columna indican correlaciones estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ). Dichos coeficientes fueron a su vez utilizados como valores para calcular la correlación de los mismos con su proporción como integrantes de la CP de TMV (columna de la derecha) y obtener un nuevo valor de correlación. Se indican también los porcentajes de CP constituidos por aminoácidos no analizados en este estudio. B) Acumulación relativa de mRNAs de genes involucrados en vías biosintéticas de aminoácidos, medidos por qPCR. TD1-chPrec = precursor de la treonina deaminasa 1 cloroplástica; AAtransf 3 = aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada; KARI = reductoisomerasa ketol-ácida; ASN2 = asparagina sintasa 2; GhMetT = glicina hidroximetiltransferasa. *Panel B* corresponde a experimentos realizados por otros integrantes del grupo. Ver Apéndice B para más detalles.

### 3.4 – TMV provoca una alteración temporal bifásica en la acumulación de miRNAs maduros en hojas sistémicas de tabaco

Con el objetivo de estudiar la acumulación de miRs maduros en los tejidos sistémicos de plantas infectadas (de manera similar a lo realizado con el perfil de metabolitos), se usaron alícuotas de las mismas muestras tomadas para análisis de ELISA y metabolómicos, como indica la Figura 3.1. Se analizó la acumulación de miRs antes de la llegada del TMV a tejidos sistémicos y en etapas posteriores que ya mostraran acumulación viral. Se eligieron para el análisis los días 5, 15 y 22 dpi, ya que mientras que para 15 y 22 dpi todas las muestras ensayadas mostraron acumulación de virus, a 5 dpi los análisis por RT-PCR no detectaron acumulación de RNA viral (Figura 3.7).



**Figura 3.7.** Detección de la CP de TMV por RT-PCR de muestras de RNA de hojas sistémicas de plantas de tabaco no infectadas (mock) o inoculadas con TMV a 5 y 22 dpi. N = 3 plantas por grupo y día fueron probadas. (-) = control negativo, sin cDNA. Ver sección de Materiales y Métodos para más detalles. Experimento realizado por otros integrantes del grupo.

La acumulación de miRs totales fue medida con la técnica de hibridación de microarreglos, usando la plataforma comercial de Combimatrix (ver sección de Materiales y Métodos para más detalles). Dicha plataforma poseía todas las sondas complementarias para la detección de los miRs maduros correspondientes a varias especies de plantas, fabricadas según los datos disponibles en ese momento en la base de datos miRBase versión 9 [324]. Como se muestra en la Figura 3.1, sRNAs totales fueron extraídos de las alícuotas correspondientes de las hojas número 8, sistémicas, a 5, 15 y 22 dpi. Se calcularon los cocientes de acumulación de los diversos miRs maduros en plantas infectadas con TMV respecto de los controles (mock). Los cambios relativos de acumulación para cada miR ante la infección a los diferentes dpi analizados se detallan en el Apéndice C. Los datos se acomodaron en una matriz adecuada y se analizaron mediante el programa Multiple Experiment Viewer (ver sección de Materiales y Métodos para más detalles). Los resultados del análisis de clusters se observan en la Figura 3.8. La Figura 3.8A muestra el agrupamiento de los

perfiles de expresión diferencial entre tratamientos de los diferentes genes miR (ordenados verticalmente) y el agrupamiento de los dpi analizados (arriba, eje horizontal) según el método de agrupamiento de *Hierarchical Clustering Linkage* (HCL). Dicho método construye un árbol cuyas sucesivas ramificaciones indican el grado de similitud entre entidades diferentes (expresión diferencial de genes a través de los dpi, por caso). La longitud de las ramas que parten de un nodo (punto de ramificación) es proporcional a la distancia entre clusters terminales y por ende, a su diferencia de patrón de expresión diferencial. Por ejemplo, miR165/166 y miR160 son dos clusters con perfiles de expresión muy similares, que no sólo agrupan juntos (por similitud mayor respecto a otros clusters) sino también cuyo nodo posee ramificaciones muy cortas (por distancia). En un sentido amplio, es posible identificar en este árbol un conjunto de miRs cuyo perfil de cambio de acumulación es bifásico, y va “de menos a más”. Es decir, miRs que a 5 dpi, cuando el virus aún no está presente en la hoja analizada (Figuras 3.2 y 3.7), se encuentran subregulados por la infección con TMV mientras que a 15 y 22 dpi (cuando la acumulación viral es alta, Figura 3.2, líneas rojas) los patrones de acumulación resultaron similares y reflejaron la acumulación de la mayoría de los miRs subregulados a 5 dpi. A este conjunto se lo denominó “A” (cuyo nodo se marca en la Figura 3.8A). Está compuesto por 15 miRs. Es interesante el hallazgo de que dentro de este conjunto se encuentran miRs reportados como relevantes para la respuesta de la planta ante estreses bióticos y abióticos [168, 216]. También, que la respuesta de los miRs resulta ser, al igual que la de los metabolitos primarios, bifásica en el tiempo ante la infección viral (Figura 3.4A). Fuera de este conjunto los miRs mostraron comportamientos diversos, particularmente miR403 y miR408 fueron los únicos miRs analizados que mostraron una subregulación a 22 dpi.

El agrupamiento por dpi muestra que 5 dpi forma un grupo aparte de 15 y 22 dpi, que son más similares entre ellos. Esto es muy probablemente resultado del perfil de expresión bifásico de un conjunto de miRs, antes mencionados, que forzarían este clustering.

Con el objetivo de determinar si el conjunto “A” de miRs de expresión bifásica hallados al inspeccionar visualmente el árbol de HCL posee un perfil de cambio común subyacente, se reanalizaron los datos de origen mediante el método de agrupamiento de *Self-Organizing Tree Algorithm* (SOTA). El mismo difiere del HCL (que es un método determinístico) en varios aspectos; en primer lugar, SOTA crea *clusters* que son el resultado de agrupar una cantidad de genes con perfiles de expresión similares, por lo que su resultado no muestra la totalidad de los genes, sino un patrón representativo de cada *cluster*. El mismo se denomina vector centroide. Segundo, a diferencia de HCL, SOTA es un método adaptativo, basado en el concepto de redes neuronales, que mediante sucesivas iteraciones va perfeccionando (“aprendiendo”) el reacondicionamiento de los diferentes genes a distintos *clusters*. Esto genera un conjunto de *clusters* final en el cual posteriores movimientos de genes de cada *cluster* a *clusters* vecinos ya no disminuye significativamente la diversidad dentro de cada *cluster*. En este momento, las iteraciones finalizan y se obtiene un dendrograma como el de la Figura 3.8B. SOTA permite relacionar los *clusters* entre sí mediante un árbol. Se puede observar que el *cluster* más numeroso (número 6) posee 8 genes. Dichos genes están todos incluidos en el conjunto “A” observado en el análisis por HCL (Figura 3.8A) e incluyen los miRs 156/157, 159/319, 167, 171, 172, 390, 397 y 415. Los dos *clusters* más

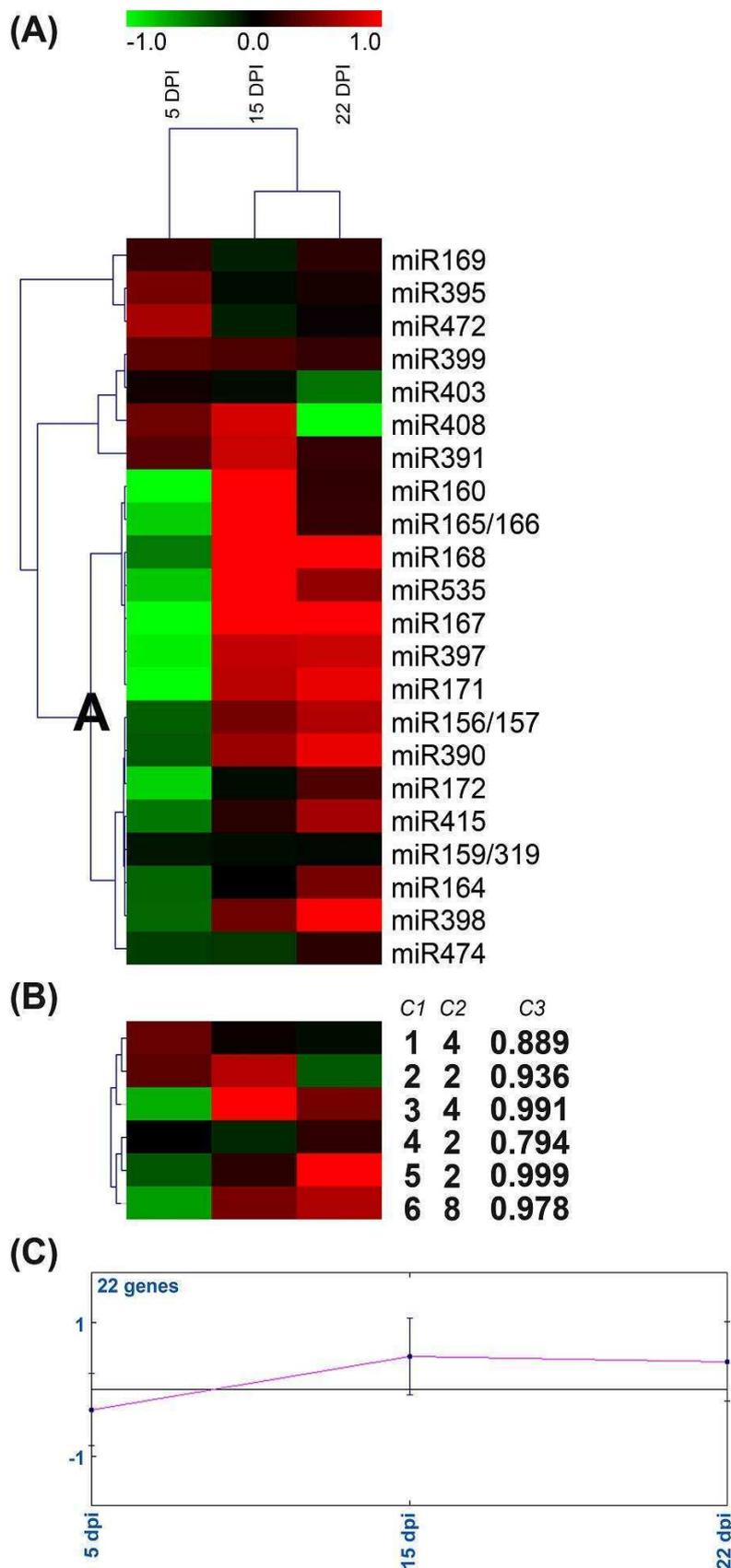
relacionados con el 6 son el número 4 y 5, de dos integrantes cada uno, que poseen 3 miRs más (miRs 474, 398 y 164) incluidos en el conjunto "A". Los otros 4 integrantes del mismo (miRs 160, 165/166, 168 y 535) están menos relacionados con los restantes según SOTA, y forman un *cluster* separado (el número 3). Esto se debe a que si bien presentan un perfil de expresión bifásico también, con represión a 5 dpi e inducción posterior, para los genes del *cluster* 3 la acumulación a 15 dpi es mayor que a 22 dpi, lo cual es lo contrario de lo que ocurre con *clusters* 4, 5 y 6. El vector centroide resultante, por ende, tiene parámetros distintos y agrupa diferente.

La Figura 3.8C muestra el gráfico del vector centroide de expresión diferencial que resulta de considerar los promedios para todos los miRs analizados (22 genes). La tendencia general indica una baja en la acumulación de miRs analizados en muestras infectadas a 5 dpi y una sobreacumulación a 15 y 22 dpi. Estas tendencias están determinadas tanto por la cantidad de miRs sufriendo cambios en una determinada dirección en cada dpi, como por la magnitud del cambio de acumulación entre tratamientos en el caso de cada miR.

Es importante tener en cuenta que el análisis de *clustering* por sí solo no indica mecanismos subyacentes ni relación causal o pertenencia a una vía molecular común entre los genes que cambien de manera similar [325]. De hecho, cualquier conjunto de datos con el formato adecuado (por ejemplo, el vector (-1,0,1) y similares) puede ser sometido a análisis de *clustering* y dará un árbol con relaciones entre ellos. Sin embargo, el análisis por *clustering* puede dar indicios acerca de una regulación en común de genes cuya expresión cambie ante tratamientos diferentes, permitiendo posteriores validaciones o la creación de hipótesis para futuras indagaciones.

Los resultados de ambos métodos de análisis (HCL y SOTA) que trabajan en base a algoritmos diferentes, mostraron la importancia de realizar un análisis detallado de los datos antes de extraer conclusiones apresuradas en base a agrupamientos por un solo método. Si bien el análisis por HCL permitió identificar un conjunto "A" de miRs de perfil de expresión bifásica, el algoritmo de SOTA permitió enfocar en diferencias más sutiles. En particular, la formación del *cluster* 3 por SOTA mostró diferencias entre 15 y 22 dpi respecto a la mayoría de los genes del conjunto "A" del HCL presentes en el *cluster* 6 de SOTA, diferencia que pasa mayormente desapercibida por el *clustering* resultante por HCL.

Tomados en su conjunto, los datos de microarreglos indican que un conjunto de miRs muestra una represión en su acumulación a 5 dpi, cuando TMV aún no está presente en el tejido sistémico analizado, y una acumulación a 15 y 22 dpi, con el virus ya acumulado sistémicamente, generando así un perfil bifásico de cambios.



**Figura 3.8.** Análisis del perfil temporal de acumulación de miRNAs maduros ante la infección con TMV. La acumulación relativa de miRNAs maduros se indica como el  $\log_2$  del cociente entre valores para infectadas/mock inoculadas para cada miR en cada dpi analizado ( $n = 6$  para cada día y tratamiento). La escala logarítmica en falso color que indica mayor (rojo) o menor (verde) acumulación de un determinado miR ante la infección por TMV, se indica arriba. Se muestran los resultados para aquellos miRNAs que mostraron mayor cantidad de datos para todos los dpi analizados. A) Análisis de HCL que muestra los resultados agrupados según el patrón de expresión relativo a los genes y a los dpi analizados. El conjunto "A" de genes, con característico patrón bifásico de expresión, está indicado. B) Análisis de los mismos datos, pero agrupados por dendrograma SOTA (*Self-Organizing Tree Algorithm*). Las diferentes columnas marcadas indican C1: número de cluster; C2: cantidad de genes en determinado cluster; C3: Variación interna dentro de cada cluster (distancia media del vector centroide representando cada perfil de expresión génica respecto del vector centroide del cluster que lo contiene). C) Vector centroide que resume la tendencia general de acumulación diferencial observada para los 22 genes miR analizados a los diferentes dpi.

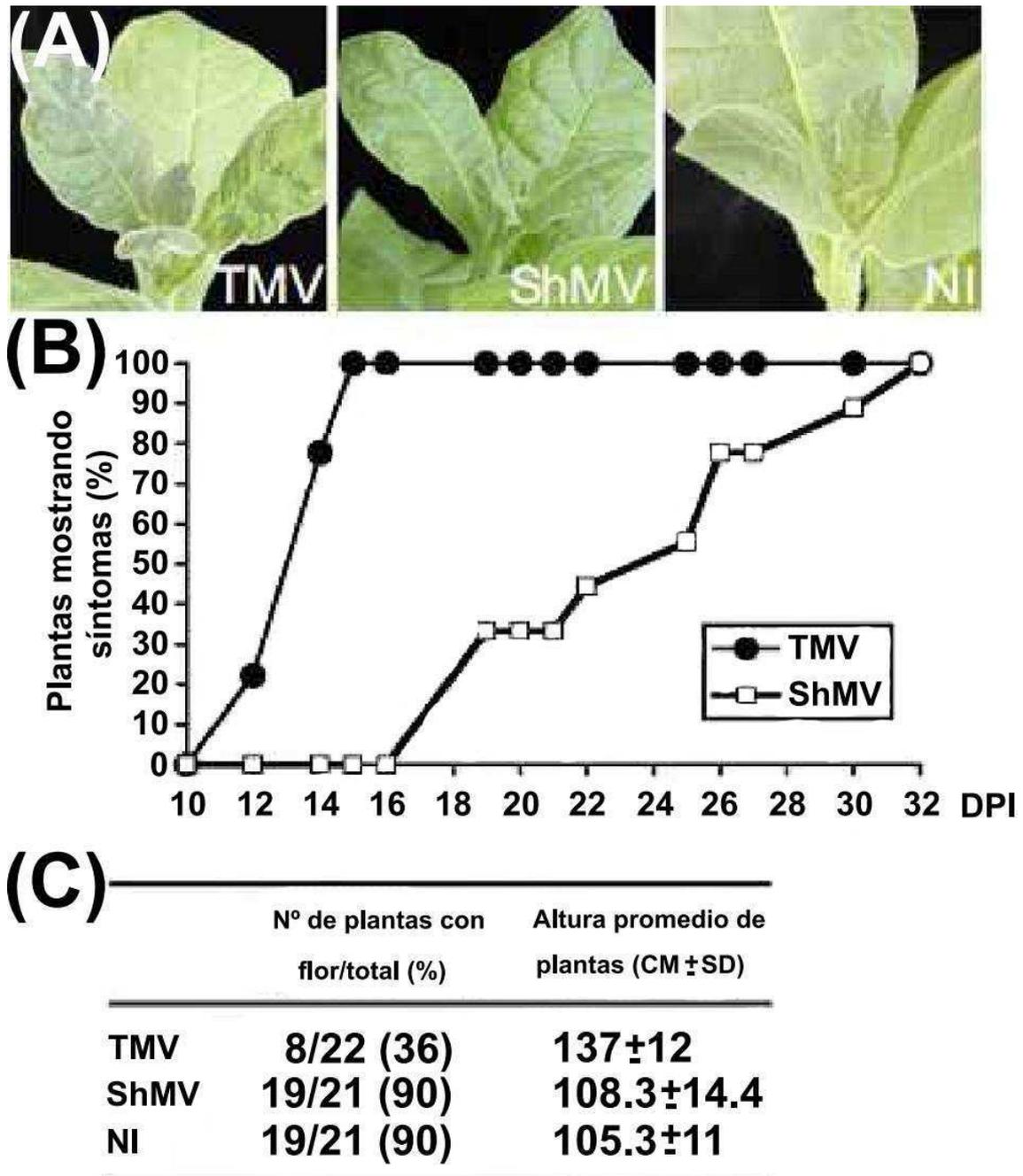
Ver sección de Materiales y Métodos y Apéndice C para más detalles.

### **3.5 – Acumulación de miRs y sus genes blancos en etapas tempranas de infección por dos tobamovirus que difieren en los síntomas provocados en tabaco**

Luego de observar el notable cambio en los perfiles de acumulación diferencial de miRs ante infección con TMV en diferentes etapas de la infección (Figura 3.8), se planteó por un lado, la validación de los cambios que se habían registrado mediante la técnica de microarreglos, y por otro, la determinación del impacto que dicha acumulación diferencial tenía en la acumulación de genes blanco de miRs. A la vista de la importancia de los tiempos tempranos de la infección en el patrón de acumulación diferencial de estos genes, se decidió ampliar su estudio utilizando otro experimento, en el cual no sólo se usó TMV, sino también otro tobamovirus, el ShMV (de *Sunn-hemp Mosaic Virus*).

#### **3.5.1 – Comparación de los síntomas inducidos en tabaco por dos tobamovirus de diferente agresividad y acumulación viral temprana de TMV**

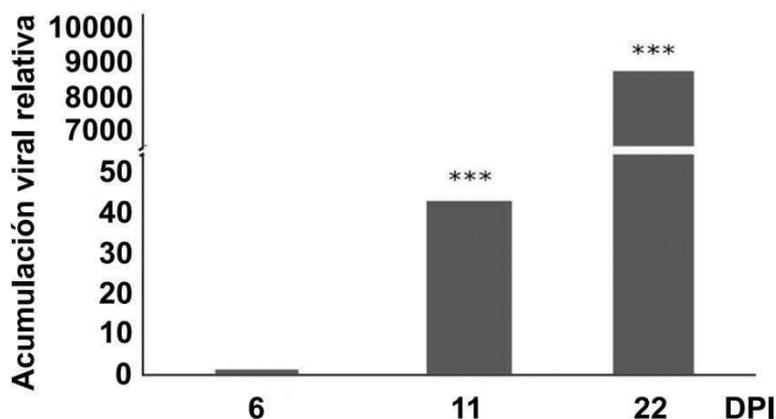
El ShMV es característico del grupo de tobamovirus que infectan plantas de la familia *Fabaceae* (Figura 1.9) y produce síntomas más suaves que el TMV en tabaco (Figura 3.9).



**Figura 3.9.** Comparación de la severidad de los síntomas provocados en plantas de tabaco por dos tobamovirus (TMV y ShMV). A) Fotos de síntomas sistémicos característicos desarrollados a 30 dpi por ambos virus versus plantas mock-inoculadas con buffer (NI). B) Velocidad comparada de aparición de síntomas sistémicos ante las infecciones con los dos virus. C) Tabla mostrando el impacto de las infecciones con ambos virus en floración y altura promedio alcanzada por las plantas a 30 dpi según el tratamiento. Para experimentos B) y C) se usaron datos de dos experimentos similares contando con al menos 10 plantas por ensayo. Para ambos virus similares concentraciones de inóculos fueron usadas (2.5 mg/mL). *Experimento realizado por otros integrantes del grupo.*

Además, y con la intención de demorar más aún la llegada de los virus a tejidos sistémicos (y así tal vez ampliar la ventana de tiempo de análisis en la cual la cantidad de virus en tejidos sistémicos es nula o un muy bajo porcentaje respecto del tiempo final), se inocularon las plantas de tabaco de manera similar a lo realizado

anteriormente (Figura 3.1A), pero con una dilución 1/10 de los inóculos virales (ver sección de Materiales y Métodos para más detalles). Luego se relativizaron las acumulaciones virales (medidas como acumulación de CP de TMV por qPCR) a 6, 11 y 22 dpi respecto de plantas sin infectar (Figura 3.10).



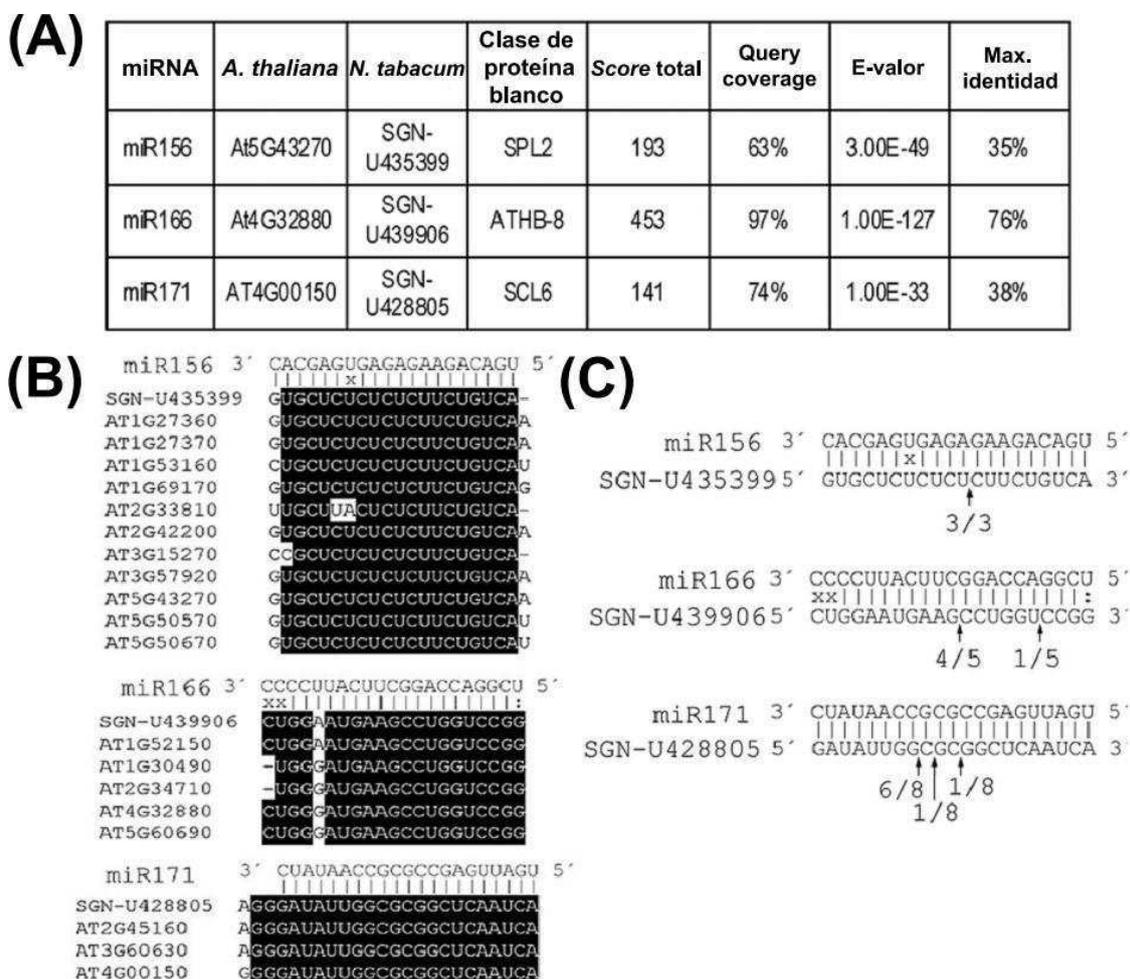
**Figura 3.10.** Detección de la CP de TMV mediante qPCR a 6, 11 y 22 dpi en hojas de tabaco sistémicas. La acumulación relativa de RNA de TMV-CP fue relativizada entre plantas mock-inoculadas e infectadas con TMV a cada día post-inoculación indicado. \*\*\* = p-valor < 0.001. *Experimento realizado por otros integrantes del grupo.*

La Figura 3.10 muestra que a 6 y 11 dpi la cantidad de CP de TMV acumulada en tejido sistémico es nula o muy baja en comparación a la acumulación máxima alcanzada a 22 dpi; de hecho, la diferencia de acumulación entre 11 y 22 dpi es de más de 2 órdenes de magnitud ( $< 1/$  del máximo). Esto indica que se pueden considerar como etapas tempranas de la infección los 6 y 11 dpi.

### 3.5.2 – Validación en *N. tabacum* de genes blanco de miRs

Para determinar la actividad de los miRs cuya acumulación es alterada por las infecciones virales, fue necesario cuantificar el nivel de sus mRNAs blanco. La idea subyacente es determinar el impacto que la infección viral produce sobre los transcritos codificantes de la planta, vía la desregulación de los genes maestros que los controlan (los miRs). Aunque reportes previos habían identificado las secuencias de miRs, sus estructuras y la determinación de la conservación de su secuencia en tabaco [326], la información acerca de sus genes blanco era al momento de la realización del trabajo muy escasa. De este modo, se procedió a validar mediante la técnica de 5' RLM-RACE la presencia en *N. tabacum* de mRNAs cortados siguiendo un patrón indicativo de corte conservado por un miR conocido en otras especies. Mediante esta técnica, y al comparar las secuencias halladas con bases de datos de mRNAs de Arabidopsis, se lograron validar tres blancos de miRs diferentes: un mRNA codificante para una proteína relacionada con Squamosa Promoter binding Protein-like 2 (SPL2) complementario a miR156; un mRNA codificante para una proteína Homeobox gene 8 (ATHB-8) complementario a miR165/166 y un mRNA codificante para una proteína

relacionada con Scarecrow-like transcription factor 6 (SCL6), regulado por miR170/171 (Figura 3.11).



**Figura 3.11.** Validación de genes blanco de miRs en tabaco. A) Tabla resumiendo los resultados de los alineamientos entre los genes de *N. tabacum* cuyos mRNAs fueron hallados con sitio de corte característico por 5' RLM-RACE y su homólogo más similar en Arabidopsis, también regulado por el miR maduro indicado. B) Alineamientos entre los sitios de reconocimiento mRNA blanco/miR de los tres genes blanco de tabaco validados (SGN-U435399, SGN-U439906, y SGN-U428805) y secuencias de sus homólogos reportados previamente en Arabidopsis. C) Para cada uno de los tres mRNAs blanco validados, se detallan los sitios de corte hallados (flechas) así como la frecuencia de clones de 5' RLM-RACE cortando en cada sitio, en caso de haber más de un sitio de corte detectado por mRNA. Ver sección de Materiales y Métodos para más detalles.

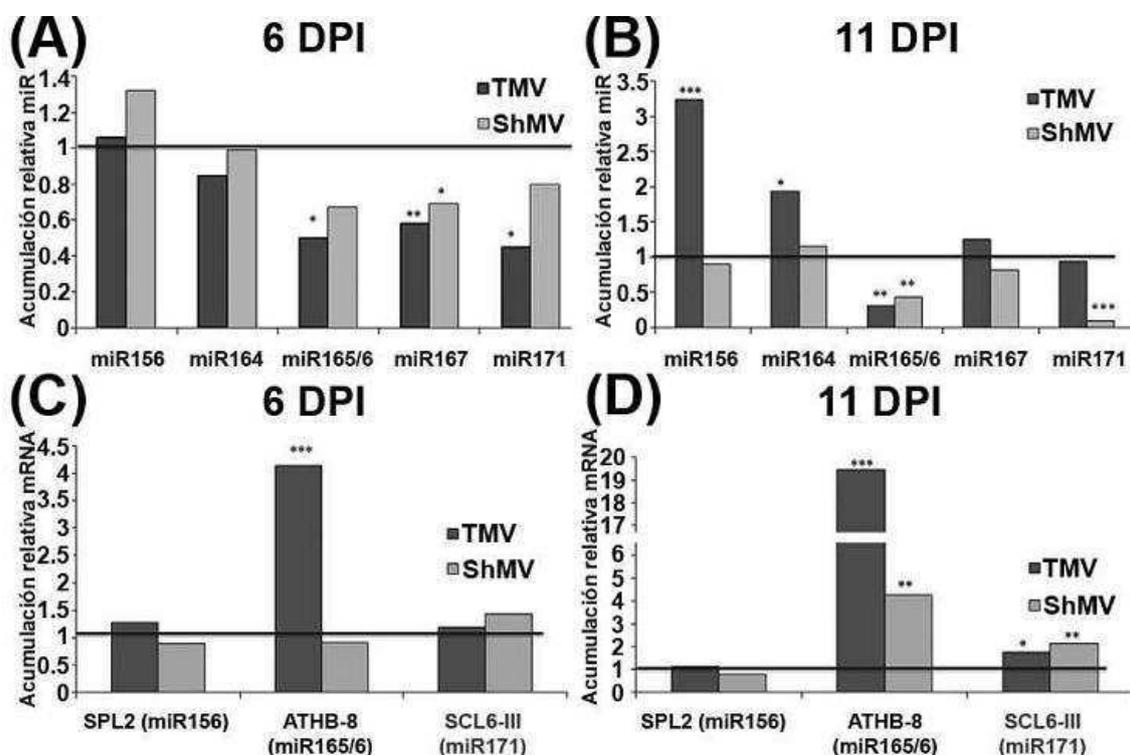
### 3.5.3 – Cuantificación de miRs y sus mRNAs blanco a etapas tempranas de la infección con ShMV y TMV

Al realizar los análisis de acumulación de miRs por qPCR a modo de validación de los resultados de los microarreglos, se decidió hacer foco en algunos de los miRs pertenecientes al denominado conjunto “A”. Esta decisión se basó en que no sólo mostraron una interesante respuesta temporal bifásica a la infección con TMV, sino que muchos de ellos son miRs bien caracterizados y con roles reportados en respuesta

a diversos estreses. Pudo detectarse a 6 dpi una reducción de tres de los cinco miRs analizados: (miR165/6, miR167 y miR171). De este modo, se confirman los resultados para estos miRs a tiempos tempranos, que indican una baja en la acumulación de los mismos en tejido sistémico cuando la presencia de virus es muy baja o nula. Esta reducción fue más marcada en las plantas infectadas con TMV que en las infectadas con ShMV, de modo que el virus más severo podría estar produciendo efectos más rápidos. Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que mientras que a 6 dpi el descenso en la acumulación de miR165/6 y miR171 en plantas infectadas con ShMV es no significativo e incipiente, el resultado de las qPCRs a 11 dpi indica que el mismo es muy marcado y muy significativo (Figura 3.12A-B). En las plantas infectadas con TMV se observó a 11 dpi un aumento significativo en la acumulación de miR156 y miR164. Esto podría estar indicando la transición hacia una segunda fase, caracterizada por una tendencia al aumento generalizado de acumulación de miRs maduros, como la vista en la Figura 3.8A a 15 dpi y con mayor concentración de inóculo utilizado. Dicha sobreacumulación no fue detectada para el caso de ningún miR analizado en plantas infectadas con ShMV, lo cual podría estar reflejando la mayor lentitud del virus menos severo en provocar el cambio de la primera fase (subacumulación de miRs) a la segunda (sobreacumulación).

En cuanto a los genes blanco de miRs analizados, a 6 dpi (Figura 3.12C) el único de los tres en mostrar cambios significativos en su acumulación fue el SGN-U439906 (homólogo de ATHB-8 y blanco de miR165/6) en muestras de plantas infectadas con TMV. Su inducción de cerca de 4 veces fue acompañada de una alta significancia estadística ( $p < 0.01$ ) y una correlación negativa con la disminución de acumulación de su represor, ya que miR165/6 se mostró significativamente reducido en las mismas muestras (Figura 3.12A). A 11 dpi (Figura 3.12C) la sobreacumulación de este mRNA fue aún mayor (cerca de 20 veces respecto a plantas mock-inoculadas,  $p < 0.01$ ) y también correlacionó significativamente con la disminución de miR165/6 (Figura 3.12B). Notoriamente, a 11 dpi también ShMV indujo la acumulación de SGN-U439906 de manera negativamente correlacionada con la de miR165/6, nuevamente indicando que ambos tobamovirus provocan cambios similares aunque con un retraso en los efectos en el caso del virus menos severo. El caso del par regulatorio miR171- SGN-U428805 (homólogo a SCL6-III) guarda ciertas similitudes con el anterior, aunque también presenta características propias: miR171 es reprimido primero a 6 dpi por TMV, cuando ShMV no ejerce ningún efecto apreciable (Figura 3.12A). En esta etapa, el gen blanco no sufre cambios detectables (Figura 3.12C). A 11 dpi miR171 ya no se encuentra subacumulado en plantas infectadas por TMV, pero sí en ShMV (Figura 3.12B), mientras que SGN-U428805 está sobreacumulado en plantas infectadas, más fuertemente en plantas infectadas con ShMV (Figura 3.12D). Esto podría indicar que entre 6 y 11 dpi, mientras que miR171 se recupera de su subacumulación y pasa a la segunda fase de acumulación en plantas con TMV, el ShMV recién comienza a ejercer un efecto a la baja sobre miR171, el cual aún no se había registrado a 6 dpi. De acuerdo con esta hipótesis, su mRNA blanco muestra una mayor acumulación con ShMV a 11 dpi, momento en el cual la cantidad de miR171 es baja. Por último, SGN-U435399 (homólogo a SPL2) no mostró cambios en su acumulación con ningún tratamiento ni a 6 ni a 11 dpi (Figura 3.12B, D) a pesar de un muy marcado aumento de acumulación de miR156 a 11 dpi en plantas infectadas con TMV (Figura 3.12D). Esto

podría indicar que a la vez que se sobreacumula el miR156, su actividad se reduce, fenómeno probablemente vinculado con la actividad supresora del PTGS viral.



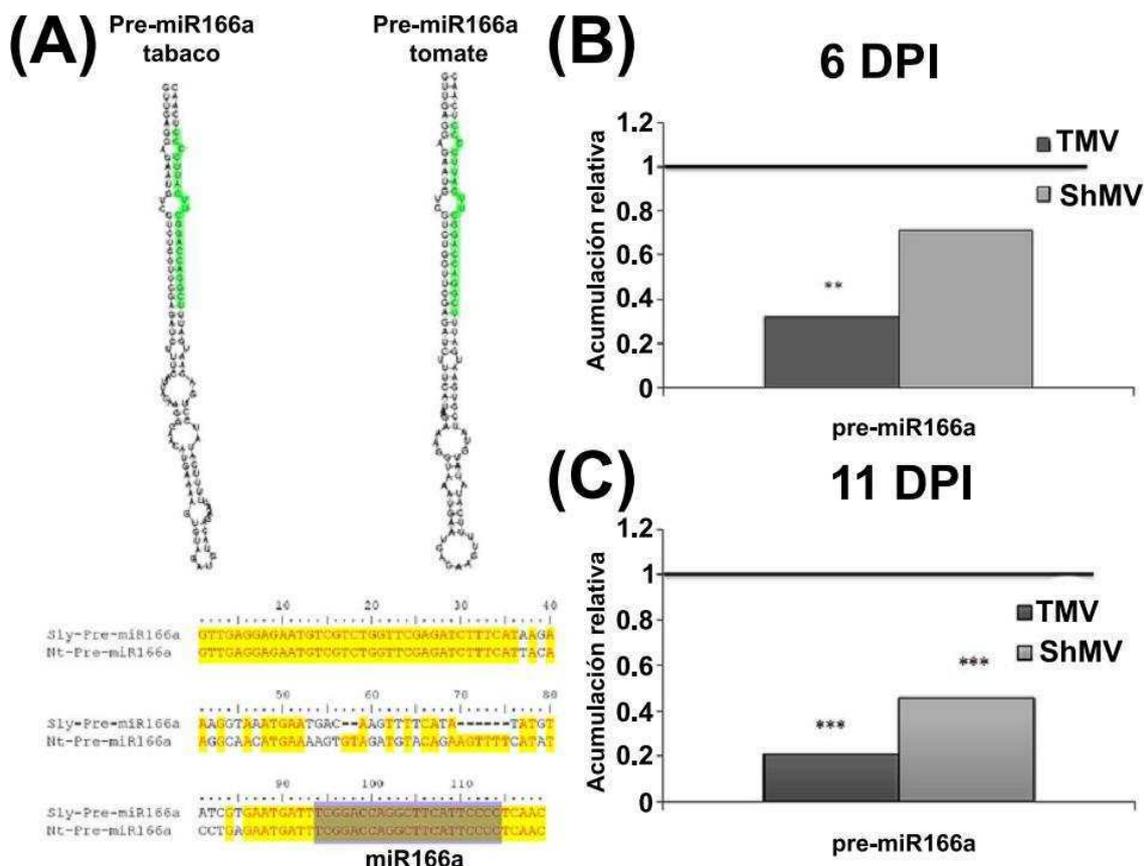
**Figura 3.12.** Acumulación de miRs y sus mRNAs blanco a etapas tempranas de la infección con ShMV y TMV. La acumulación de 5 miRs pertenecientes al denominado conjunto “A” de la Figura 3.8A (A, B) y la de tres mRNAs blancos validados en la Figura 3.11 (C, D) fue estudiada mediante qPCR a 6 dpi (A, C) y 11 dpi (B, D) ante la infección con bajo inóculo de TMV o ShMV. Los resultados se muestran relativizados al nivel de cada transcrito en plantas mock-inoculadas (línea horizontal = 1). \* =  $p < 0.1$ ; \*\* =  $p < 0.05$ ; \*\*\* =  $p < 0.01$ . Experimento realizado por otros integrantes del grupo.

### 3.6 – TMV y ShMV provocan la subacumulación del pre-miR166a en tabaco

En un previo trabajo de nuestro grupo (detallado en el Capítulo 2 de esta Tesis) se había visto que las infecciones con tobamovirus alteran la actividad del PmiR164a y la acumulación del precursor de miR164a en Arabidopsis, señalando por primera vez la importancia de la regulación transcripcional de los miRs ante infecciones virales [292]. En consecuencia, se decidió averiguar si la subacumulación de miRs detectada a tiempos tempranos (Figura 3.8A y 3.12) poseía un componente transcripcional, es decir, correspondía a una baja en la acumulación de los pre-miRNAs inducida por los virus. Con este objetivo, se utilizaron la técnica de qPCR y las muestras de cDNA empleadas para los ensayos de la Figura 3.12 para analizar la acumulación de precursores de miRs en muestras de plantas sujetas a los tres tratamientos. A pesar de los esfuerzos realizados para detectar mediante qPCR la presencia de varios precursores de miRs en tabaco, utilizando el conocimiento de secuencias de sus ortólogos reportados en Arabidopsis y tomate (*Solanum lycopersicum*) al momento de realizar este experimento, sólo el pre-miR166a de tabaco pudo ser amplificado. Este resultado, si bien fue contrario a lo deseado, no fue sorprendente, ya que se sabe que

los precursores de miRs de plantas son difíciles de detectar, probablemente debido a su veloz procesamiento [164]. La Figura 3.13A muestra las estructuras secundarias predichas bioinformáticamente y los alineamientos de los precursores de tabaco y tomate. Puede observarse que la estructura secundaria está altamente conservada, así como la secuencia primaria como lo muestra el alineamiento, en particular para el miR166a maduro, con 100% de conservación interespecífica. Esto es característico de miRs ancianos, compartidos en una amplia escala taxonómica de plantas [142-143]. En la Figura 3.13B-C se observan los resultados de las acumulaciones medidas por qPCRs del pre-miR166a en plantas tratadas con los dos virus relativos a plantas no infectadas (barra horizontal = 1). Se observa que a 6 dpi TMV subregula al precursor de manera significativa, mientras que ShMV ocasiona una disminución muy ligera y no significativa. A 11 dpi, en cambio, no sólo TMV induce una represión más acusada del pre-miR166a respecto de plantas no infectadas, sino que también ShMV lo subregula, esta vez de manera estadísticamente significativa. Esto está en línea con lo observado para la subacumulación del miR maduro (miR165/6) en la Figura 3.12A-B, en la cual primero TMV ocasiona su subacumulación a 6 dpi, y luego ambos virus, a 11 dpi y sugiere un mecanismo transcripcional detrás de esta acumulación alterada. Nuevamente se observan patrones de cambio similar para ambos virus, con los efectos de ShMV siendo menos marcados y más tardíos que los de TMV (Figuras 3.9 y 3.12).

En conclusión, en etapas tempranas de la infección, cuando no hay virus detectable en las hojas sistémicas analizadas (6 dpi) TMV ocasiona la subacumulación del pre-miR166a y del miR165/6 maduro, lo cual correlaciona negativamente con la sobreacumulación de su mRNA blanco, ortólogo a ATHB-8. A 11 dpi ambos (precursor y miR maduro) acentúan su subregulación y ATHB-8 responde de la manera inversa, sobreacumulando unas 20 veces respecto de los controles. Por otro lado, ShMV tarda más en producir el mismo tipo de fenómenos, ya que a 6 dpi ni el precursor ni el miR maduro ni ATHB-8 muestran cambios en su acumulación, los cuales mimetizan la respuesta producida por TMV recién a 11 dpi. De modo que la regulación del miR166a ante infecciones virales posee un componente transcripcional que es más marcado en el caso del virus que produce los síntomas más severos y más velozmente. El virus más severo (TMV) altera la acumulación y la actividad de miRs más rápidamente que el ShMV.



**Figura 3.13.** El pre-miR166a se reduce ante las infecciones virales. A) Estructuras secundarias predichas de los precursores del miR166a en tabaco y tomate, según el programa *RNAfold* (arriba). Abajo, alineamientos entre las secuencias de dichos precursores mediante ClustalX, que muestra en verde oscuro la secuencia del miR166a maduro (idéntica para ambas especies). B-C) Análisis por qPCR de la acumulación del pre-miR166a en plantas infectadas con TMV o ShMV, relativizada a la acumulación observada en plantas mock-inoculadas (barra horizontal = 1) a 6 y 11 dpi, respectivamente. \*\* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,01$ . *Experimento realizado por otros integrantes del grupo.*

### 3.7 –TMV aumenta la densidad de redes de correlación de acumulación de metabolitos y miRNAs indicando compleja reprogramación de vías regulatorias

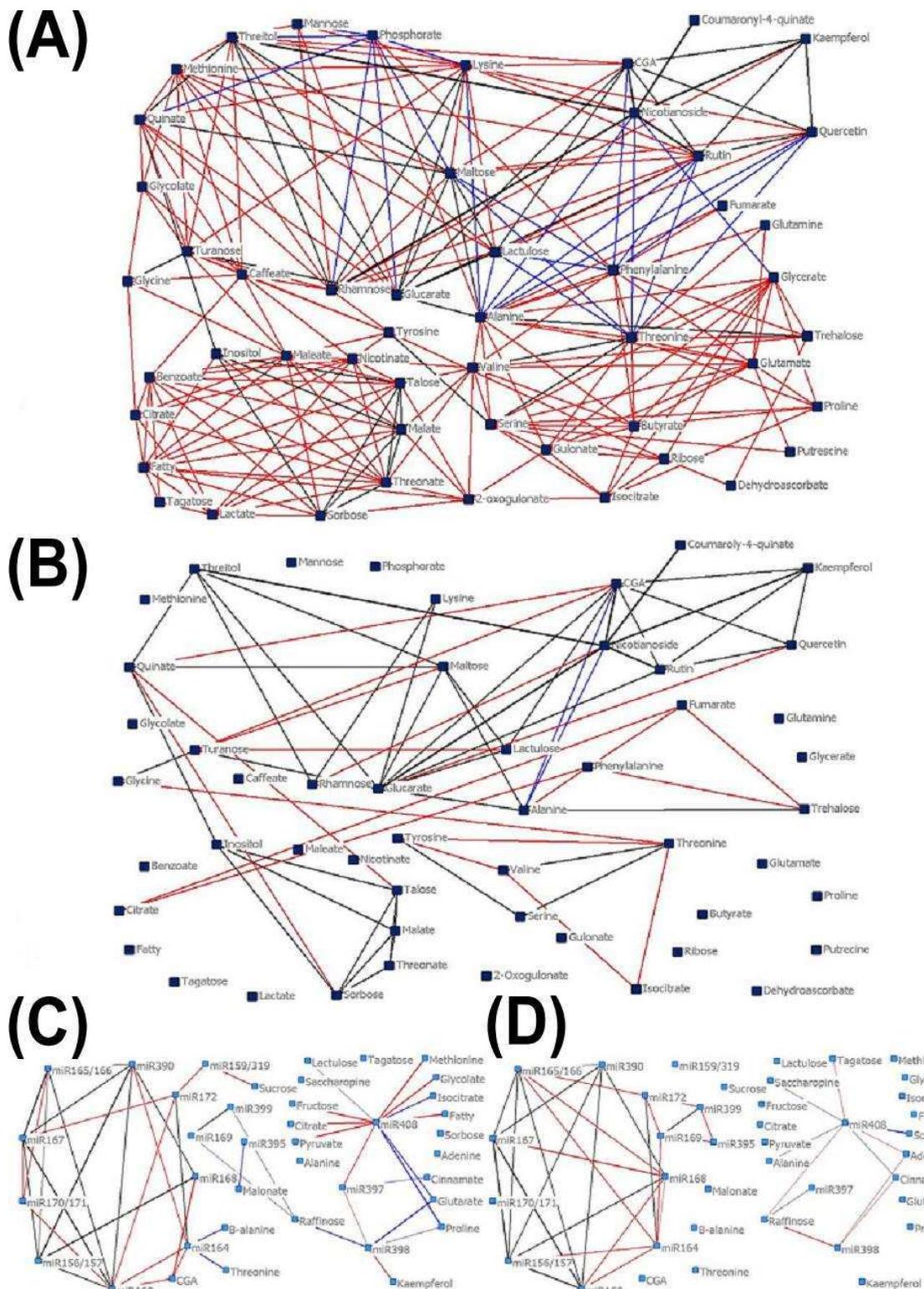
Los datos a gran escala obtenidos a nivel molecular en los experimentos de metabolómica (Figuras 3.4 y 3.5) y de transcriptómica de miRs (Figura 3.8) permiten abordar la cuestión de los cambios de acumulación de estas biomoléculas más allá de la comparación puntual o por subgrupos con características comunes (como la comparación entre niveles de aminoácidos de la Figura 3.6). Con la gran cantidad de datos generados, se está en condiciones de responder a la pregunta de cómo cambia la relación entre la acumulación de todos los metabolitos y miRs analizados durante todo el proceso infeccioso, y compararlo con lo que ocurre durante el desarrollo normal de la hoja sistémica, sin infectar. Este tipo de análisis a gran escala permite visualizar gráficamente las conexiones significativas que tienen lugar para formar redes complejas, cuyos nodos son metabolitos individuales. Estas conexiones pueden dar lugar a la identificación de grupos de metabolitos que se co-regulan en alguna circunstancia en particular y potencialmente dejan de hacerlo en otra. O permiten

identificar nodos especialmente importantes, al mostrar un número de conexiones anormalmente alto dentro del total de nodos analizados, posible indicación de un metabolito o gen de importante función regulatoria.

Con el objetivo de formar este tipo de redes con los datos obtenidos, se tomaron los datos de acumulación normalizados para todos los metabolitos analizados (a 1, 5, 8, 15 y 22 dpi) en todas las réplicas biológicas dentro de cada dpi, tanto para muestras mock-inoculadas como infectadas por TMV, datos que originaron las Figuras 3.4 y 3.5. Luego se realizó un análisis de correlación de Spearman, que permitió vincular a cada metabolito con todos los demás, tanto para las muestras mock-inoculadas como (por otro lado) las infectadas por TMV. El coeficiente de correlación por rangos de Spearman (no paramétrico) se prefirió sobre el de Pearson (paramétrico) debido a que su naturaleza no paramétrica lo hace más resistente a variaciones individuales de las réplicas biológicas. Algunas de ellas pudieran ser en realidad *outliers*, o sencillamente datos que se desvían mucho de los valores típicos del grupo y afectan mucho al valor medio (pero no tanto a la mediana). El análisis de correlación de Spearman da como resultado una tabla simétrica, en cuya diagonal principal se indica el valor de  $R$  (correlación) de cada metabolito con sí mismo ( $=1$ ), por debajo se detallan los valores de  $R$  de cada comparación de la tabla de doble entrada, y por encima de la diagonal principal, los p-valores de cada comparación. Debido al gran número de comparaciones realizadas, y al concomitante aumento de la probabilidad de error de tipo I (falsos positivos), se eligió un  $\alpha < 0.001$  (previo filtrado de las comparaciones consideradas como de correlación relevante sólo si  $IRI > 0.5$ ). Además, y también con el propósito de mayor claridad, los metabolitos muy estrechamente vinculados de una misma familia se promediaron previamente al análisis y se consideró un solo valor (nodo). Éste fue el caso de los ácidos grasos (indicados en la red como *Fatty*), los compuestos relacionados con el clorogenato (*CGA*) y los nicotianósidos (*Nicotianoside*). Los resultados se muestran en la Figura 3.14. Al analizar las redes originadas, se observa que en plantas infectadas la red es más densa, como resultado de 249 correlaciones significativas, contra sólo 69 en plantas no infectadas (Figura 3.14A-B).

Se sabe que varios miRs poseen roles relevantes en la respuesta ante estrés (de nutrientes, sequía u otros tipos de estreses abióticos o bióticos [168]) y que por lo tanto tienen un impacto indirecto en algunas respuestas metabólicas. Por otro lado, de manera inversa la acumulación de los miRs pueden alterarse ante hormonas [292], algunos de cuyos metabolitos precursores fueron analizados en la Figura 3.4. Por consiguiente, dos análisis de correlación adicionales fueron realizados, para incluir los miRs en su relación con los metabolitos tanto en muestras infectadas como mock-inoculadas (Figura 3.14C-D). Para estos análisis, sólo se estudiaron correlaciones metabolitos-miRs y miRs-miRs. De este modo, el número de comparaciones disminuyó muy considerablemente, por lo que se pudo bajar el valor de " $\alpha$ " a  $\alpha < 0.01$  (manteniendo  $IRI > 0.5$  como criterio de filtrado previo de las comparaciones consideradas como de correlación relevante). Nuevamente, la densidad de correlaciones fue mayor en plantas infectadas (49) que en mock-inoculadas (37). Más aún, 31 correlaciones resultaron significativas sólo en plantas infectadas mientras que apenas 17 fueron exclusivamente vistas en no infectadas (Figura 3.14C). Es interesante el hecho de que miR408 aparece en una posición central como nodo especialmente

conectado, con 11 conexiones en plantas infectadas y 7 en plantas no infectadas. En plantas infectadas, miR408 correlacionó particularmente con metabolitos pertenecientes al ciclo de Krebs (citrate, isocitrate, glycolate, glutarate and pyruvate); todas estas correlaciones significativas están ausentes en plantas no infectadas.



**Figura 3.14.** Análisis de correlación por rangos no paramétrico de Spearman. Correlaciones metabolito-metabolito (A,B) y metabolito-miR y miR-miR (C,D) calculadas usando los datos de plantas infectadas (A,C) y mock-inoculadas (B, D) para todos los dpi analizados en cada caso. Sólo correlaciones significativas estadísticamente se muestran. Las correlaciones fueron consideradas significativas si  $IRI > 0.5$  (A-D) y si  $p < 0.001$  (A,B) o  $p < 0.01$  (C,D). Correlaciones positivas en un solo tratamiento están representadas con líneas rojas, negativas con líneas azules, y correlaciones halladas en ambos tratamientos están representadas por líneas negras, sin importar el signo.

## Discusión

### La relevancia de un enfoque global en el estudio de interacciones planta-virus

Al interferir con el proceso normal de desarrollo, las infecciones virales en plantas producen un amplio abanico de síntomas, detectables tanto a escala molecular como con el ojo desnudo. Incluyen alteración de la división celular y/o su morfología, aparición de patrones de mosaico por cambios en la pigmentación de la hoja, crecimiento enrollado de hojas o disminución del tamaño de la planta, etcétera [7]. El estudio a nivel molecular de los resultados de las infecciones virales se ha realizado utilizando diversas técnicas, incluyendo hibridación de microarreglos, secuenciación masiva de sRNAs y mRNAs y metabolómica basada en resonancia magnética nuclear [114, 291, 327-328], por mencionar sólo algunos. La cabal comprensión de la interacción planta-virus necesita de enfoques más integradores que reduccionistas [290]; es en base a este concepto que la combinación de diferentes (pero complementarios) enfoques globales sobre el impacto de la infección viral puede arrojar nueva luz sobre los procesos en marcha en el patosistema. El acelerado desarrollo de técnicas *-ómicas* disponibles a cada vez menor costo y mayor fiabilidad técnica pone a disposición del investigador la posibilidad de mirar un panorama más completo y desde ángulos diversos la interacción entre el virus y su huésped. Diversos programas computacionales, a su vez, aportan una herramienta indispensable para poder obtener conclusiones útiles a partir de una ingente cantidad de datos y encontrar así relaciones entre diferentes componentes celulares ante la infección o redes de expresión o acumulación diferenciales, que de otra manera podrían pasar desapercibidas. La utilización en este trabajo de datos tanto metabolómicos como transcriptómicos tiene sentido en este contexto de estudio.

La elección de una única hoja sistémica en cuyo tejido se realizaron todos los análisis del presente trabajo reviste importancia y lo diferencia de la elección realizada en el trabajo referido en el Capítulo 2 de esta Tesis (donde plantas enteras de *Arabidopsis* fueron muestreadas). Esto es así debido a que, por un lado, el trabajo en hojas sistémicas de tabaco permitió indagar sobre cambios moleculares en tejidos a los que aún el TMV no había llegado. Además las hojas infectadas son una fuente más heterogénea y variable de análisis, ya que incluyen células infectadas con diverso nivel de acumulación viral (y diferente nivel de daño, señales hormonales y transcripción diferencial de genes de defensa y respuesta a estrés) y células sanas, en una mezcla compleja [305]. Más adelante en esta Tesis se profundizará el concepto de estudio de una sola hoja sistémica y se realizará aún más el valor de este tipo de diseño experimental a la hora del estudio de infecciones virales en plantas.

### El cambio metabolómico bifásico refleja en cada etapa el impacto sistémico de la infección por TMV

Como primer resultado notable, se destaca la observación de cambios metabólicos detectables ya a 1 dpi en hojas sistémicas de plantas infectadas con TMV

(Figura 3.4), bastante antes de que el virus llegue a la hoja analizada (Figuras 3.2 y 3.7). En base a la naturaleza de algunos de los metabolitos primarios sobreacumulados a 1 dpi por TMV, es posible hipotetizar que los mismos “preparan” a los tejidos sistémicos para resistir la infección, en avance de la misma. El ácido benzoico, por ejemplo, es precursor de la hormona SA. Los ácidos grasos palmitato, pelargonato, estearato y miristato, que se sintetizan en el cloroplasto, tienen un importante rol en la señalización ante el ataque de patógenos y algunos de ellos pueden ser precursores del MeJA e iniciar la respuesta oxidativa. Más aún, los ácidos grasos de 16C y 18C (como palmitato y estearato) son importantes para montar la defensa a partir de efectores [329]. Tanto SA como MeJA son hormonas cuya acumulación es alterada ante ataque de patógenos y respuesta a estreses variados [53-54, 88, 330]. Mucho se ha escrito acerca de la naturaleza de la señal que viajaría por floema ante las infecciones virales, pudiendo determinar en ocasiones, SAR; sin embargo, aún no está clara su identidad, aunque se ha propuesto que precursores de SA y MeJA están involucrados en diferentes momentos [47, 93]. El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), un conocido neurotransmisor en mamíferos presente también como aminoácido no proteico en plantas, se sobreacumuló a 1 dpi. Su síntesis aumenta en plantas ante estreses bióticos y abióticos y tiene roles importantes en el metabolismo primario; se ha propuesto también con rol de señalización y en el metabolismo energético ([331]). Otro metabolito primario inducido a 1 dpi con un papel relevante conocido ante ataque de patógenos es el dehidroascorbato. Éste constituye la forma oxidada del ácido ascórbico, el cual a su vez puede secuestrar ROS, una consecuencia común ante el ataque por patógenos, y determinar la gravedad de los síntomas disparados por infecciones de RNA virus [332]. De manera coherente con estos resultados, un reporte previo había indicado un aumento transitorio de ácido ascórbico y ácidos grasos en hojas sistémicas de plantas de tabaco infectadas con TMV [328]. El análisis metabolómico de dpi posteriores demostró la existencia de una bifase en el perfil de cambios de acumulación de metabolitos primarios, que pasaron de sobreacumulación de más de 20 metabolitos a 1 dpi a subacumulación de pocos metabolitos a 5 dpi y a un perfil de cambios más complejo, con sobreacumulaciones y disminuciones, a dpi subsiguientes. Por otro lado, la cantidad total de metabolitos cuya acumulación cambió de manera estadísticamente significativa entre plantas infectadas y mock-inoculadas mostró un constante incremento de 5 a 22 dpi (Figura 3.4B). Esto significa que la cantidad de cambios de metabolitos correlacionó con la acumulación viral, una vez que el virus hubo pasado a la hoja sistémica, a 8 dpi y podría ser la consecuencia de la alteración del metabolismo de la planta por la gran cantidad de recursos desviados para la replicación viral, en una “competición por recursos” [319]. Esta idea es apoyada por la significativa correlación negativa existente entre la acumulación viral (medida por ELISA) y la subacumulación de casi todos los aminoácidos analizados a través del proceso infeccioso. Además, la correlación entre los valores de  $R$  de dichas correlaciones individuales y la proporción de aminoácidos constitutivos de la CP viral, resultó más significativa aún desde el punto de vista estadístico ( $p = 0.002$ , Figura 3.6). Asimismo, algunos metabolitos secundarios como el kaempferol, la quercetina y compuestos derivados de ácido cafeico se encuentran inducidos a etapas tardías de la infección (Figura 3.5). Estos metabolitos secundarios se han visto sobreacumulados en plantas de tomate y *Arabidopsis* ante varios estreses abióticos, incluyendo déficit de

nitrógeno [333-334], un nutriente que podría estar siendo dirigido hacia la biosíntesis de macromoléculas virales. Estos datos refuerzan la hipótesis de que si bien a 1 dpi los cambios metabolómicos estarían reflejando señales de la hoja inoculada hacia la sistémica en avance a la infección, en etapas tardías la competición por recursos juega un rol relevante, al menos en los metabolitos primarios directamente traccionados por el virus.

### **Múltiples estímulos pre-transcripcionales y efectos post-transcripcionales virales determinan una bifase en acumulación de miRs maduros**

Este perfil bifásico de acumulación fue en alguna medida replicado en el análisis de acumulación de miRs maduros (Figura 3.8). En este caso, la etapa “temprana” de la infección se circunscribe a 5 dpi, la cual se diferencia de etapas tardías (a 15 y 22 dpi) mediante el análisis de HCL. Se destaca un grupo de miRs cuya acumulación es subregulada por TMV a 5 dpi e inducida más tarde; también para el caso de los miRs se propone más de un mecanismo actuante para explicar el perfil de cambios de acumulación relativa. A 5 dpi no se detecta la presencia de proteínas virales en la hoja sistémica y por lo tanto, de VSRs. En cambio, como es visto por la subregulación del pre-miR166a (Figura 3.13B), es posible postular la existencia de un componente transcripcional que esté regulando promotores de miRs, análogamente a lo observado por nuestro grupo previamente (Capítulo 2 de esta Tesis). La multiplicidad de metabolitos que varían su acumulación ya a 1 dpi en hoja sistémica, varios de ellos de conocida función regulatoria, como señalara más arriba, permiten hipotetizar que los promotores de miRs podrían estar respondiendo de manera indirecta a algunas de estas señales en avance del virus en el tejido analizado. Más tarde, ya con el virus presente sistémicamente (15 y 22 dpi) el componente transcripcional puede seguir cumpliendo un rol en la alteración de la acumulación de miRs, pero otros mecanismos estarían agregando efectos adicionales. Al respecto, al ya tradicional enfoque que resalta el papel de la proteína p126k de TMV en la acumulación de dúplex miRs/miRs\* ([309, 311]) se agregan otros que destacan la posibilidad de que factores endógenos como proteínas AGO estén jugando un rol, secuestrando sRNAs [114]. Ambos mecanismos podrían dar lugar al observado aumento en la acumulación de miRs maduros detectado, que va de la mano de un perfil de acumulación de mRNAs blanco que no siempre correlaciona negativamente con la misma (Figura 3.12B, D), como se ha reportado en varias ocasiones ([114, 240, 288, 291-292]). Esa misma ausencia de correlación negativa entre sobreacumulación de miRs maduros en plantas infectadas, y sus mRNAs blanco, podría asimismo obedecer a varias causas: que el conjunto de proteínas AGO que pueden cargar miR maduros es limitado y ya no ejerce efecto una mayor disponibilidad de los mismos, o un mecanismo de retroalimentación aumenta la síntesis de mRNAs a medida que van siendo eliminados y/o un efecto de inhibición de la traducción, más que corte, es ejercido por los mRs en exceso [114]. Se ha comprobado que al menos algunos miRs están presentes en el floema de plantas, donde se sobreacumulan ante diversos estreses abióticos [335]; aunque no pueda descartarse que la sobreacumulación de algunos miRs observada en la Figura 3.8 a etapas tardías se deba al aporte sistémico de miRs maduros viajando por el floema

desde la hoja inoculada, hasta hoy no se ha comprobado de manera definitiva que los miRs puedan viajar por el floema [335]. Además, sólo un puñado de miRs se ha detectado en floema hasta la fecha, un conjunto mucho más pequeño que el sobreacumulado en hojas sistémicas en el presente trabajo.

Recientemente, se ha visto que varios virus pertenecientes a familias diferentes (incluyendo tobamovirus) inducen la acumulación del miR168 en *Arabidopsis* [240]. En el mismo trabajo, los autores reportan una co-acumulación de varios otros miRs maduros analizados, así como de sus mRNAs blanco. El hallazgo de que el nivel de mRNA de AGO1 (blanco de miR168) permanece relativamente sin cambios, pero el nivel de proteína AGO1 disminuye, apunta a que el mecanismo actuante es la inhibición de la traducción. El hecho de que varios virus provoquen un efecto similar podría indicar un valor adaptativo para los mismos en lograr este efecto. Dicha acumulación del miR168 y varios otros miRs en tejidos sistémicos a etapas tardías es similar a lo observado en la Figura 3.8A de este trabajo. Sin embargo, la presencia de motivos conservados en los promotores de miRs [176], muchos de los cuales responden a hormonas relevantes ante estreses incluyendo respuesta ante infecciones virales (Capítulo 2 de esta Tesis), indica que el nivel de acumulación final observado para cada miR maduro en diferentes etapas de la infección puede ser muchas veces el resultado complejo de señales de entrada (*inputs*) variadas, más el efecto de regulación post-transcripcional influido por los VSRs o AGOs.

### **Los análisis de correlación permiten identificar metabolitos y miRs potencialmente claves en la respuesta ante la infección viral**

En este sentido, se destacan algunos miRs como miR403 y miR408, que escapan a la regla general y se reprimen a 22 dpi (Figura 3.8A). Los análisis de correlación muestran que miR408 es un nodo importante que se correlaciona con metabolitos del ciclo de Krebs, particularmente en plantas infectadas (Figura 3.14C, D). MiR408, junto con miR397, miR398 y miR857, participa de la regulación post-transcripcional de mRNAs de proteínas que contienen cobre, y así modula la disponibilidad de este micronutriente en condiciones de estrés [227, 336]. En particular, miR408 regula a la plantacianina (AT2G02850), una proteína presente en raíces y flores [228], y así ahorra cobre para su uso en la plastocianina, esencial para el transporte de electrones en el cloroplasto, u otras como por ejemplo COX5b-1, mitocondrial. En vista de este último caso es que podría explicarse la correlación entre miR408 y los metabolitos del ciclo de Krebs, dependientes en última instancia también de proteínas de cobre. MiR397 (cuyos mRNAs blanco pertenecen al grupo de las lacasas) y miR398 (cuyos mRNAs blanco son superóxido dismutasas de cobre 1 y 2 y su chaperona, CCS1 además de COX5b-1) muestran un patrón de acumulación inverso, pudiendo indicar un redireccionamiento en el uso del cobre en plantas infectadas, lo cual correlaciona con metabolitos de la respiración celular. Notablemente, hay datos que sugieren que la plantacianina puede estar vinculada con la defensa, el intercambio redox con moléculas pequeñas y la respuesta a estrés [337], como molécula señalizadora ante la simbiosis nodular en *M. truncatula* [338], entre otros roles [339]. Desde este punto de vista, la subregulación de miR408 podría tener un valor adaptativo para la planta al

permitir una sobreacumulación de su mRNA blanco. Sería interesante estudiar los niveles de acumulación y/o actividad de las diferentes enzimas de cobre reguladas por estos miRs a lo largo de la infección y comprobar estas hipótesis.

El hecho de que el número de correlaciones entre metabolitos y entre metabolitos y miRs (Figura 3.14) sea mayor en plantas infectadas que en mock-inoculadas podría indicar que la infección con TMV dispara la activación de vías metabólicas que están muy interconectadas. Así, podría ser el caso de que a través de la modificación de reguladores maestros, como podría ser el caso de los miRs, otros genes río abajo y los metabolitos dependientes de ellos, estén co-regulados muy estrechamente. Este podría ser el caso de miR408, como se mencionó más arriba. Por otro lado, otros metabolitos se mantuvieron a niveles constantes independientemente de la presencia de TMV; fue el caso de la mayoría de los metabolitos secundarios, cuyas redes de correlación se mantuvieron similares (Figuras 3.5 y 3.14A, B). Esto es coincidente con datos previos que indican que estos compuestos son parte de un sistema de defensa autónomo [340].

Es posible entonces pensar que las alteraciones metabólicas a 1 dpi, que incluyen inducciones de metabolitos precursores de señalizadores hormonales, sean producidas por la detección de patrones moleculares virales reconocidos por el huésped (VAMPs) y determinen la alteración de la acumulación sistémica de miRs ya a 5 dpi. Esto es apoyado por el hecho de que precursores de las hormonas SA y MeJA, que forman en plantas infectadas nodos importantes de correlación ante la infección viral, se inducen a 1 dpi. Varios de los miRs que muestran el perfil de acumulación bifásico son relevantes tanto ante respuestas a estreses como en la determinación del desarrollo [168, 201]. En este sentido, la alteración menor y más tardía de los miRs y mRNAs blanco analizados ante la infección por ShMV a etapas tempranas (en comparación con los efectos provocados por TMV, Figura 3.12) coincide con el desarrollo de síntomas menos severos (Figura 3.9). Esto puede indicar que dichas alteraciones tempranas de miRs (y su impacto en el nivel de mRNAs blanco) son importantes en la determinación de la severidad o la velocidad de desarrollo de los síntomas disparados por las infecciones virales.

## Conclusión

En el presente trabajo se demostró que ante la infección por TMV, los cambios en la acumulación tanto de metabolitos primarios como de miRs maduros siguen un perfil bifásico a lo largo del proceso infeccioso en hojas sistémicas. Es probable que las señales provenientes de la hoja inoculada, algunas de ellas precursores de hormonas de conocida relevancia en defensa como precursores del SA y el MeJA, se propaguen por el floema y se acumulen en la hoja sistémica en avance del virus o induzcan su propia acumulación sistémica a partir de nueva síntesis o bien (tal vez adicionalmente) otras señales sistémicas viajen y sean las que induzcan la síntesis de estas moléculas en tejidos sistémicos, donde se sobreacumulan ya a 1 dpi. Es importante la detección aumentada de precursores de SA y MeJA, ya que recientes reportes indican una señalización dual (más robusta) ante infecciones virales mediada por precursores de estas hormonas [47, 93]. Esta inducción podría ser causal de la acumulación diferencial de pre-miRs, miRs maduros y algunos de sus mRNAs blanco a 5 dpi, cuando aún no hay

virus sistémicos. Este efecto puede ocurrir en principio por un mecanismo transcripcional. Experimentos adicionales deberían señalar la sensibilidad de los promotores de diversas familias de miRs al tratamiento con hormonas relevantes en procesos de defensa y respuesta a estreses en general. Asimismo, y en base a lo observado a tiempos tardíos de la infección, es relevante el estudio de las relaciones causales que puedan subyacer a la densificación de las redes de correlación entre metabolitos, y entre éstos y los miRs, con el objeto de explicar el comportamiento coordinado de su cambio en acumulación. El conocimiento de posibles regulaciones de vías metabólicas por parte de miRs (o viceversa) podría ser de gran ayuda en la comprensión de la interacción planta-virus y sus efectos sobre los síntomas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal e infecciones virales

Las plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nn y cv. Xanthi NN) fueron crecidas en invernadero con temperaturas dentro del rango de 20 a 26 °C con ciclos de 16 horas de luz y 8 de oscuridad (fotoperiodo 16:8 h). Para infectar plantas de *N. tabacum*, se tomó una hoja única expandida (hoja número 5), se le agregó carborundo de grado fino y 20 µL de virus TMV o ShMV semipurificado en buffer Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM pH = 7. La superficie de la hoja fue luego raspada manualmente con cuidado para favorecer la entrada de partículas virales al tejido foliar. El nivel del inóculo utilizado fue previamente medido en *N. tabacum* cv. Xanthi NN estableciéndose aproximadamente un nivel de 200 lesiones locales (LL) en los experimentos de las Figuras 3.1 a 3.8 y 3.14 y de 20 LL en experimentos de Figuras 3.9, 3.10, 3.12 y 3.13 para ambos virus para lograr infecciones cuya fase inicial fuera más lenta. Se muestreó la hoja número 8, ubicada por encima de la hoja número 5, previamente inoculada, para los análisis metabolómicos y de expresión génica.

### Cuantificación de proteínas

En todos los casos, la determinación de la concentración de proteínas totales se realizó utilizando el *Bio-Rad protein assay* de Bio-Rad, basado en el método de Bradford [313], según las especificaciones del fabricante. La proteína de las curvas de calibración fue BSA, la cual se diluyó en cada caso en el buffer de extracción pertinente. Se utilizaron placas transparentes de 96 pocillos de Greiner Bio-one. Un espectrofotómetro Multiskan Spectrum (Thermo Corporation) fue usado para medir absorbancia a 595 nm.

### Detección por DAS-ELISA de CP virales

Para realizar la detección por DAS-ELISA de CP de TMV y ShMV se utilizó el kit anti-TMV de BIOREBA siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron placas transparentes de 96 pocillos Nunc MaxiSorp®. Un espectrofotómetro Multiskan Spectrum (Thermo Corporation) fue usado para medir absorbancia a 405 nm.

### Técnicas clásicas de biología molecular

Las técnicas de extracción de DNA plasmídico, digestión con enzimas de restricción, llenado de extremos protruyentes, defosforilación y ligación de DNA, obtención de células *E. coli* químicamente competentes o electrocompetentes y su transformación, electroforesis de DNA en geles de agarosa y de PCR se realizaron según protocolos básicos [341-342] o utilizando kits comerciales, según lo indicado.

Todas las enzimas de restricción y modificantes utilizadas fueron de New England Biolabs, a menos que se indique lo contrario y se utilizaron según las especificaciones del fabricante. La purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa se realizó con el kit *QIAEX II® Gel Extraction* (Qiagen) y las purificaciones de DNA plasmídico de alta calidad para secuenciación se realizaron con columnas del kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen). Para el clonado de vectores por métodos tradicionales se emplearon las cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes. Todos los cultivos bacterianos fueron realizados en medio “lysogeny broth” (LB) líquido [343] adicionado con el antibiótico de selección ampicilina 100  $\mu$ g/mL. El medio LB semisólido en placa se preparó agregando agar (1,5 g/100mL) e IPTG y X-Gal para observar las colonias transformadas.

### **Análisis metabólicos**

Los análisis metabólicos de plantas *N. tabacum* fueron realizados por otros integrantes del equipo de trabajo. Aquí realizo una breve descripción a los fines de la mejor comprensión del trabajo realizado en esta Tesis.

Plantas de *N. tabacum* cv. Xanthi nn fueron inoculadas en su hoja número 5 con TMV o mock-inoculadas con buffer Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM pH = 7 (control) como se describe más arriba. A diferentes tiempos post-inoculación (1, 5, 8, 15 y 22 dpi) se muestrearon las hojas número 8 de las plantas, se las congeló inmediatamente en N<sub>2</sub> (l) y luego se las mantuvo a -80 °C hasta su utilización para extracción de metabolitos y análisis por GC-MS y HPLC-MS. Para una descripción detallada del procedimiento, consultar [320] y las referencias allí citadas. Brevemente, las abundancias de los metabolitos se calcularon usando la intensidad de los picos correspondientes a Ribitol o Isoxitexina (como controles internos) y el peso del tejido. Se calcularon promedios de las réplicas biológicas para cada tratamiento y dpi, los correspondientes errores estándar ( $\pm$  SE) y las significancias estadísticas de las diferencias entre tratamientos fueron calculadas usando la prueba de Student. Para mostrar y analizar la abundancia de los metabolitos y los resultados de las pruebas de las diferencias estadísticas entre tratamientos en una red, se utilizó el programa VANTED (<http://vanted.ipk-gatersleben.de/>), según lo reportado [344].

### **Detección de la CP de TMV por RT-PCR**

Se aisló RNA total de hojas de *N. tabacum* usando el reactivo de *TRIzol®* (Invitrogen) de acuerdo a instrucciones del fabricante, se cuantificó mediante el uso del NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) y se trató con DNase I (Invitrogen). Se sintetizó cDNA usando la transcriptasa reversa M-MLV (Promega) y cebadores al azar de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción de PCR se llevó a cabo usando la enzima Taq polimerasa de Invitrogen. El programa de amplificación del fragmento fue: 1 $\times$  (5 min 95 °C), 30 $\times$  (15 s 95 °C, 30 s 58 °C, 30 s 72 °C). El producto de amplificación fue analizado en un gel de agarosa 1.2/ .

### Extracción de RNA para experimentos de qPCR

El RNA utilizado para experimentos de qPCR fue obtenido mediante la puesta a punto de un protocolo de extracción de RNA total con fenol ácido usando *TRIZOL*<sup>®</sup> (Invitrogen) y adaptándolo para trabajar con baja masa de tejido (Ver Apéndice D de esta Tesis).

### Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

Todas las determinaciones basadas en qPCR siguieron los lineamientos establecidos en las reglas de calidad MIQE. Ver detalles acerca del cumplimiento de los requerimientos MIQE en la Tabla E1 del Apéndice E de esta Tesis.

### Extracción de sRNAs para microarreglos de miRNAs

Se extrajeron sRNAs totales de alta calidad de hojas de *N. tabacum* usando el kit comercial mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion<sup>®</sup>), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificaron los sRNAs totales mediante el uso del NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Los microarreglos utilizados pertenecieron a la plataforma comercial de Combimatrix *Combimatrix CustomArray™ 4X2K miRNA array*. Cada uno de estos dispositivos está subdividido en 4 sectores de microarreglos idénticos, permitiendo la hibridación simultánea con 4 muestras diferentes de sRNAs. Cada sector de microarreglos incluye sondas antisentido de oligonucleótidos de una longitud media de 22 nucleótidos, con una temperatura de fusión (“*melting*”) promedio entre 55 y 60 °C. Las 2000 sondas antisentido impresas en cada microarreglo son complementarias para el conjunto completo de miRs maduros de plantas como figuraba en la base miRBase 9.0 (<http://www.mirbase.org/>) y están dispuestas en triplicados técnicos dispuestos a través de cada microarreglo (las sondas correspondientes a *Arabidopsis thaliana* están presentes por cuadruplicado). Para tomar la decisión de aceptar los datos del microarreglo, se usaron los controles negativos de degradación de RNA (U6) y positivos de extracción (tRNAs) presentes también en cada microarreglo en varias réplicas técnicas. La preparación y el marcado de las muestras antes de hibridar se hicieron según indicación del fabricante. Luego de la incubación de las muestras con las sondas de los microarreglos, se escanearon las imágenes de alta resolución de cada dispositivo conteniendo 4 microarreglos de manera simultánea, utilizando para ello un escáner láser digital (arrayWoRx<sup>®</sup>, Standard Biochip Reader; Applied Precision, WA, USA).

Para extraer los datos a partir de estas imágenes, se utilizó el programa Microarray Imager de Combimatrix. Para cada dpi (5, 15 y 22 dpi) se utilizaron n = 6 plantas inoculadas con buffer sólo (*mock*) o con virus TMV, cada una de esas muestras estando presente en un array en particular. En cada dispositivo de 4 microarreglos, siempre dos contuvieron muestras provenientes de plantas infectadas y las otras dos, de plantas inoculadas con buffer. Las muestras de un mismo dpi se asignaron al azar a cada microarreglo para cada dpi, en los tres dispositivos usados (12 microarreglos en

total). Los tres dispositivos fueron usados con muestras de los tres dpi analizados; para lograr este objetivo, después de finalizada cada medición en un dispositivo (y siguiendo las instrucciones del fabricante) cada uno de ellos en sus 4 cámaras independientes fue lavado para arrastrar las muestras de miRs hibridadas y permitir su reutilización por dos veces. Esto permitió llegar a medir 36 muestras con los 3 dispositivos, obteniéndose así datos de 36 microarreglos en total, cada uno, una réplica biológica independiente. Por sugerencia del fabricante, los datos crudos de fluorescencia escaneados fueron normalizados y se realizó una sustracción del ruido de fondo de la imagen (proveniente de hibridaciones inespecíficas). A partir de esos datos se calculó un valor promedio para las réplicas técnicas de cada subtipo de miRNA para cada sonda especie-específica (ejemplo: *ath*/*-miR156a*) dentro de cada microarreglo, por separado. Luego se obtuvo un valor mediano (más resistente a variaciones que el promedio) para cada tipo de miRNA especie-específico (ejemplo: *ath*/*-miR156*) incluyendo todos los microarreglos, para cada dpi y cada tratamiento. Para dar mayor robustez a los resultados, los valores medianos obtenidos a partir de estos cálculos sólo se tuvieron en cuenta en caso de existir al menos tres valores promedio correspondientes a microarreglos independientes que mostraran valores por encima del ruido de fondo para cada subtipo de miRNA. Posteriormente se calculó el log<sub>2</sub> del cociente entre los valores normalizados de fluorescencia para cada tipo de miRNA y sonda especie-específica para muestras infectadas con virus o inoculadas con buffer. Por último, se realizó el cálculo de la mediana de los valores obtenidos para cada sonda especie-específica de modo de obtener un solo valor para cada miRNA para todas las sondas impresas en los microarreglos. Se analizaron juntos los miRNAs pertenecientes a familias cercanamente relacionadas con secuencias maduras muy similares (ejemplo: miR156 y miR157), siempre y cuando se verificara por separado un comportamiento similar ante la diferencia de tratamientos a lo largo de los dpi. Los resultados se visualizaron utilizando una escala en base a log<sub>2</sub> en color falso, mediante el programa MeV (MultiExperiment Viewer Version 4.2 August 1st, 2008) [345].

### **Validación de genes blanco de miRs en *N. tabacum***

Para mapear los supuestos sitios internos de corte de mRNAs blanco de miRs en tabaco, se aplicó la técnica de RLM-RACE (*RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends*) utilizando el kit comercial de GeneRacer™ (Invitrogen). Se usó un procedimiento de 5' RLM-RACE modificado [346]. Brevemente, se aisló RNA total de plantas de tabaco de 4 semanas de edad y se purificó la fracción correspondiente a RNA poliadenilado utilizando el kit comercial NucleoTrap® mRNA mini Kit (Macherey-Nagel). Se sintetizó el cDNA usando la enzima SuperScript™ III RT Module (Invitrogen). Se realizaron dos reacciones de PCR con cebadores anidados para amplificar el fragmento de cDNA, utilizando la enzima *Platinum® Pfx DNA Polymerase* (Invitrogen), cuya alta procesividad garantiza la máxima fidelidad posible para identificar con precisión el sitio de corte generado por el miRNA en su mRNA blanco. El amplicón fue posteriormente clonado en el vector pGEM®-T Easy (Promega) según indicaciones del fabricante. *E. coli* DH5α fueron transformadas y se seleccionaron en placa colonias

resistentes a ampicilina mediante tinción con IPTG y X-Gal. Posteriormente se purificó DNA plasmídico, previo a la secuenciación.

### **Análisis estadísticos**

Se calcularon análisis de correlación no paramétricos de Spearman utilizando el paquete estadístico de InfoStat (InfoStat (2008). InfoStat versión 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Se eligió un umbral para la significancia estadística de  $p = 0.001$  para datos de metabolitos y  $p = 0.01$  para miRNAs. Las correlaciones halladas estadísticamente significativas fueron dibujadas como líneas conectoras utilizando el programa NetDraw (<http://www.analytictech.com/>). La prueba T de Student también se realizó en Infostat. Pruebas estadísticas referidas a análisis de qPCR se detallan en las hojas MIQE correspondientes. Los niveles de significancia hallados se detallan debajo de cada figura.

### **Cebadores para PCR y qPCR**

Los cebadores usados para la detección del mRNA de CP de TMV por PCR, así como los utilizados para la amplificación de productos de ligación de RLM-RACE fueron diseñados utilizando el programa Vector NTI Advance 9 (Life Technologies). Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para qPCR se diseñaron utilizando el programa Primer Express 2.0 (Applied Biosystems). Para la cuantificación por qPCR de mRNAs blanco de miRs, se diseñaron los cebadores de modo tal de amplificar un fragmento del mRNA blanco conteniendo el sitio de reconocimiento de corte correspondiente al miRNA regulador. Los cebadores de microRNAs para la síntesis de cDNA y ensayos de qPCR fueron diseñados en base a [347] mediante el programa Vector NTI Advance 9 (Life Technologies). Todos los cebadores están listados en la Tabla F3 del Apéndice F de esta Tesis.

## **CAPÍTULO 4: EL ÁCIDO SALICÍLICO DETERMINA LA SENESCENCIA DIFERENCIAL PRODUCIDA POR DOS CEPAS DE TuMV, INVOLUCRANDO LA ACUMULACIÓN DE ROS Y CAMBIOS TRANSCRIPTÓMICOS TEMPRANOS.**

En el Capítulo 2 de esta Tesis se estudió el impacto de las infecciones de tobamovirus sobre el PmiR164a en plantas de *Arabidopsis*, así como su respuesta a hormonas y se determinó que este miR, importante en procesos de desarrollo foliar y radicular y en senescencia [172, 300, 302], es inducible por estos tratamientos.

En el Capítulo 3, se amplió el estudio del impacto de las infecciones virales mediante el análisis transcriptómico de miRs y análisis metabolómicos que reflejaron profundos cambios en el tejido sistémico tanto antes de la llegada de las partículas virales al mismo, como después, aunque de forma diferente (Figuras 3.4, 3.5 y 3.8). Estos cambios incluyeron un agotamiento preferencial de los aminoácidos libres en plantas infectadas en etapas tardías (Figura 3.6), lo que podría indicar competencia por recursos. Esto podría ser consecuencia de las diversas estrategias que los virus usan para cooptar recursos celulares del huésped compatible, promoviendo así la propia infección. En huéspedes compatibles, la invasión viral desencadena numerosos cambios bioquímicos y fisiológicos en células, tejidos e incluso plantas enteras [305]. Además, las infecciones virales inducen cambios transcriptómicos masivos en el huésped, incluyendo a un importante subconjunto de genes relacionados con la producción de ROS y su remoción, la señalización por SA y la senescencia, entre otros [69, 306-308]. Como resultado, una de las consecuencias probables de las infecciones virales compatibles es la senescencia adelantada en el tiempo [243].

La senescencia comienza con el desmantelamiento del cloroplasto, seguida por el catabolismo de macromoléculas [206, 246-247] y la desestabilización de la membrana celular [248]. La senescencia de la hoja es un proceso finamente regulado que determina la muerte de la célula, lo cual permite el reciclado de recursos valiosos [244] que de este modo, son relocalizados desde la hoja senescente hacia los tejidos en activo crecimiento [249-250]. La senescencia es disparada por la edad cronológica y por el desarrollo normal [251] y responde a señales endógenas [252]. Sin embargo, también está influida por factores de estrés tanto bióticos como abióticos [253-254, 257-260]. En este contexto, varios estímulos propios del desarrollo y también ambientales, incluyendo el ataque de patógenos, disparan la acumulación de especies reactivas de oxígeno intracelulares (ROS); entre ellas, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> parece ser un elemento relevante en la señalización y regulación de la senescencia [261-264]. El hallazgo del miR408 como importante nodo de las redes de correlación estudiadas en plantas infectadas (Figura 3.14) resultó un dato llamativo, ya que este miR participa en la homeostasis del cobre, vía el control de su mRNA blanco plantacianina [228]. En las infecciones virales esto puede tener consecuencias interesantes, ya que se relaciona con el estado redox de la célula, la senescencia, y otros procesos vitales.

La senescencia determina los cambios de expresión de muchos genes, incluyendo los de función regulatoria [263-264, 279]. Aquellos factores de transcripción que aumentan de manera consistente en diversos procesos que llevan a la senescencia, se denominan *senescence-associated genes* (SAGs). Muchos SAGs

también responden a estreses ambientales; de este modo, puede hipotetizarse que algunos de ellos sirven como integradores de las diferentes vías de señalización que controlan respuestas ante estrés o la senescencia dependiente de la edad cronológica [254, 280].

Los mayores grupos de SAGs se encuentran entre las familias de TFs que contienen dominios conservados de NAC y WRKY [267, 278], cuyos integrantes juegan importantes roles en la senescencia de la hoja. Se sabe que varios TFs de la familia NAC están involucrados en importantes redes de senescencia inducida tanto por desarrollo normal como acelerada por estrés, mayormente ORE1 [172, 280], su parólogo ORS1 [263] y JUB1 [261]. Mientras que ORE1 es regulado postranscripcionalmente por miR164, ORS1 no lo es. Los análisis bioinformáticos de sus promotores han revelado que ambos parálogos comparten muchos elementos regulatorios en común en *A. thaliana* y que incluso hay un muy alto grado de conservación de estos promotores en diferentes especies de la familia *Brassicaceae* [263]. La mayoría de estos motivos conservados poseen roles predichos en respuestas a estrés, daño mecánico o SA, incluyendo motivos de W-box y WRKY-box. Más aún, ORE1, ORS1 y JUB1 responden de manera diferente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [261, 263]. Los regulones controlados por ORE1 y ORS1 comparten sólo un subconjunto de genes corregulados río abajo [263], lo cual sugiere que estos genes NAC asociados a senescencia podrían tener a su vez regulaciones diferenciales para activar redes sólo parcialmente solapantes.

Por otro lado, la familia de TFs WRKY tiene 74 integrantes en Arabidopsis, y está involucrada en la regulación de la defensa de la planta, además de en los procesos de senescencia. De hecho, numerosos TFs WRKY de tipo III, incluyendo WRKY70, han sido caracterizados funcionalmente como reguladores de la senescencia foliar [281-283]. Específicamente WRKY70, un TF insensible al tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, posee una expresión creciente y dependiente de SA durante el proceso de senescencia, pero participa también de la señalización hormonal en los procesos de defensa ante patógenos [284-285].

Los nodos de convergencia entre señales de senescencia y defensa ante patógenos son importantes porque frecuentemente, las mismas hormonas cumplen roles clave en orquestar ambos procesos. Entre ellas, el SA tiene un papel central en la señalización de la defensa en plantas. El SA se requiere para el reconocimiento de compuestos derivados del patógeno y el subsiguiente establecimiento de resistencia local y sistémica [57, 348-349]. Varias condiciones de estrés, tratamientos con patógenos o con PAMPs, pueden disparar la acumulación de SA en plantas [349-351]. De manera coherente con estos datos, se ha visto que las plantas transgénicas NahG (que poseen el gen bacteriano *nahG*, el cual codifica para una enzima que degrada SA) muestran mayor susceptibilidad ante el ataque de patógenos celulares y algunos virus [66, 352].

De hecho, entre los estreses bióticos que disparan la respuesta mediada por SA en plantas están las infecciones virales [88]. A pesar de que el rol del SA está particularmente estudiado en las infecciones virales incompatibles [348], se han reportado casos en los cuales el SA juega un rol en patosistemas planta-virus compatibles, incluyendo Arabidopsis infectada con TuMV [70].

Mientras que hay varios estudios que han comparado los efectos de un mismo virus en diversos ecotipos de una misma planta, o entre cultivares de la misma especie

[306, 353-355], hay muchos menos trabajos evaluando las consecuencias diferenciales de las infecciones de cepas virales relacionadas en un mismo huésped, [356-357].

En el presente capítulo, se utilizaron las cepas JPN1 y UK1 de TuMV (un potivirus capaz de infectar miembros de la familia *Brassicaceae* [358-359]) para infectar plantas de *Arabidopsis thaliana* y *Brassica juncea* y caracterizar el impacto de las infecciones sobre sus huéspedes a lo largo de los procesos infecciosos. El análisis se centró en las diferencias de síntomas desarrollados por los huéspedes, la acumulación de moléculas antioxidantes y de ROS y de cambios transcriptómicos en SAGs de posible relevancia para los fenotipos observados. En base a lo aprendido en los trabajos que se describen previamente en esta Tesis, la selección del tejido a infectar y del tejido muestreado para realizar los diferentes análisis (fenotípicos, bioquímicos, moleculares) fue realizada cuidadosamente. De este modo, la reproducibilidad de los resultados se maximiza y fue posible detectar con claridad cambios sutiles que de otra manera podrían haber pasado desapercibidos. La aproximación al análisis incorporó también el componente temporal, que había demostrado ser de gran importancia en la caracterización de las infecciones virales en el Capítulo 3. En este capítulo también se evidencia el perfeccionamiento en el uso de varias técnicas ya usadas en capítulos previos, gracias a la utilización de protocolos mejorados y adaptados a los tipos de análisis específicos que se requirieron, y a la adopción de enfoques nuevos.

Como resultado de estos análisis, fue recientemente publicado en la revista *MPMI* un artículo del cual soy primer autor [360].

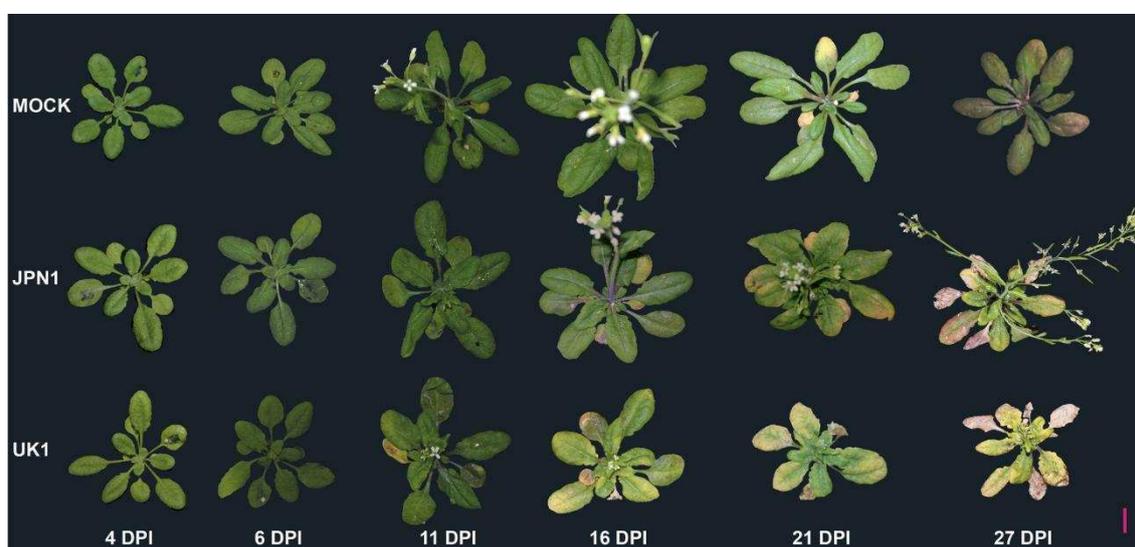
## Resultados

### 4.1 – Las cepas JPN1 y UK1 de TuMV inducen síntomas claramente diferenciables en *Arabidopsis*

Para comparar las respuestas fenotípicas de plantas de *Arabidopsis* ante dos cepas de TuMV, se inocularon plantas de *A. thaliana* (ecotipo Col-0) con los aislados UK1 o JPN1. Estos dos aislados son representativos de dos linajes de TuMV diferentes genéticamente que forman los grupos MB (“Mostly *Brassicaceae*”, que infectan mayormente plantas de esa familia) y MR (“Mostly *Raphanus*”), respectivamente [361]. De acuerdo a lo explicado en la Introducción de esta Tesis, la relación taxonómica entre dos potyvirus puede ser compleja. En base al análisis de la secuencia aminoacídica de la CP, se determinó como criterio que dos potyvirus que compartan más de un 90% de homología de secuencia de CP pueden considerarse como cepas pertenecientes a la misma especie (Figura 1.3) [23]. JPN1 y UK1 poseen homología de secuencia aminoacídica de un 93.49% global y 95.83% a nivel de la CP (F. Ponz y F. Sánchez, (CBGP, Madrid, España), resultados no publicados). Por lo tanto, JPN1 y UK1 pueden considerarse “cepas” de una misma especie viral, y así se denominarán a lo largo del presente trabajo.

En la Figura 1.15 de la Introducción se mostraron las principales diferencias fenotípicas producidas en *Arabidopsis* y en *Brassica juncea* ante las infecciones con ambas cepas de TuMV. Brevemente, se puede mencionar que el desarrollo de las plantas de *Arabidopsis* está alterado de manera diferencial por ambas cepas, y sus

síntomas son fácilmente diferenciables. Alrededor de una semana después de la inoculación, comienzan a distinguirse síntomas claros que permiten diferenciar a simple vista plantas infectadas de plantas tratadas con buffer o “mock”-inoculadas. TuMV UK1 interfiere dramáticamente con el desarrollo normal de la planta, induciendo la detención del crecimiento del tallo, la deformación de órganos florales y el aborto de semillas. TuMV JPN1, en cambio, provoca la pérdida de dominancia apical, el torcimiento del tallo y una ramificación alterada, además de otros patrones de desarrollo alterados, pero las plantas infectadas son capaces de formar vainas con semillas (Figura 1.15 y F. Ponz y F. Sánchez, resultados no publicados). En el presente trabajo se decidió abordar los aspectos fenotípicos diferenciales de mayor interés. Se inocularon plantas de *A. thaliana* con JPN1 o UK1 en una sola hoja (la 3ª hoja verdadera) en estadio 1.08, y se siguió una serie fotográfica comparando los fenotipos desarrollados por las plantas con los de plantas inoculadas con buffer a diferentes dpi (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Caracterización fenotípica de dos cepas de TuMV que infectan *Arabidopsis*. Aspecto de plantas de *Arabidopsis thaliana* Col0 luego de su inoculación con buffer sólo (panel de arriba) o infección con cepas JPN1 (panel del medio) o UK1 (panel de abajo) a lo largo de 27 días post-inoculación. Los tallos florales se cortaron justo antes de fotografiar las plantas mock-inoculadas a 21 y 27 dpi para mayor claridad. Las hojas número 3 (inoculadas) se indicaron con marcador negro. La barra es la escala = 1 cm.

Mientras que a 4 dpi no se detectaron síntomas visibles en las plantas infectadas, a 6 dpi pudo distinguirse una torsión en hojas sistémicas que formaban un ángulo pequeño con la hoja inoculada. A 11 dpi, el grado de torsión observado fue mayor en las hojas sistémicas jóvenes y se observó un ligero retraso en la floración de las plantas infectadas con ambas cepas, respecto de plantas mock-inoculadas. Llamativamente, en este punto pudieron comenzar a detectarse diferencias sintomatológicas entre cepas: plantas infectadas con UK1 ya presentaban amarilleamiento precoz de algunas hojas de la roseta, y en algunas de las hojas más viejas de la misma, se detectó una coloración violácea oscura. A 16 dpi las diferencias entre los tres tratamientos se acentuaron. Mientras que plantas infectadas con JPN1 lograron desarrollar el tallo floral y su roseta permaneció verde mayormente (aunque

se detectó un grado de torsión en algunas hojas sistémicas), el fenotipo de las plantas infectadas con UK1 resultó mucho más severo: el tallo floral prácticamente no se desarrolló, se generalizó el amarilleamiento de la roseta y desarrollaron hojas sistémicas muy torcidas y enrolladas, determinando un crecimiento atrofiado y en algún modo, interrumpido. Este tipo de diferencias se acentuó luego a 21 dpi; UK1 indujo la muerte de algunas hojas y el amarilleamiento de la roseta fue más marcado. A 27 dpi las plantas infectadas con ambos virus exhibieron una evidente aceleración del proceso de senescencia comparadas con las inoculadas con buffer solamente, pero sólo UK1 impidió la emergencia del tallo floral (Figura 4.1).

#### **4.2 – El proceso de senescencia está retrasado en plantas infectadas con JPN1, en comparación con UK1**

Para analizar en detalle y comparar más precisamente el proceso de senescencia desencadenado por ambas cepas, se registró la progresión de dicho fenómeno a través del tiempo en la quinta hoja verdadera de roseta (Figura 4.2A). Esta hoja presentaba un grado de desarrollo avanzado al momento de comenzar los análisis (Figura 4.1), de modo que su elección permitiría abarcar su proceso natural de senescencia casi hasta la muerte de la hoja, y compararlo con el sufrido ante infecciones con ambas cepas. La Figura 4.2A muestra que ni a 4 ni a 11 dpi pueden observarse diferencias evidentes entre los tres tratamientos (mock, UK1 y JPN1). Sin embargo, a 16 dpi las plantas infectadas con UK1 mostraron un claro amarilleamiento de las hojas 5, mientras que las plantas inoculadas con JPN1 evidenciaron muy pocos síntomas de senescencia respecto a las mock-inoculadas. Las diferencias entre tratamientos se acentuaron a 21 dpi, cuando UK1 provocó síntomas de senescencia avanzada y JPN1 indujo amarilleamiento del extremo distal de las hojas, mientras que las plantas sin infectar presentaron síntomas de senescencia muy suaves. A 27 dpi, las hojas de plantas infectadas con ambas cepas se tornaron completamente necróticas. Además, ya a 16 dpi UK1 indujo en las hojas infectadas la aparición de coloración violácea y rojiza, colores característicos de acumulación de antocianinas en hojas senescentes [269]. Este patrón se acentuó a los 21 dpi, aunque en plantas infectadas con JPN1 o mock-inoculadas fue apenas detectable hasta los 27 dpi.

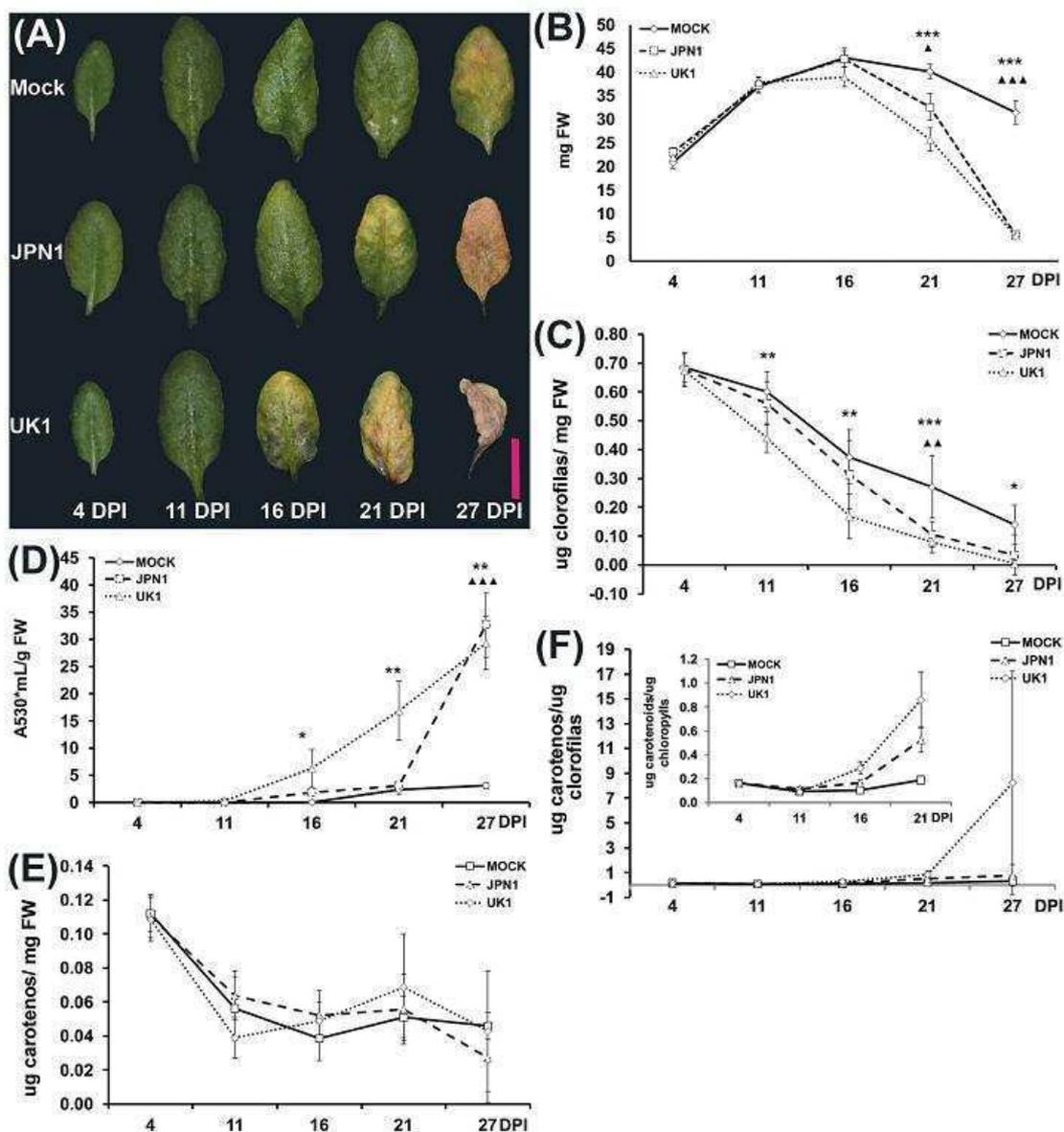
Para entender mejor el proceso de senescencia comparado, se determinaron marcadores fisiológicos de senescencia a través del proceso infeccioso (Figura 4.2B-F). Uno de estos marcadores es la pérdida de peso fresco (FW, por *Fresh Weight*). Hasta los 16 dpi, cuando la hoja 5 alcanzó su máximo peso, no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos. A los 21 dpi los virus aceleraron la pérdida de peso fresco en las hojas, particularmente UK1 al compararlo con JPN1 ( $p < 0.05$ ) y el tratamiento control ( $p < 0.001$ ) (Figura 4.2B). A los 27 dpi las hojas infectadas habían casi completado la senescencia completa.

Los niveles de clorofilas (Figura 4.2C) fueron significativamente menores en muestras infectadas con UK1 ya a 11 dpi, antes de que el amarilleamiento distal o la pérdida de peso fresco hayan sido detectadas a simple vista (Figura 4.2A-B). La cepa JPN1 indujo diferencias estadísticamente significativas respecto de plantas mock-inoculadas sólo después de 21 dpi.

Las antocianinas son compuestos flavonoides inducidos durante la senescencia [269]. Su acumulación también se cuantificó a distintos tiempos posinfección (Figura 4.2D). Como se esperaba, a 21 dpi la acumulación de pigmentos aumentó a partir de niveles casi indetectables en el grupo de plantas mock-inoculadas. La cepa JPN1 originó una acumulación algo más temprana de antocianinas, pero a un nivel estadísticamente no significativo ni siquiera a 21 dpi. Sin embargo, ya a 16 dpi UK1 provocó una abrupta sobreacumulación de estos pigmentos, los cuales alcanzaron una diferencia de 7 veces respecto a las plantas mock-inoculadas a 21 dpi. A pesar de que era esperable que las antocianinas aumenten inducidas por la senescencia acelerada, la aguda subida de estos flavonoides inducida por UK1 llamó la atención. Se sabe que las antocianinas también son inducidas por varios factores de estrés [274], los cuales disparan estrés oxidativo. Por lo tanto, su rol como antioxidante puede explicar al menos en parte el gran incremento en su acumulación inducido por UK1.

Otras moléculas antioxidantes inducidas por estrés oxidativo son los carotenoides [362-363], cuya biosíntesis al igual que la de las clorofilas, disminuye con la senescencia [267]. La Figura 4.2E muestra que no hay diferencias significativas en las concentraciones relativas de carotenoides entre tratamientos a lo largo del experimento. Sin embargo, puede detectarse una tendencia particular en muestras inoculadas con UK1 cuando se las compara con muestras tratadas con JPN1 o mock. Los análisis intra-tratamientos revelaron que sólo UK1 produjo un aumento consistente en la concentración relativa de carotenoides entre 11 y 21 dpi (+77%). A 27 dpi, la muerte de las hojas 5 infectadas con virus (Figura 4.2A) limitó posteriores análisis. Es interesante constatar que, al calcular los cocientes carotenos/clorofilas para todos los tratamientos (Figura 4.2F), se detectan claras diferencias. Este cociente fue 3 y 4 veces en UK1 (comparando con muestras mock-inoculadas) a 16 y 21 dpi, respectivamente. El grupo infectado por JPN1 mostró diferencias menores respecto de los controles a lo largo del experimento.

Se sabe que la degradación de las clorofilas origina subproductos reactivos que pueden generar ROS [266]. Por otro lado, las antocianinas pueden jugar rol antioxidante al proteger a la célula de la luz excedente cuando las clorofilas están siendo degradadas [271]. Por consiguiente, estos resultados en su conjunto sugieren que UK1 induce un estado oxidativo particular en las plantas infectadas.



**Figura 4.2.** Progresión comparada de la senescencia de las hojas 5 de plantas Col0 infectadas con dos cepas de TuMV. (A) Hoja 5 representativa, muestreada de las plantas inoculadas con sólo buffer (mock) o con las cepas JPN1 o UK1 de TuMV. Barra = 1cm. (B) Medidas de peso fresco de las hojas 5 muestreadas a lo largo del experimento.  $18 \leq n \leq 32$  hojas por tratamiento y dpi. (C–F) Contenidos de clorofilas totales (C), antocianinas (D) y carotenoides (E) y cociente carotenoides/clorofilas (F) en las hojas analizadas para los tres tratamientos.  $4 \leq n \leq 11$  hojas por tratamiento y dpi. (F) muestra dentro del gráfico principal una magnificación a escala del mismo entre 4 y 21 dpi, por claridad. Los asteriscos y triángulos pequeños indican diferencias significativas entre muestras mock/UK1 y mock/JPN1, respectivamente. Se utilizó ANOVA de una vía con la prueba a posteriori de Tukey. Las barras de error indican SE.

#### 4.3 – TuMV-GFP permite analizar la dispersión espaciotemporal del virus e identificar la hoja sistémica más afectada por la infección

La dispersión normal de las partículas virales, como se indicó previamente en la Introducción (Figuras 1.7 y 1.8) depende de la fuerza relativa de los tejidos como

fuelle o destino netos de fotoasimilados. La elección de la hoja número 3 para la inoculación en el estadio 1.08 de desarrollo de la planta [215] se basó en que en ese momento la hoja elegida había llegado prácticamente a su tamaño final, y por ende, en días subsiguientes se transforma en exportadora neta de fotoasimilados hacia tejidos sistémicos. Al no haberse producido aún la transición al estadio reproductivo en las condiciones del ensayo, los destinos de esas partículas virales son las raíces y las hojas sistémicas más jóvenes. En particular, y debido a la estructura típica del floema, las hojas jóvenes que formen un ángulo pequeño respecto de la inoculada (Figura 1.7) serán destinos aéreos preferenciales. La iniciación de órganos laterales sucesivos a los flancos de meristema apical del tallo (SAM) se origina a partir de patrones predecibles, originando lo que se denomina “filotaxis”. La amplia mayoría de plantas, *Arabidopsis* entre ellas, forma hojas sucesivas siguiendo un ángulo aproximado de 137.5°, lo cual corresponde a números sucesivos de la serie de Fibonacci (3+5, 5+8, 8+13 etc.) [364]. Bajo condiciones estandarizadas de crecimiento de *Arabidopsis* Col0 en día largo, como las utilizadas aquí en base al trabajo de referencia de Boyes et al. [215] (ver sección de Materiales y Métodos), la planta alcanza como máximo a generar unas 15 hojas de roseta a lo largo de su desarrollo. Por lo tanto, se predice que la hoja sistémica por encima de la número 3 que forme el ángulo más pequeño con la misma, será la hoja número 11 (ver Tabla 4.1).

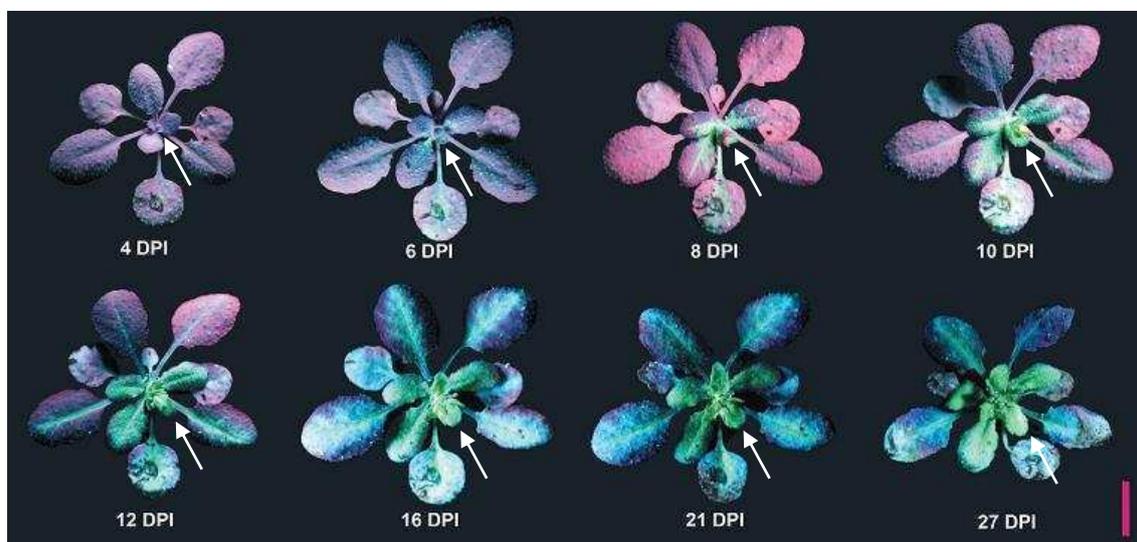
**Tabla 4.1.** Posición predicha de las hojas sistémicas de *Arabidopsis* respecto de la #3 (inoculada) según la serie de Fibonacci.

Hoja #	Ángulo predicho con la hoja #3 (°)	Vueltas completas alrededor de la hoja #3
3	0	0
4	137.5	0.38
5	275	0.76
6	412.5	1.15
7	550	1.53
8	687.5	1.91
9	825	2.29
10	962.5	2.67
<b>11</b>	<b>1100</b>	<b>3.06</b>
12	1237.5	3.44
13	1375	3.82
14	1512.5	4.20
15	1650	4.58

La Tabla 4.1 muestra que las hojas número 6, 8 y 11 son las hojas sistémicas que forman un ángulo más pequeño con la 3, especialmente la 11, cuya desviación respecto de un número entero de vueltas es mínima (fila resaltada). Como además al momento de la inoculación la hoja 11 no había surgido aún, se consideró que en días posteriores su fuerza como sumidero de fotoasimilados y partículas virales provenientes de la hoja número 3 sería la máxima entre las hojas de roseta.

Para corroborar estas hipótesis e identificar experimentalmente las hojas más velozmente invadidas por los virus, se empleó un virus TuMV quimérico portando la proteína verde fluorescente (TuMV-GFP, ingenierizado basado en armazón de UK1) [358, 365] y así seguir visualmente la infección en detalle. La Figura 4.3 muestra la

progresión espaciotemporal de la infección con TuMV-GFP de una sola planta seguida por iluminación ultravioleta al infectar *Arabidopsis* en las mismas condiciones usadas en el resto de este Capítulo para UK1 y JPN1. Como puede observarse, a 4 dpi no se observa fluorescencia en tejidos sistémicos, aunque sí en la hoja inoculada, indicando movimiento local célula-célula de los virus. A 6 dpi las partículas virales han alcanzado las hojas 8, 9, 10 y 11. A 8 dpi sólo la hoja 11 está completamente fluorescente y su desarrollo es el más comprometido, con torsión ya evidente, indicando que esta hoja es un destino primario de las partículas provenientes de la hoja inoculada, ubicada inmediatamente por debajo. Las hojas más viejas tardan mucho más en ser invadidas, y entre ellas, la primera es la número 6, cuya nervadura muestra la vía de entrada de TuMV-GFP a 10 dpi. Este patrón espaciotemporal de dispersión confirma las predicciones previas tanto bibliográficas como esperadas en base a la Tabla 4.1 y ratifican a la hoja 11 como el destino más fuerte de los virus y por ende, la que recibe el mayor impacto sistémico en el sistema utilizado.



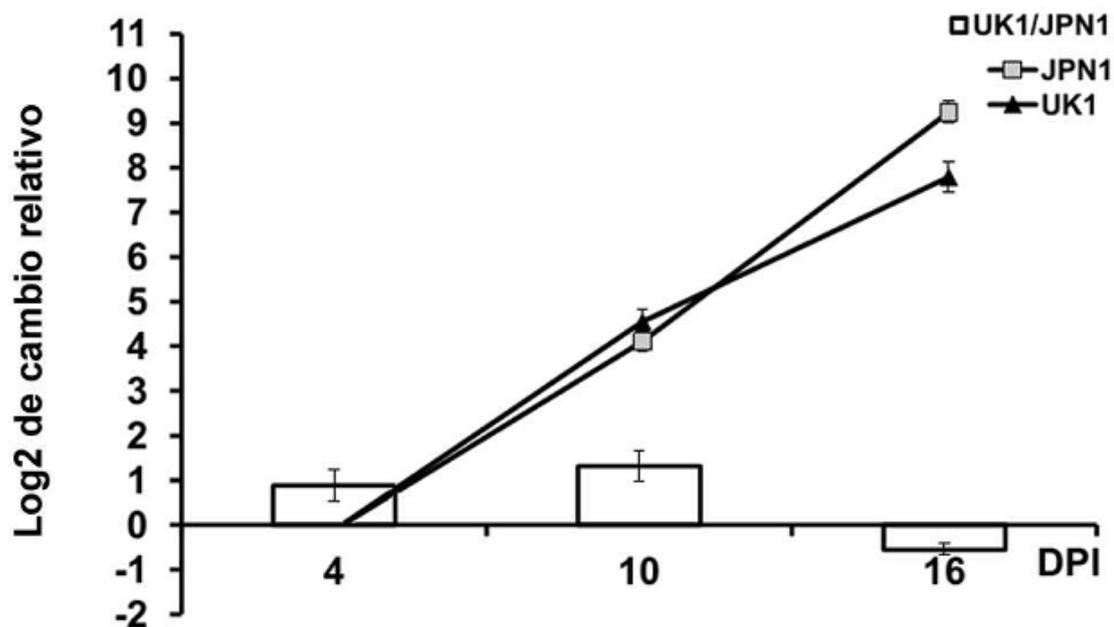
**Figura 4.3.** Dispersión de TuMV-GFP en *Arabidopsis* a varios dpi. Aspecto de una planta representativa de *Arabidopsis* bajo iluminación UV después de inocularla con TuMV-GFP. La flecha blanca indica la posición de la hoja 11. La tercer hoja, inoculada, está teñida con un punto negro. La barra es la escala = 1 cm.

#### 4.4 – JPN1 y UK1 se acumulan sistémicamente a niveles similares en *Arabidopsis*

Las observaciones de desarrollo de síntomas diferenciales, junto con indicios de velocidades de senescencia distintas (Figuras 4.1 y 4.2), podrían en principio deberse a una mayor agresividad de la cepa UK1 causada por un nivel de acumulación viral mayor, como ha sido reportado recientemente en un estudio comparando dos cepas de PVY en papa [366]. Por otro lado, la observación de la hoja 11 como destino preferencial de TuMV-GFP, corroboró conocimientos previos acerca de la dispersión natural de los fitovirus y señaló que esta hoja sería la más indicada para medir acumulación viral, debido a que es velozmente invadida en su totalidad por los virus. De este modo, se hipotetizó que sería una muestra más homogénea y reproducible,

sobre todo a estadios tempranos de la infección cuando el resto de las hojas no están aún infectadas totalmente.

Por consiguiente, la acumulación de RNA viral fue medida en plantas infectadas con las cepas JPN1 o UK1 en las hojas 11 solamente. Se usó un ensayo de qPCR que utilizó cebadores con homología exacta para un sector conservado de la helicasa de ambas cepas. Los resultados se observan en la Figura 4.4. La acumulación de RNA viral fue muy similar entre cepas. UK1 se acumuló a niveles ligeramente superiores a 4 y 10 dpi, mientras que JPN1 hizo lo propio a 16 dpi (barras blancas).

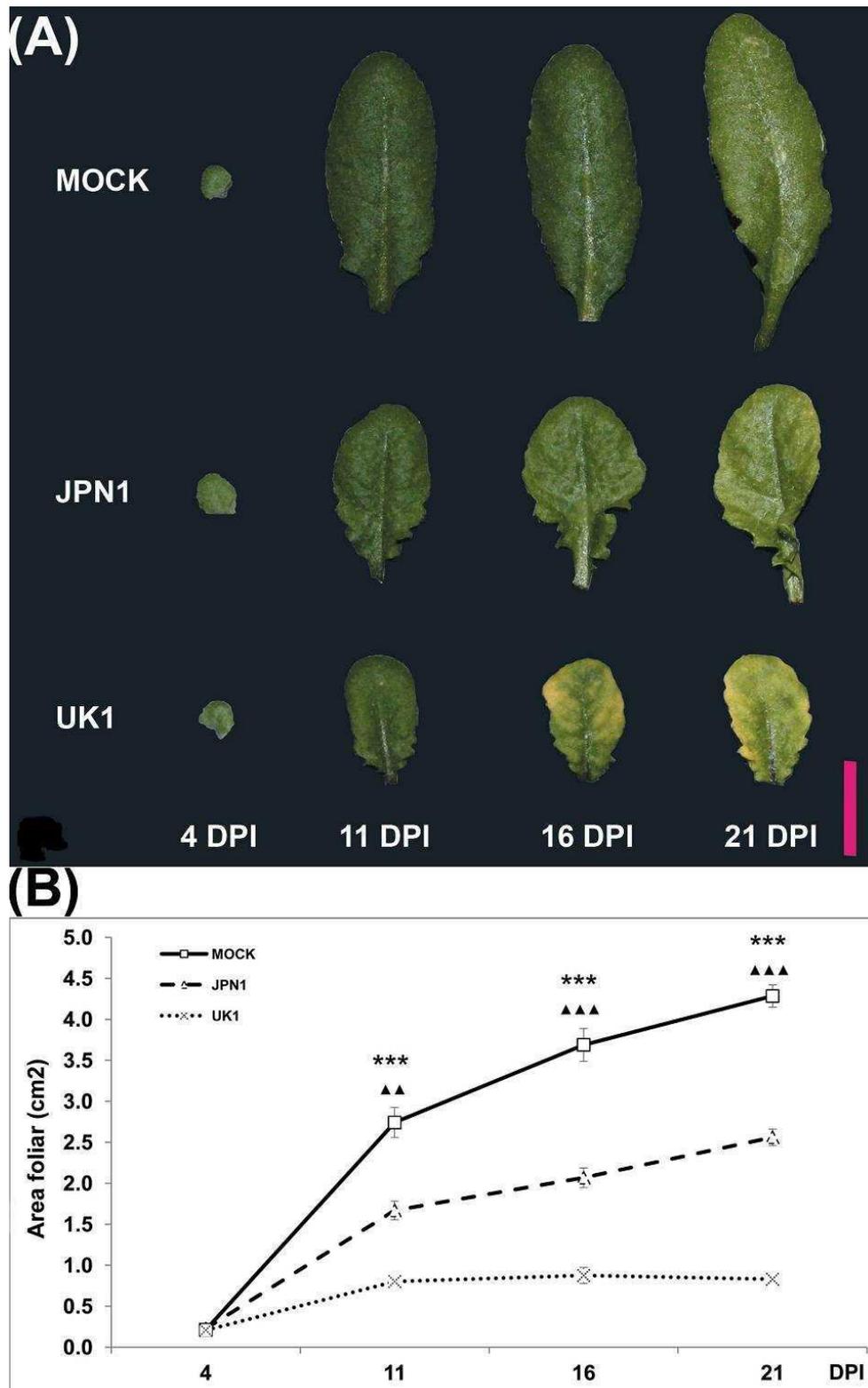


**Figura 4.4.** Carga viral relativa de plantas inoculadas con JPN1 o UK1 a tres dpi diferentes. Resultados obtenidos usando un ensayo de qPCR específico para detectar TuMV. Las comparaciones fueron realizadas entre cepas (barras blancas) o intra-cepas por separado (líneas negras). En este último caso, para ambas cepas el punto de 4 dpi fue establecido como 0 (en escala  $\log_2$ ) para permitir las comparaciones a posteriores dpi. Las barras de error indican SE.

#### 4.5 – UK1, pero no JPN1, induce la acumulación de ROS en tejidos sistémicos infectados

Los experimentos indicaron que UK1 induciría un estado oxidativo alterado (Figura 4.2D-F) y los análisis señalaron a la hoja 11 como la más temprana y homogéneamente afectada por TuMV (Figura 4.3), donde ambas cepas se acumulan por igual a lo largo del proceso infeccioso (Figura 4.4). Para profundizar la comprensión de las diferencias entre cepas se analizaron además parámetros morfológicos, bioquímicos y moleculares en la hoja 11.

La Figura 4.5A muestra el fenotipo de la hoja 11 de 4 a 21 dpi ante los tratamientos con las cepas mencionadas.



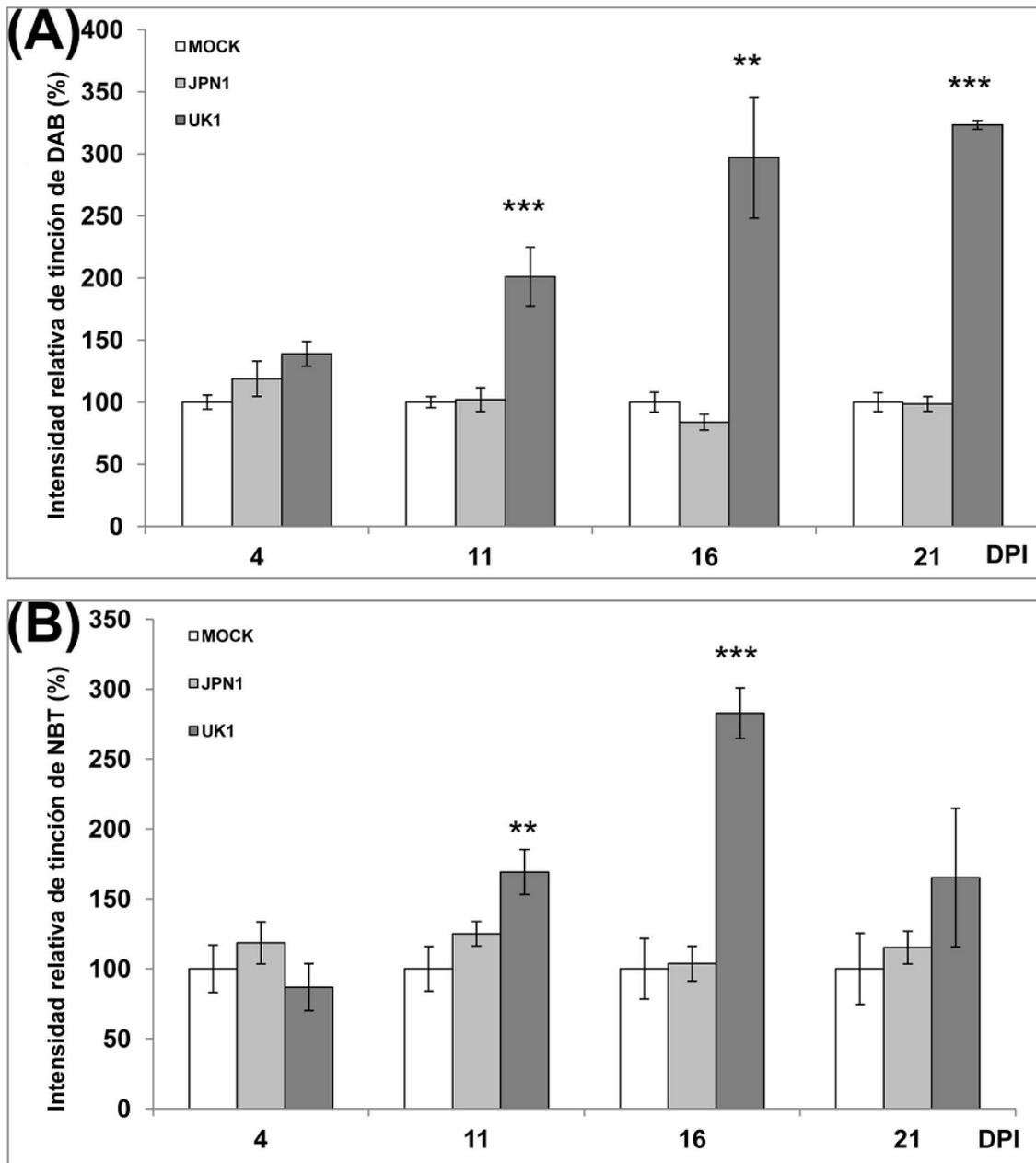
**Figura 4.5.** (A) Registro fotográfico y (B) cuantificación del aumento del área foliar de hojas 11 de plantas Col0 muestreadas desde 4 a 21 dpi, inoculadas con buffer sólo (mock), o cepas JPN1 o UK1 de TuMV.  $20 \leq n \leq 34$  hojas por tratamiento y dpi. Los asteriscos y triángulos pequeños indican diferencias significativas entre muestras mock/UK1 y mock/JPN1, respectivamente. Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con la prueba a posteriori de Dunn. Las barras de error indican SE. La barra es la escala = 1 cm.

Como se esperaba, UK1 aceleró los síntomas de senescencia, como puede notarse por el precoz amarilleamiento inducido en las hojas, replicando la respuesta observada en la hoja 5. Sin embargo, a diferencia de la hoja 5, las infecciones virales limitaron el crecimiento máximo de la hoja 11 (Figura 4.5B). Más aún, en plantas infectadas con JPN1 la hoja 11 continuó su crecimiento hasta 21 dpi, mientras que la infección con UK1 produjo una detención en el crecimiento después de 11 dpi (Figura 4.5B y Tabla 4.2). Estos resultados están en línea con los previamente observados por el grupo de los Dres. F. Ponz y F. Sánchez (resultados sin publicar). Como la hoja 11 no había emergido aún al momento de la inoculación, estos resultados confirman que el impacto de las infecciones virales en su desarrollo debe ser muy importante, como sumidero preferencial de la hoja inoculada. A partir de este experimento, se utilizó esta hoja para medir los cambios moleculares inducidos por los virus.

**Tabla 4.2.** Análisis estadísticos intra-tratamientos del crecimiento de hojas número 11 de plantas Col0 desde 4 a 21 dpi. Se escanearon las hojas 11 usadas para los experimentos de tinción de DAB y NBT y se calculó el área de cada hoja usando el programa ImageJ.  $20 \leq n \leq 34$  hojas por tratamiento y dpi. ns = diferencias no significativas estadísticamente entre los dpi comparados dentro de un dado tratamiento. Ver la sección de Materiales y Métodos para más detalles.

Comparación	MOCK	JPN1	UK1
4 DPI vs 11 DPI	***	***	***
4 DPI vs 16 DPI	***	***	***
4 DPI vs 21 DPI	***	***	***
11 DPI vs 16 DPI	ns	ns	ns
11 DPI vs 21 DPI	***	***	<b>ns</b>
16 DPI vs 21 DPI	ns	ns	ns

El incremento en antioxidantes puede ser atribuido a una sobreacumulación de ROS, incluyendo superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), los cuales son comunes en respuestas a estreses bióticos que pueden alterar el estado oxidativo celular [94]. Para determinar la acumulación relativa de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\bullet-}$ , se utilizaron las técnicas de tinción de DAB y NBT, respectivamente. La Figura 4.6A muestra que UK1 induce una sobreacumulación estadísticamente significativa de  $H_2O_2$  de 11 a 21 dpi; sorprendentemente, las muestras infectadas con JPN1 no sobreacumulan este metabolito en ningún momento. La tinción con NBT (Figura 4.6B) indica que  $O_2^{\bullet-}$  también se sobreacumula sólo ante la infección con UK1.

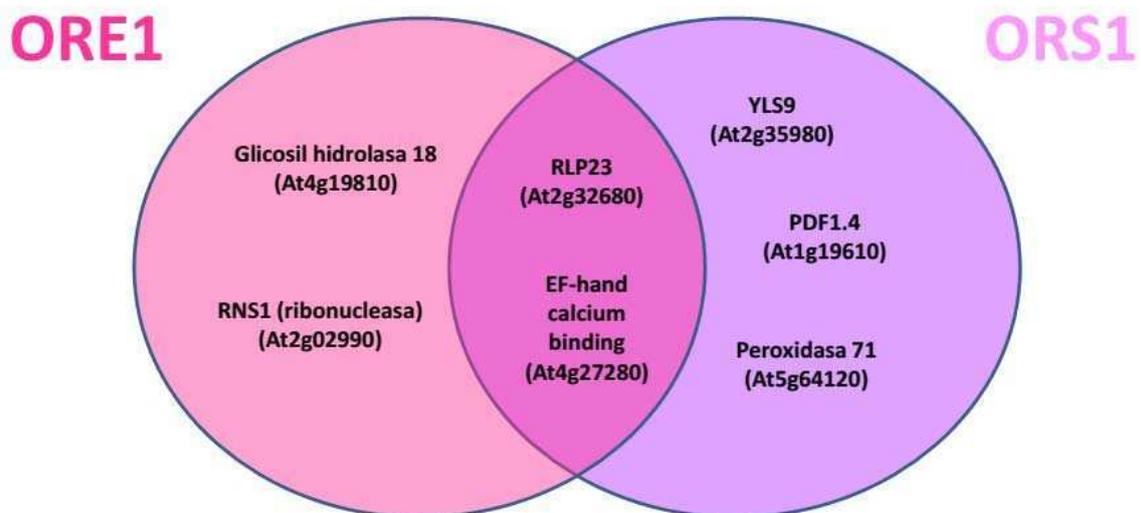


**Figura 4.6.** Sobreacumulación de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\bullet-}$  en hojas sistémicas de Col0 infectadas con UK1. (A) Cuantificación relativa de  $H_2O_2$  mediante la tinción por DAB de hojas 11. Los valores individuales de intensidad fueron normalizados al promedio obtenido para los controles mock-inoculados a cada dpi analizado. Se calcularon los valores promedio obtenidos para los controles (mock, barras blancas) y cada cepa (JPN1, barras grises claro; UK1, barras gris oscuro). (B) Igual que en (A), pero para cuantificación de  $O_2^{\bullet-}$  mediante tinción de NBT.  $3 \leq n \leq 11$  hojas por tratamiento y dpi. Se utilizó ANOVA de una vía con la prueba a posteriori de Tukey. Las barras de error indican SE.

#### 4.6 – JPN1 y UK1 regulan diferencialmente genes clave en procesos de senescencia, estrés oxidativo y respuestas hormonales

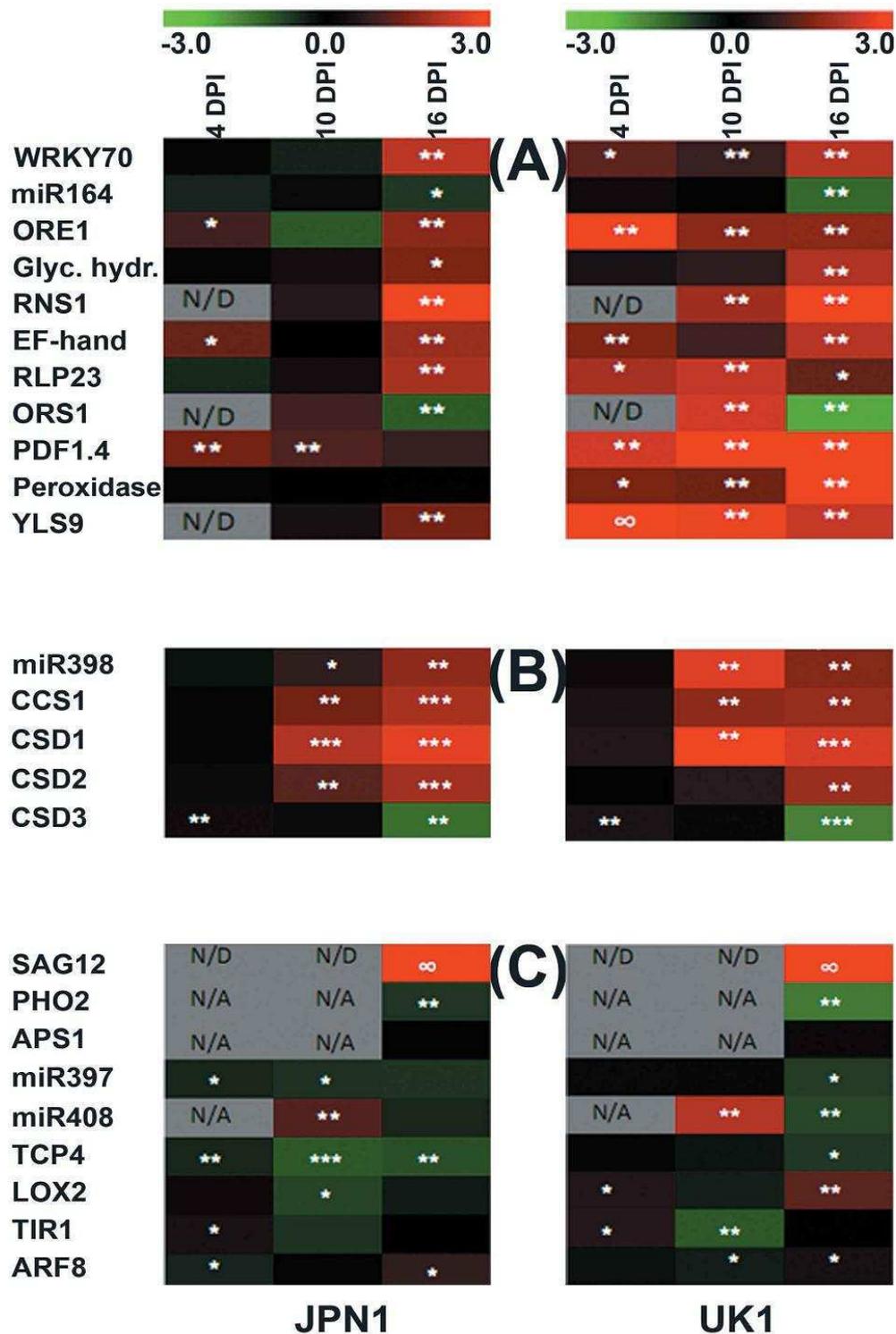
Las hojas 11 se utilizaron para extracción de RNA y la posterior evaluación de la acumulación de transcritos de genes clave en procesos de senescencia, estrés oxidativo y respuestas hormonales a 4, 10 y 16 dpi. En este sentido, los genes NAC

reguladores de la senescencia ORE1 y ORS1, resultaron de particular interés, debido a que responden a ROS y son importantes en procesos de senescencia, como se mencionó anteriormente. Mediante una búsqueda bibliográfica, se compararon las redes de senescencia controladas por estos genes [263, 280], y se seleccionaron algunos de sus integrantes en base a su respuesta a ROS, inducción conocida ante patógenos y/u otro tipo de estrés, respuesta a déficits de nutrientes, naturaleza reportada de SAG, motivos predichos de unión a ORE1/ORS1 en sus promotores etc. Además, se tuvo en cuenta la fuerza de la dependencia de ORE1/ORS1 reportada, con el objetivo de facilitar la detección de cambios. Los genes de regulones de ORE1/ORS1 finalmente seleccionados se muestran en la Figura 4.7.



**Figura 4.7.** Diagrama de Venn mostrando los genes pertenecientes a los regulones de ORE1 y ORS1 seleccionados para su análisis por qRT-PCR ante infecciones virales y tratamientos con hormonas. Se indican los genes seleccionados reportados como bajo control uno de los dos parálogos, o ambos (intersección).

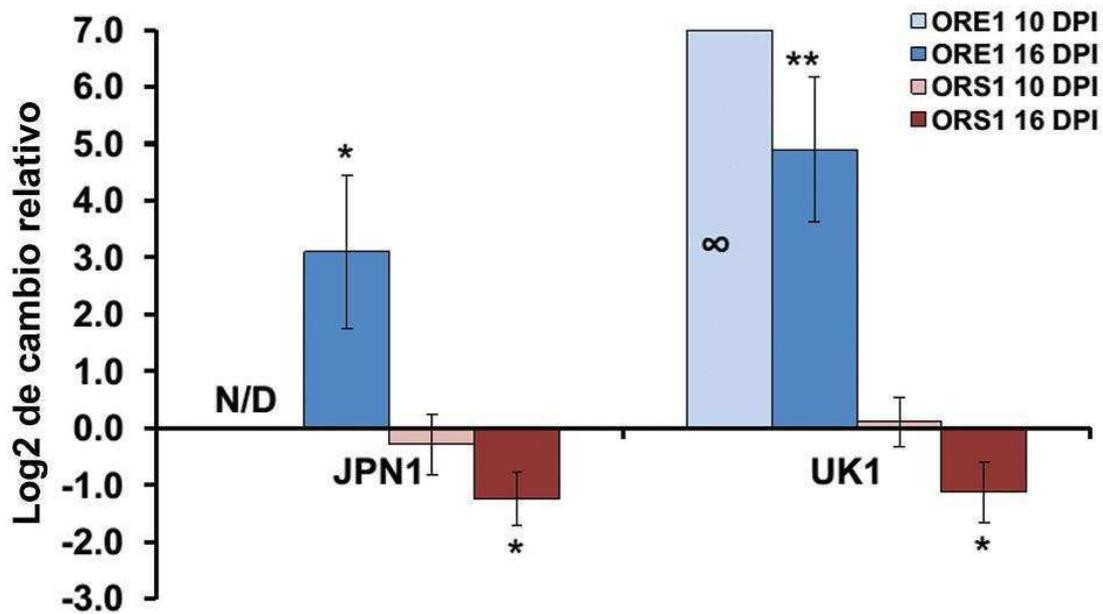
Otros genes fueron seleccionados para el análisis transcriptómico en base a su respuesta a estímulos bióticos o abióticos de relevancia, su naturaleza de SAGs, su relevancia en la respuesta a hormonas, etc. El Apéndice G muestra la lista completa con los datos de acumulación relativa de transcritos selectos ante infecciones virales a los tres dpi analizados que se utilizaron para confeccionar la Figura 4.8.



**Figura 4.8.** Análisis por qRT-PCR de genes seleccionados ante infecciones con las cepas JPN1 y UK1 de TuMV. Los *Heatmaps* muestran los resultados de las qRT-PCRs de (A) SAGs, (B) el sistema de barrido de  $O_2^{\cdot -}$  de las superóxido dismutasas de cobre y zinc y (C) otros genes de relevancia relacionados con respuesta ante estreses de nutrientes, vías hormonales y senescencia. Las comparaciones fueron realizadas entre muestras control (mock) y JPN1 o UK1, según se indica. Los valores están dados en  $\log_2$  del cociente de las veces de cambio, en una escala de falso color doble, como se indica en la parte de arriba de la Figura. N/D = no detectado.  $\infty$  = Detectado sólo en muestras infectadas. \* =  $0.01 \leq p \leq 0.05$ ; \*\* =  $0.001 \leq p \leq 0.01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0.001$ . Para más detalles ver Apéndices E y G.

La Figura 4.8A resume los resultados de los ensayos realizados sobre estos genes. Pocos de los transcritos cuantificados mostraron cambios (relativos a plantas control) en plantas infectadas con JPN1 hasta los 16 dpi, cuando la senescencia es un proceso ya en plena marcha. En contraste, y de manera muy llamativa, UK1 provocó la marcada sobreacumulación de varios transcritos ya a 4 dpi, una etapa de la infección en la cual aún no son detectables síntomas de alteración del desarrollo ni sobreacumulación de ROS en la hoja 11 (Figuras 4.5 y 4.6). Este patrón de alteración diferencial se repitió mayormente a 10 dpi. A 16 dpi ambas cepas indujeron la sobreacumulación de la mayoría de los SAGs analizados, incluyendo ORE1, pero las alteraciones fueron de mayor magnitud en plantas infectadas con UK1. Sin embargo, es importante destacar que las diferencias en los patrones de sobreacumulación entre JPN1 y UK1 no son sólo cuantitativas, sino que poseen también un componente de naturaleza cualitativa. El perfil de expresión de Peroxidasa 71, (At5g64120), una peroxidasa de pared celular que produce ROS [367] fue particularmente interesante. Las peroxidasas de pared celular están implicadas en la producción de ROS durante la defensa de la planta [97]. Además, la producción de ROS es un indicativo clásico de reconocimiento del patógeno por parte del huésped y la activación de defensas, una respuesta que es típicamente apoplástica [98]. A pesar de su inducción fuerte y sostenida disparada por UK1 entre 4 y 16 dpi, JPN1 no alteró la acumulación de Peroxidasa 71 en ningún momento. Sin embargo, la cepa JPN1 estaría siendo efectivamente reconocida por la planta, como lo indica la temprana activación, a 4 dpi, de PDF1.4, un gen de defensa inducido por infecciones virales [243].

Sorprendentemente, ORS1, el SAG parálogo de ORE1, fue subregulado a 16 dpi en las muestras infectadas con ambas cepas. Se decidió entonces realizar otro experimento, inoculando otra *Brassicaceae* susceptible a estos virus para verificar este perfil de expresión inesperado entre parálogos con secuencias promotoras conservadas y probar el grado de conservación de esta respuesta. Se trataron plantas de *Brassica juncea* de manera análoga a lo realizado para *Arabidopsis*, y se analizó el tejido sistémico. Como puede verse en la Figura 4.9, los patrones de acumulación de ambos transcritos analizados resultaron similares a los detectados en el caso de *Arabidopsis*: el mRNA de ORE1 se sobreacumuló más temprano en plantas inoculadas con UK1 (lo cual indicaría la mayor agresividad de esta cepa también al infectar a *B. juncea*), mientras que ORS1 fue subregulado por ambas cepas a 16 dpi.



**Figura 4.9.** Análisis por qRT-PCR de los transcritos de ORE1 y ORS1 de *B. juncea* ante infecciones con las cepas JPN1 y UK1 de TuMV. Las comparaciones fueron realizadas entre muestras control (mock) y JPN1 o UK1, según se indica. N/D = no detectado. ∞ = Detectado sólo en muestras infectadas. Experimento realizado por otros integrantes del grupo.

Volviendo a *Arabidopsis*, la sobreacumulación de  $O_2^{\bullet-}$  observada en plantas infectadas por UK1 puede deberse a una desregulación de los mecanismos de detoxificación de la célula. Las superóxido dismutasas de cobre y zinc (CSDs) son de importancia capital en el sistema enzimático de defensa ante ROS, ya que dismutan el peligroso radical aniónico  $O_2^{\bullet-}$ , produciendo  $H_2O_2$  (mucho menos reactivo) y  $O_2$ . El miR398 regula postranscripcionalmente a la CSD1 (citoplásmica), la CSD2 (cloroplásmica) y a la chaperona de ambas, CCS1 [223-225], pero no a la CSD3, de peroxisoma, la cual es además, independiente de CCS1 [226] (ver esquema explicativo en Figura 1.30). La Figura 4.8B muestra el impacto de las infecciones virales en la acumulación relativa de los transcritos de estos cinco genes. Interesantemente, a 10 dpi el nivel de mRNA de CSD2 no está cambiado relativo a controles en plantas infectadas con UK1; en contraste, JPN1 induce su sobreacumulación en más de dos veces. Más aún, su regulador negativo, miR398, está casi 6 veces sobreacumulado ante infecciones por UK1 pero sólo 1.6 veces por JPN1 (Figura 4.8B y Apéndice G).

Otras consecuencias bien conocidas de las infecciones virales son el desbalance hormonal y el estrés por déficit de nutrientes. Los mRNAs de APS1 y PHO2 se subregulan ante déficits de sulfato y fósforo, respectivamente [198, 368]. Por otro lado, el cobre es un micronutriente esencial en la protección de la planta ante el estrés oxidativo [369], entre otros roles biológicos de importancia, y su escasez induce la acumulación de miR397 y miR408 [228]. La Figura 4.8C compara la acumulación relativa de estos transcritos ante las infecciones con cada cepa, mostrando niveles notablemente más bajos de mRNA de PHO2 en plantas infectadas, subacumulación que es más marcada en el caso de infecciones con UK1.

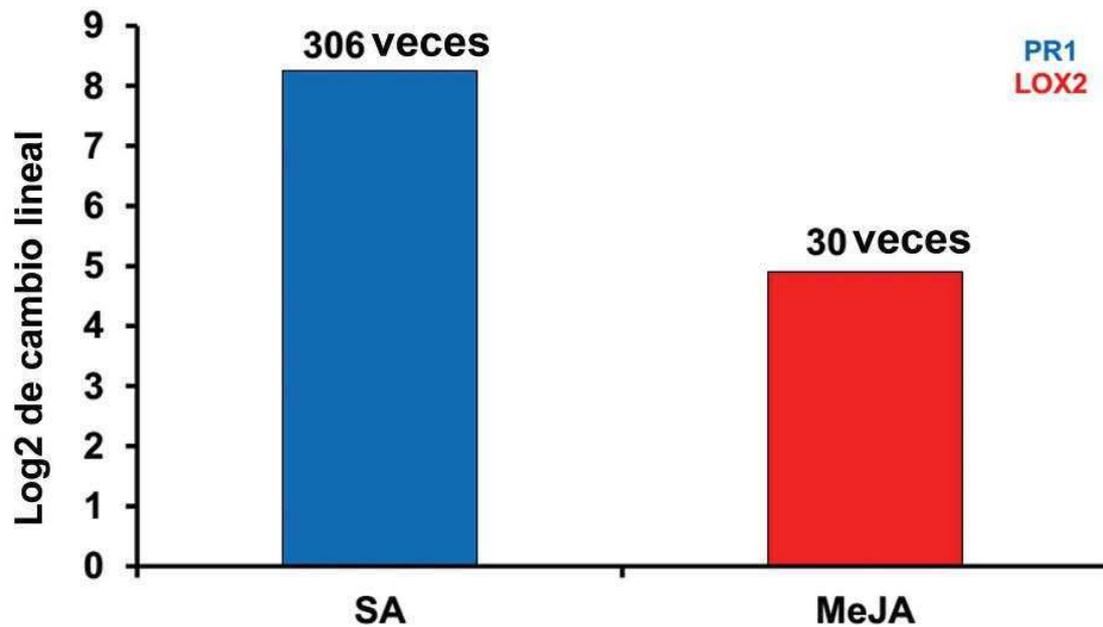
Se ha reportado asimismo que varias redes hormonales de relevancia, incluyendo auxinas, ácido abscísico y ácido jasmónico (JA), son desreguladas o

moduladas ante el ataque por patógenos [370]. Para estudiar genes importantes involucrados en las vías de señalización por auxinas, se analizaron los niveles de expresión de los transcritos de ARF8 y TIR1 (Figura 4.8C). A pesar de que la sensibilidad de la técnica permitió hallar diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, no emergió un patrón claro de cambios a partir de estas comparaciones.

El factor de transcripción TCP4 regula directamente a LOX2 (entre otros), una enzima cloroplástica responsable del primer paso en la biosíntesis del JA [207]. TCP4 fue consistentemente subregulado en las muestras infectadas con JPN1 a través de la infección. Sin embargo, sólo se pudieron observar ligeros cambios en las muestras infectadas con UK1. LOX2 mostró un perfil de represión en la acumulación algo similar a TCP4, en plantas tratadas con JPN1. Sin embargo, en plantas tratadas con UK1, LOX2 resultó sobreacumulado a 16 dpi, en contraste con los resultados observados para TCP4, que sólo a 16 dpi se subacumuló ante UK1. Como la señalización mediada por JA es vista clásicamente como antagónica a la mediada por SA, y esta última es de reconocida importancia en la defensa antiviral en plantas, estos resultados sugirieron la relevancia de investigar directamente el efecto de estas hormonas sobre las redes génicas bajo el control de ORE1/ORS1 presentadas en la Figura 4.7.

#### **4.7 – Estudio del efecto del SA y JA en las redes de senescencia reguladas por ORE1 y ORS1**

Los resultados expuestos en la Figura 4.8A evidenciaron que UK1 indujo la sobreacumulación de varios SAGs ya a 4 dpi, muy poco después de la emergencia de la hoja 11, cuando está comenzando su crecimiento (Figura 4.5). A su vez, se sabe que SA y JA cumplen una función importante tanto en la modulación de la senescencia como en el montaje de la defensa [247, 256]. Además, en el Capítulo 3 de esta Tesis se había visto que metabolitos precursores de SA y MeJA se hallaban incrementados en tejidos sistémicos de plantas de tabaco infectadas antes de la llegada de los virus [320]. De este modo, resultó de interés investigar el perfil de expresión de los SAGs analizados en la Figura 4.8A ante el tratamiento con estas hormonas, que pudieran revelar su dependencia respecto a ellas. En primer lugar, se realizó una búsqueda bibliográfica que permitiera estimar las concentraciones de hormonas a utilizar adecuadas para observar un efecto sobre genes dependientes de estas hormonas y los mecanismos de defensa que controlan [371-372]. De esta manera, se determinó usar tanto para MeJA como para SA una solución 500  $\mu$ M en agua, a pH = 7. Se evaluó la eficacia de los tratamientos con ambas hormonas analizando la acumulación relativa de mRNA de LOX2 y PR1, los cuales son inducidos por MeJA y SA, respectivamente, en muestras de plantas tratadas (ver sección de Materiales y Métodos para más detalles). Los resultados se muestran en la Figura 4.10.



**Figura 4.10.** Ensayo de qPCR para verificar la eficacia de los tratamientos con hormonas. Se roció un aerosol foliar sobre plantas de *A. thaliana* con agua pH=7 (control) o con una solución de SA o MeJA y 4 h después se tomaron muestras. Se ensayaron los mRNAs de PR1 (inducible por SA [373]) y LOX2 (inducible por MeJA [374]). Las comparaciones se hicieron entre plantas control y cada uno de los tratamientos, como se indica. Los resultados se muestran en escala  $\log_2$ ; el cambio promedio de expresión lineal se indica por encima de las barras. Ver sección de Materiales y Métodos y Apéndice E para más detalles.

Una vez comprobada la eficacia de los tratamientos, se procedió a analizar el perfil de acumulación diferencial de los SAGs estudiados en la Figura 4.8A en plantas tratadas con SA o MeJA, en comparación con plantas rociadas con agua solamente (control). Los resultados de estos análisis por qPCR se muestran en la Figura 4.11. El Apéndice H muestra la lista completa con los datos de acumulación relativa de transcritos selectos ante tratamientos con hormonas que se utilizaron para confeccionar dicha figura.

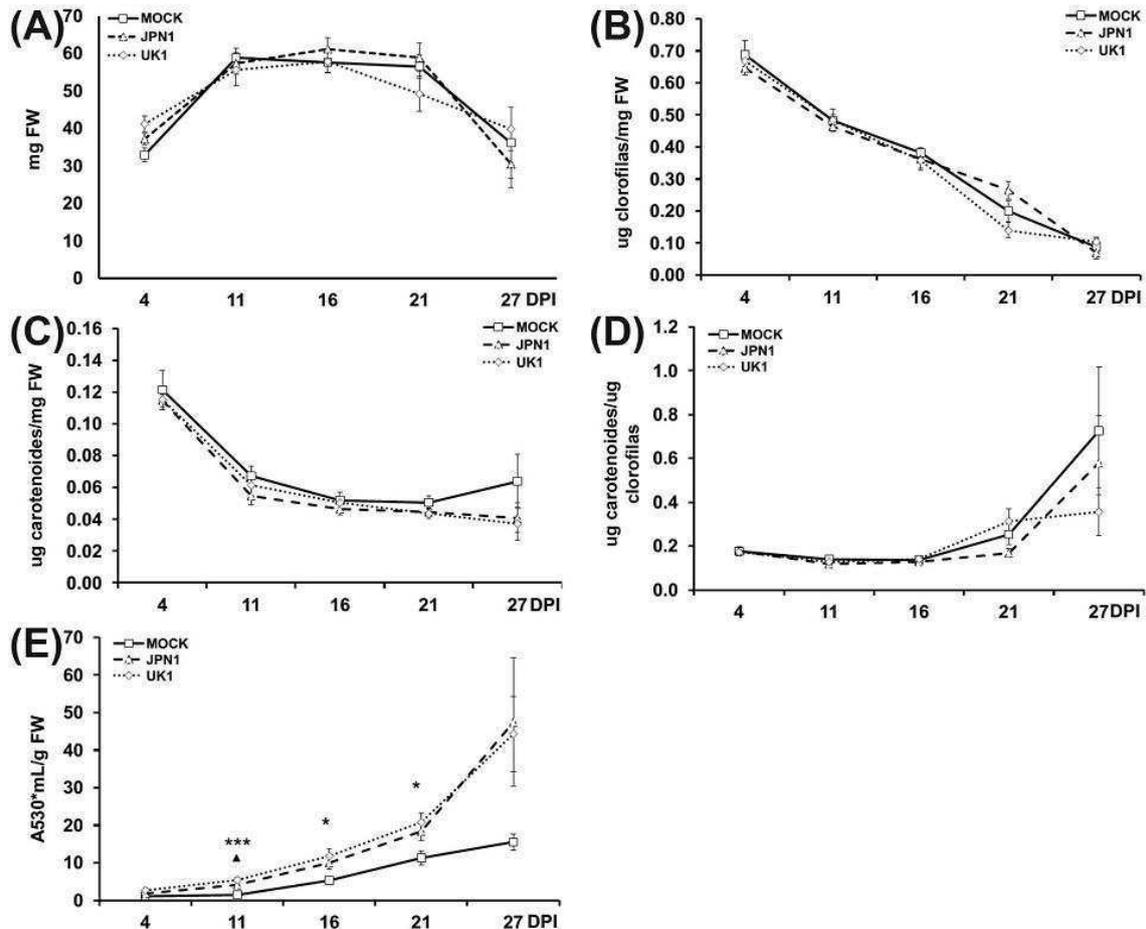


**Figura 4.11.** Análisis por qRT-PCR de la expresión de genes seleccionados ante aplicación de SA o MeJA. (A) *Heatmaps* mostrando los resultados de las qRT-PCRs de SAGs y otros genes relevantes para este estudio luego de 4 horas de los tratamientos con hormonas. Los valores están dados en  $\log_2$  del cociente de las veces de cambio, en una escala de falso color doble, como se indica en la parte de arriba de la Figura. (B) Se analizó la acumulación de ORE1 y ORS1 24 horas post-aplicación de los tratamientos. Las comparaciones fueron realizadas entre muestras control (mock) y SA o MeJA, según se indica. Las barras de error indican SE. \*\* =  $0.001 \leq p \leq 0.01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0.001$ . Para más detalles ver Apéndices E y H.

De acuerdo con reportes previos [283], WRKY70 evidenció una fuerte inducción por SA; también fue inducido por MeJA, aunque en un grado mucho menor. Ninguna de las dos hormonas alteró la acumulación del miR164 maduro. La mayoría de los genes analizados pertenecientes a los regulones de ORE1/ORS1 se sobreacumularon por el tratamiento con SA, incluyendo al mismo ORE1. Por el contrario, tres de los genes fueron subregulados por MeJA, y esta hormona no indujo la acumulación de ningún gen de estos regulones analizados (Figura 4.11A). Al contrario que ORE1, sin embargo, ORS1 no sufrió cambios ante el tratamiento con SA a 4 horas. ORS1 podría tener un tiempo de inducción más tardío, sobre todo si su respuesta al SA fuera indirecta, mediando la transcripción y traducción de otros mensajeros previos. Esta explicación es plausible, ya que ha sido reportado previamente que estos parálogos responden de manera temporalmente distinta ante un mismo estímulo, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [263]. De modo que, para evaluar esta posibilidad, ambos SAGs fueron cuantificados a 24 horas postinducción con ambas hormonas. ORE1 evidenció una sobreacumulación sostenida después de la aplicación de SA, pero ORS1 permaneció inalterado (Figura 4.11B). MeJA provocó un efecto tardío sobre ORE1, acentuando la tendencia hacia la subregulación que se muestra incipiente a 4 HPI. ORS1 no fue afectado tampoco por MeJA ni a 4 ni a 24 HPI.

#### **4.8 – Las diferencias en progresión de la senescencia y acumulación de ROS entre cepas se pierden en mutantes NahG de Arabidopsis**

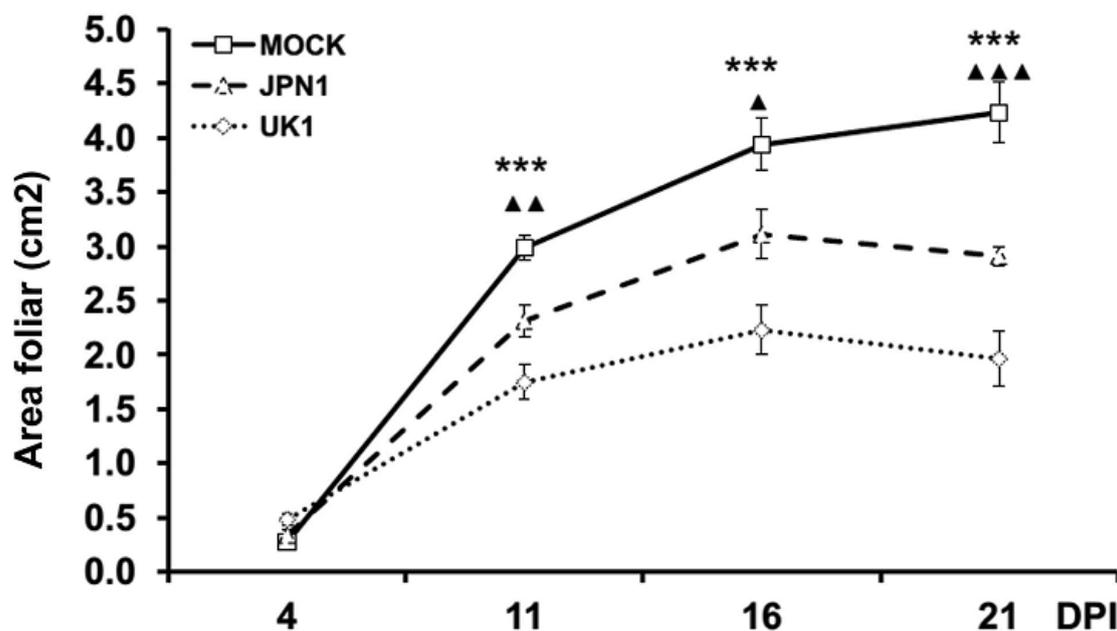
Varios transcritos pertenecientes a la categoría de SAGs (algunos de ellos codificantes para enzimas generadoras de ROS) se sobreacumulan tempranamente en plantas infectadas con UK1, pero no con JPN1 (Figura 4.8A). Además, la mayoría de ellos resultaron responder positivamente ante la aplicación de SA (Figura 4.11). Por lo tanto, se hipotetizó que los distintos fenotipos de senescencia asociados a ambas cepas de TuMV podrían estar respondiendo a diferentes respuestas a SA subyacentes. Para investigar sobre esta posibilidad, se utilizaron plantas de Arabidopsis transgénicas NahG, las cuales tienen disminuida en gran medida la capacidad de acumular SA, y se repitieron las mediciones de parámetros bioquímicos marcadores de senescencia y de acumulación de ROS durante las infecciones virales con las cepas JPN1 y UK1. La Figura 4.12 muestra los resultados para los parámetros de senescencia analizados.



**Figura 4.12.** Progresión comparada de la senescencia de hojas 5 de plantas NahG infectadas con TuMV. (A) Medidas de peso fresco de las hojas 5 muestreadas a lo largo del experimento.  $10 \leq n \leq 23$  hojas por tratamiento y dpi. (B–E) Contenidos de clorofilas totales (B), carotenoides (C), cociente carotenoides/clorofilas (D) y antocianinas (E) en las hojas analizadas para los tres tratamientos.  $4 \leq n \leq 9$  hojas por tratamiento y dpi. Los asteriscos y triángulos pequeños indican diferencias significativas entre muestras mock/UK1 y mock/JPN1, respectivamente. Se utilizó ANOVA de una vía con la prueba a posteriori de Tukey. Las barras de error indican SE.

Las plantas NahG presentaron senescencia retrasada respecto a plantas Col0 (Figuras 4.2 y 4.12, controles mock-inoculados), un fenotipo previamente reportado [279]. Llamativamente, casi todas las diferencias en parámetros de senescencia entre plantas controles e infectadas se perdieron (Figura 4.12A–D), con la excepción de la acumulación de antocianinas (Figura 4.12E). Ningún marcador fisiológico de senescencia analizado mostró diferencias significativas entre cepas.

Sin embargo, de manera similar a lo ocurrido ante la infección de Col0, UK1 indujo un fenotipo de detención del crecimiento en plantas NahG, como lo demuestra la tasa de crecimiento de la hoja 11 (Figura 4.13 y Tabla 4.3).



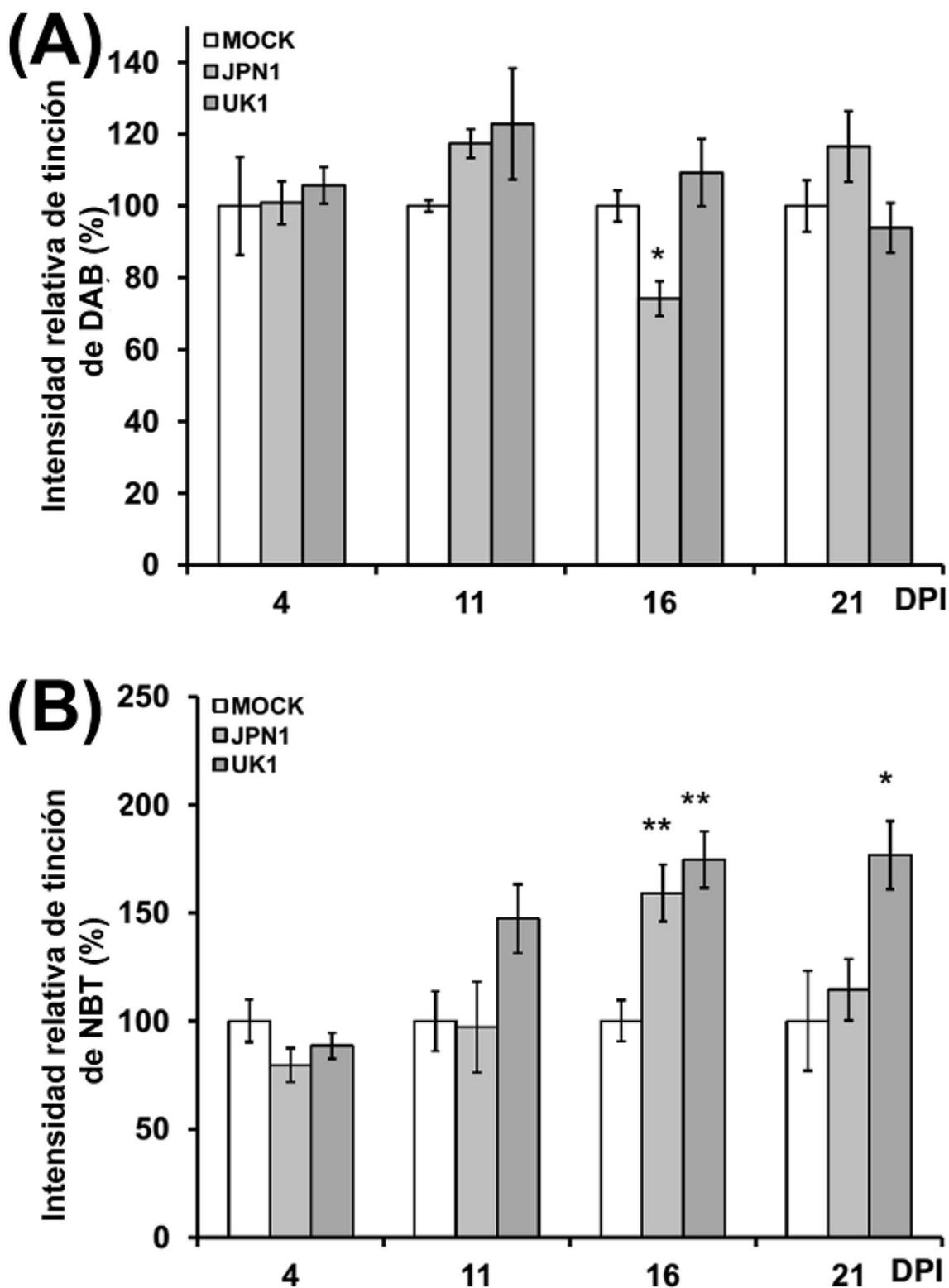
**Figura 4.13.** Aumento del área foliar de hojas 11 de plantas NahG muestreadas desde 4 a 21 dpi, inoculadas con buffer sólo (mock), o cepas JPN1 o UK1 de TuMV.  $12 \leq n \leq 18$  hojas por tratamiento y dpi. Los asteriscos y triángulos pequeños indican diferencias significativas entre muestras mock/UK1 y mock/JPN1, respectivamente. Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con la prueba a posteriori de Dunn. Las barras de error indican SE.

De manera interesante, a diferencia de lo visto para Col0 (Figura 4.5B y Tabla 4.2), en plantas NahG la cepa JPN1 también provocó la detención del crecimiento más allá de 11 dpi en la hoja 11.

**Tabla 4.3.** Análisis estadísticos intratratamientos del crecimiento de hojas número 11 de plantas NahG desde 4 a 21 dpi. Se escanearon las hojas 11 usadas para los experimentos de tinción de DAB y NBT y se calculó el área de cada hoja usando el programa ImageJ.  $12 \leq n \leq 18$  hojas por tratamiento y dpi. ns = diferencias no significativas estadísticamente entre los dpi comparados dentro de un dado tratamiento. Ver la sección de Materiales y Métodos para más detalles.

Comparación	MOCK	JPN1	UK1
4 DPI vs 11 DPI	*	**	***
4 DPI vs 16 DPI	***	***	***
4 DPI vs 21 DPI	***	***	***
11 DPI vs 16 DPI	ns	ns	ns
11 DPI vs 21 DPI	*	ns	ns
16 DPI vs 21 DPI	ns	ns	ns

Se midió la acumulación de ROS en las hojas 11 de las plantas NahG (Figura 4.14). La tinción de DAB mostró que no hubo diferencias en los niveles de acumulación de  $H_2O_2$  entre tratamientos a lo largo del experimento (Figura 4.14A). Sin embargo,  $O_2^{\cdot -}$  se sobreacumuló en plantas NahG infectadas con UK1, y JPN1 indujo un aumento transitorio de esta ROS a 16 dpi, como se muestra a partir de la cuantificación relativa de tinción por NBT (Figura 4.14B).



**Figura 4.14.** La sobreacumulación de ROS inducida por la cepa UK1 es parcialmente abolida en plantas NahG. (A) Cuantificación relativa de  $H_2O_2$  mediante la tinción por DAB de hojas 11. Los valores individuales de intensidad fueron normalizados al promedio obtenido para los controles mock-inoculados a cada dpi analizado. Se calcularon los valores promedio obtenidos para los controles (mock, barras blancas) y cada cepa (JPN1, barras grises claro; UK1, barras gris oscuro). (B) Igual que en (A), pero para cuantificación de  $O_2^{\cdot-}$  mediante tinción de NBT.  $4 \leq n \leq 6$  hojas por tratamiento y dpi. Se utilizó ANOVA de una vía con la prueba a posteriori de Tukey. Las barras de error indican SE.

## Discusión

### **UK1 desencadena la senescencia antes y determina síntomas más severos que JPN1, a pesar de que ambas cepas acumulan similares niveles de RNA viral.**

En este estudio, se usaron dos cepas de TuMV (JPN1 y UK1) para investigar las bases de la inducción de síntomas contrastantes en *A. thaliana*. Esto permitió asociar los fenotipos diferenciales con la acumulación de ROS, respuestas antioxidantes y acumulaciones de SAGs inducidas por ambas cepas. Un reporte previo había comparado ya los efectos transcriptómicos de las infecciones con dos cepas del potyvirus PVY. Este trabajo mostró la regulación diferencial de genes de papa relacionados con la respuesta antioxidante a tiempos tempranos después de la infección [366]. Sin embargo, es importante notar que en ese estudio se utilizaron cepas cuya acumulación difería entre 3 y 5 órdenes de magnitud en el tejido analizado (estando por lo tanto la severidad de los síntomas positivamente correlacionada con la acumulación de RNA viral). Asimismo, el mencionado trabajo analizó solamente las hojas inoculadas. Por el contrario, en nuestro caso, la identificación de la hoja 11 como la más tempranamente afectada por TuMV (Tabla 4.1 y Figura 4.3) permitió la examinación de un tejido más homogéneo (comparar hoja inoculada (#3) con la muestreada (#11) y su proporción de cobertura con GFP en Figura 4.3). Incluso a 10 dpi, todas las hojas que presentan fluorescencia indicativa de presencia de TuMV-GFP muestran un patrón heterogéneo, excepto la hoja 11. Además, la acumulación de RNA viral resultó similar para ambas cepas a lo largo del período de tiempo estudiado (Figura 4.4).

El registro fotográfico mostró claras diferencias en la sintomatología ocasionada por ambas cepas que se acumulan en cantidades comparables (Figura 4.1). Un escenario similar ha sido descrito recientemente para un potexvirus que infecta tomate, *Pepino mosaic virus* [357].

Por otro lado, la elección de la hoja número 5 para analizar parámetros de senescencia y comparar entre tratamientos resultó acertada. Esto es así porque la utilización de una única hoja permite también en este caso minimizar el ruido que aportaría el análisis de diferentes hojas, cada una en un estadio diferente [267]; además, este análisis permitió analizar el desarrollo de la senescencia desde estadios donde la hoja se encuentra plenamente desarrollada pero aún sin síntomas visibles de senescencia, hasta la muerte de las hojas infectadas (Figura 4.2A). A medida que la senescencia avanza en la hoja, el proceso se hace más heterogéneo, tanto dentro de la misma hoja, como entre diferentes réplicas biológicas [267]. Esto ocasiona que las mediciones de concentraciones de pigmentos forosintéticos y flavonoides posean un gran error estándar (SE) a 27 dpi, lo cual en parte dificultó el análisis estadístico a tiempos tan tardíos, para los cuales las medidas indican tendencias generales.

Entre la sintomatología diferencial registrada entre ambas cepas, UK1 aceleró notablemente el amarilleamiento de las hojas de roseta (Figura 4.1). La cepa UK1 aceleró claramente la senescencia no sólo en comparación con plantas control, sino respecto a JPN1 (Figura 4.2). Por otro lado, y de manera muy interesante estos virus no

aceleraron la senescencia en plantas NahG (Figura 4.12). El análisis del contenido de antioxidantes reveló diferencias evidentes entre cepas en plantas Col0 (Figura 4.2B-F). Estos compuestos cambian su acumulación durante el proceso de senescencia natural, pero también juegan roles importantes en la protección oxidativa [267, 274-275].

**La acumulación diferencial de pigmentos fotosintéticos y flavonoides indica diferentes velocidades de senescencia, acumulación de ROS y/o competición por recursos en las plantas infectadas por UK1 y JPN1**

A través del proceso de senescencia normal, disminuye la transcripción de genes vinculados con la biosíntesis de clorofilas y carotenos, así como con la fotosíntesis, la fijación de carbono (RUBISCO) y el RNA ribosomal: por otro lado, aumenta la transcripción de genes relacionados con el catabolismo de macromoléculas como lípidos, RNA y proteínas, además de los implicados en la respuesta a estrés, la biosíntesis de flavonoides y en algunas rutas señaladoras dependientes de hormonas, entre otros [267, 279]. También los genes de las rutas catabólicas de clorofilas y carotenos están inducidos durante la senescencia [267]. En efecto, estos pigmentos fotosintéticos disminuyen su acumulación con el tiempo tanto en plantas Col0 como NahG bajo tratamientos control, validando su reconocido uso como parámetros de senescencia estándar, sobre todo en el caso de las clorofilas. Ante las infecciones virales, UK1 produce un efecto más acentuado en Col0, coincidente con la aceleración de la senescencia observada, pero no en plantas NahG (Figura 4.2C, E y Figura 4.12B-C). Una aparente excepción a esta tendencia la constituye la transitoria sobreacumulación (+77%) entre 11 y 21 dpi de carotenos en plantas Col0 infectadas con UK1 (Figura 4.2E), que determina un mayor cociente de concentraciones  $\mu\text{g}$  carotenoides/ $\mu\text{g}$  clorofilas (Figura 4.2F). Esta tendencia se pierde en plantas NahG, en las cuales la velocidad de disminución de concentración de carotenoides es constante entre tratamientos (Figura 4.12C-D). Dado que los carotenoides son moléculas liposolubles con roles reportados de protección ante estrés oxidativo [362-363], estos datos apuntan a un menor estrés oxidativo producido en plantas NahG por ambas cepas, particularmente para el caso de UK1.

Los genes implicados en la biosíntesis de flavonoides están sobreexpresados durante la senescencia vinculada al desarrollo normal [279]. Una posible explicación reside en que la disminución de concentración de clorofilas y otros pigmentos fotosintéticos en los tejidos foliares durante la senescencia disminuye la protección ante el daño oxidativo de la luz incidente. La inducción de síntesis de antocianinas permitiría bloquear en parte este daño. Se ha demostrado que en tallos de plantas cuya coloración natural es roja debido al alto contenido de antocianinas, la cantidad de clorofila es menor, no así la de carotenos; el alto cociente carotenos:clorofilas resultante, sumado a la elevada acumulación basal de antocianinas podría indicar un mecanismo de protección contra el estrés oxidativo, ocasionado en ese caso, por la disminución de clorofilas con capacidad fotoprotectora [271]. Sin embargo, vías alternativas de biosíntesis de antocianinas se activan ante la inducción de senescencia por ausencia de luz [279]. En este caso, la explicación puede ser que el aumento del catabolismo de macromoléculas tales como clorofilas libera más ROS [266], y una

síntesis aumentada de antocianinas podría ayudar a proteger la célula del daño. De cualquier modo, en los experimentos de esta Tesis se verifica la tendencia que relaciona la caída de la concentración de clorofilas y carotenos, con el aumento de concentración de antocianinas a lo largo del tiempo para los tres tratamientos usados (Figuras 4.2 C-E y 4.12B, C, E). Respecto de la inducción de antocianinas por virus, particularmente por UK1, este fenómeno puede tener varias causas, actuando solas o en combinación, que explicarían el efecto observado. Por un lado, las antocianinas pueden inducirse por senescencia o por sobreacumulación de ROS [279]. La senescencia está acelerada en plantas Col0 infectadas con UK1, que a su vez sobreacumulan ROS (Figuras 4.2 y 4.6). Por otro lado, la biosíntesis de antocianinas también puede inducirse por déficits de nutrientes como Pi o N ([270, 277]). En este sentido, la disminución de la acumulación de mRNA de PHO2 y el aumento de RNS1 observada a 16 dpi en hojas 11, sobre todo en plantas Col0 infectadas con UK1 (Figura 4.8), son indicadores de deficiencia de Pi [368, 375]. En Col0, tanto la carencia de Pi como la de N, por separado, induce aumento de antocianinas ([276]). La falta combinada de Pi y N sube antocianinas a un nivel intermedio entre carencia de N (más grave) y de Pi [270]. Por lo tanto, en Col0 WT, las antocianinas podrían aumentar tanto por déficit de N, de Pi, o ambos combinados. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que las respuestas a la carencia de N de la planta son varias, e incluyen la reducción del crecimiento y la acumulación de antocianinas [270], fenotipos que son evidentes en las plantas de los experimentos infectadas con UK1 (Figura 4.2A y D, Figura 4.5 y Tabla 4.2). Es posible que la acumulación diferencial de antocianinas no sea monocausal, sino que responda a un conjunto de señales, que en el caso de UK1 parecen estar todas actuando en conjunto en la misma dirección.

En plantas NahG, cuya senescencia no se altera por las infecciones virales, las antocianinas se encuentran sobreacumuladas incluso en las mock-inoculadas, respecto a lo observado en plantas Col0 (Figuras 4.2D vs. 4.12E, líneas llenas). Esto puede estar relacionado con el hecho ya reportado de que, en plantas NahG, el nivel de metabolitos antioxidantes se encuentra elevado constitutivamente, lo cual a su vez puede explicar el bajo nivel de acumulación de ROS ante infecciones de RNA virus [332]. En este caso, el aumento detectado de concentración de antocianinas con el tiempo en plantas infectadas (débilmente significativo y sólo con UK1) podría estar relacionado con el efecto de competición por recursos. A su vez, el nivel basal elevado de estos flavonoides podría explicar las pocas diferencias en su acumulación detectadas antes de 27 dpi por la infección con ambos virus en mutantes NahG (Figura 4.12E).

En relación con estas hipótesis, sería interesante continuar las investigaciones con al menos dos líneas de trabajo: por un lado, analizar en hojas 11 de plantas NahG la expresión génica de marcadores de senescencia y genes inducibles por estreses, particularmente déficits de Pi y N (similarmente a lo realizado en Col0, Figura 4.8). Por otro lado, observaciones personales aisladas indican que la fertilización del agua de riego atenúa los síntomas, retrasa la senescencia y disminuye la coloración roja-violeta característica de aumento de antocianinas en plantas infectadas. En este sentido, experimentos llevados a cabo en cultivos hidropónicos, con concentraciones controladas de nutrientes, podrían ayudar a determinar el grado en el cual los estreses

por  $-Pi$  y/o  $-N$  influyen en varios parámetros de senescencia y fenotipos de desarrollo diferencial entre tratamientos.

### **La sobreacumulación de ROS disparada por UK1 depende del SA y determina la gravedad de fenotipos de detención del crecimiento**

La detención del crecimiento en plantas Col0 infectadas es particularmente acentuada por UK1 (Figura 4.5B y Tabla 4.2). Esto puede estar relacionado con estreses ocasionados por déficits de N y exceso de ROS sobreacumuladas, como se mencionó más arriba. En plantas NahG, aunque este efecto también se observa (Figura 4.13 y Tabla 4.3), es menos acentuado. Por un lado, estos resultados pueden deberse al crecimiento más veloz de las plantas NahG respecto de las Col0 que fue observado en varios experimentos independientes. En efecto, las hojas 11 evidenciaron un mayor tamaño en NahG y a 4 dpi (comparar Figuras 4.5B y 4.13). Esto podría indicar un desarrollo más rápido y una llegada al tamaño final más veloz en plantas NahG. Por otro lado, la sobreacumulación diferencial de ROS que se observa entre plantas Col0 y NahG infectadas con UK1 también podría ser causal de esta diferencia en la detención de crecimiento de hojas 11 entre plantas Col0 y NahG. Es importante destacar que solamente el tratamiento con UK1 produjo un área foliar final mayor en NahG respecto a Col0 (alrededor de  $1.5 \text{ cm}^2$  en NahG versus  $0.5 \text{ cm}^2$  en Col0). En muestras mock-inoculadas, a 21 dpi el área promedio final alcanzada está alrededor de los  $4.0\text{-}4.5 \text{ cm}^2$  tanto para Col0 como para NahG, y en plantas infectadas con JPN1, alrededor de  $2.5 \text{ cm}^2$  para plantas de ambos genotipos. Esto coincide con un nivel relativo de ROS mucho más bajo alcanzado ante la infección de UK1 en plantas NahG respecto a Col0 y con la ausencia de desencadenamiento de acumulación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en plantas Col0 o NahG ante infecciones con JPN1 (Figuras 4.6 versus 4.14).

La producción de ROS es una consecuencia común de las infecciones virales, y las plantas que no pueden enfrentar el exceso de acumulación de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  poseen un crecimiento vegetativo comprometido y suelen fallar en la floración [275]. De acuerdo con este panorama, plantas Col0 infectadas con UK1 (pero no con JPN1) sufrieron detención del crecimiento de flores (Figura 4.1) y de hojas de roseta sistémicas (Figura 4.5 y Tabla 4.2). El análisis de acumulación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Figura 4.6) reveló una acumulación diferencial de estas ROS entre cepas: mientras que JPN1 se mantuvo en niveles indistinguibles respecto a los niveles de las plantas control, UK1 indujo un incremento sostenido de ambas ROS a lo largo del experimento. Incluso, en plantas NahG el fenotipo de detención del crecimiento inducido por UK1 estuvo asociado con niveles mayores de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  respecto de los controles (Figura 4.14 y Tabla 4.3), a pesar de no detectarse una sobreacumulación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 4.14A). El arresto de crecimiento detectado ante la infección por la cepa JPN1 en plantas NahG, también correlacionó con una sobreacumulación transitoria de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  a 16 dpi. Estos resultados, en su conjunto, apuntan a  $\text{O}_2^{\bullet-}$  como la principal ROS responsable de los fenotipos de detención del crecimiento, aunque harían falta más experimentos para clarificar este punto.

Estos resultados muestran un escenario en el cual la infección por UK1 dispara la sobreacumulación de ROS, tanto de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dependiente de SA, como de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , menos

dependiente de los niveles de SA endógenos. Esto a su vez determinaría funciones celulares afectadas, llevando a la detención del crecimiento y la senescencia temprana en plantas Col0. JPN1 también induce senescencia temprana, pero por otros mecanismos distintos a la señalización o daño celular masivo originados por ROS. Los experimentos con NahG muestran que los fenotipos de senescencia diferencial desencadenados por ambas cepas necesitan para manifestarse la acción del SA en la planta, lo cual a su vez posibilita la acumulación de  $H_2O_2$  durante las infecciones.

La ausencia de sobreacumulación de  $H_2O_2$  durante las infecciones de plantas NahG con UK1 (en marcado contraste con lo observado en plantas Col0) está en línea con lo observado previamente en esas mutantes infectadas con varios RNA virus [332]. Es posible que estas observaciones tengan su origen en que el estallido oxidativo inicial, producto de la infección con patógenos, es normalmente seguido de la biosíntesis de SA, el cual a su vez afecta los niveles de ROS en un bucle de retroalimentación positiva ([376]), que se interrumpe en plantas NahG. Además, mientras que en plantas Col0 los niveles de  $O_2^{\bullet-}$  se incrementan entre 70-180% a lo largo del experimento en plantas infectadas con UK1 respecto a los controles, las plantas NahG sufren una sobreacumulación de tan sólo 50-80% (Figuras 4.6A y 4.14A). Como se mencionó más arriba, esto podría estar relacionado con una menos marcada detención del crecimiento vegetativo.

### **JPN1 y UK1 regulan de manera diferente los sistemas enzimáticos celulares de generación y barrido de ROS**

La acumulación diferencial de ROS observada entre tratamientos puede ser la consecuencia de alteraciones en los sistemas enzimáticos de la planta de producción y/o barrido de las ROS. Los análisis por qPCR revelaron que ambas cepas regularon de manera distinta genes clave implicados en plantas Col0 en esos procesos (Figura 4.8). Tanto JPN1 como UK1 son reconocidos por la planta como agentes patógenos a etapas tempranas de la infección, considerando la marcada inducción a 4 dpi de PDF1.4, un gen de defensa insensible a SA (Figura 4.11A) inducido por infecciones virales [243]. Sin embargo, sólo UK1 induce la expresión de la Peroxidasa 71, una enzima apoplástica generadora de ROS, desde 4 a 16 dpi de manera fuerte y muy significativa (Figura 4.8). Consistentemente, el pico de acumulación de ROS detectado en plantas infectadas con UK1 se da a 16 dpi (Figura 4.6), coincidiendo con el máximo nivel de sobreacumulación de Peroxidasa 71 detectado. A pesar de que las ROS pueden generarse también mediante la activación de otras enzimas tales como las NADPH oxidasas [98], el análisis realizado permitió identificar la regulación diferencial entre cepas de una peroxidasa que es clave en la generación de ROS en el apoplasto, lo cual es indicativo de reconocimiento del patógeno por parte de la planta. Este resultado es importante porque permite vincular observaciones fenotípicas tales como la detención del crecimiento con un plausible modelo molecular para la acumulación diferencial de ROS entre cepas que en última instancia sea responsable de dichos fenotipos, a pesar de que hacen falta análisis más detallados para confirmar este punto.

Otra fuente potencial de ROS son los lipohidroperóxidos y aniones superóxido generados por las lipoxigenasas (LOX), que se activan durante la senescencia [377].

LOX2 es una enzima cloroplástica que cataliza la conversión de ácidos grasos poliinsaturados de membrana a lipohidroxiperóxidos ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ), los cuales son inestables y generan precursores de MeJA y otras ROS [378]. Sólo UK1 indujo la sobreacumulación de LOX2 a 16 dpi (Figura 4.8C), cuando la senescencia es ya un proceso en marcha también en plantas infectadas con JPN1 (como lo evidencia la inducción de SAG12). Esta diferencia puede tener su origen en la sostenida subregulación de TCP4 en plantas infectadas con JPN1 (Figura 4.8C), ya que TCP4 controla la expresión de LOX2 [207].

Las diferencias en la acumulación de ROS pueden también tener su origen en la desregulación de los mecanismos normales de detoxificación de la célula. Los mismos fueron investigados analizando el sistema de barrido de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  celular compuesto por la CSD1 (citoplasmática), la CSD2 (cloroplástica), la chaperona CCS1 que determina el correcto plegamiento y carga de cobre de ambas, así como el miR398, regulador negativo de las tres enzimas, junto con la CSD3, peroxisomal e independiente de miR398 (Figura 1.30). Todas estas enzimas dependen del cobre como cofactor para su funcionamiento. La Figura 4.8B muestra que los perfiles de acumulación inducidos por ambas cepas fueron similares en su conjunto. La inducción de CSD1 y 2 estuvo de acuerdo a lo esperado, ya que ambas SODs habían sido encontradas sobreacumuladas ante infección por TuMV en un reporte anterior [327]. Sin embargo, una excepción relevante se encontró a 10 dpi, cuando CSD2 fue fuertemente sobreacumulada por JPN1, pero UK1 no indujo cambios en este transcripto. Esta diferencia coincidió con una elevada sobreacumulación de miR398 (cerca de 6 veces respecto a controles, ver Figura 4.8B y Apéndice G) en plantas infectadas con UK1 a 10 dpi, que podría estar previniendo la sobreacumulación de mRNA de CSD2. Sin embargo, no se detectó un efecto regulador análogo de miR398 sobre CSD1 ni CCS1, sus otros blancos analizados. Esto podría deberse a que CSD2 es el blanco que parecería ser el más sensible a la regulación por este miR (comunicación personal del Dr. J. Palatnik, IBR-Rosario), además podría explicarse por las diferencias en el apareamiento de bases entre miR398 y sus mRNAs blanco [225] o a la influencia de otros factores que regulen la transcripción de estos blancos de miR398 durante las infecciones virales. Por otro lado, las chaperonas de cobre se sobreacumulan durante la senescencia normal, lo cual reflejaría la necesidad de removilizar iones metálicos para su reciclaje [267].

Como los cloroplastos son una fuente principal de ROS [379-380] y la CSD2 (cloroplástica) no está sobrerregulada en plantas infectadas con UK1 hasta fases tardías del proceso infeccioso (16 dpi), se puede sugerir que el sistema básico de detoxificación de superóxido está disminuido en esas plantas.

La CSD3, peroxisomal, es insensible a miR398 y no depende de CCS1 [226]. Sin embargo es muy interesante notar que CSD3 muestra un patrón de regulación “de más a menos” en plantas infectadas con JPN1 o UK1 de 4 a 16 dpi. Este patrón ha sido reportado previamente para CSD3 en otros patosistemas [381]. Los peroxisomas son una fuente temprana de señalización mediada por ROS [382] y tienen sus propios mecanismos detoxificadores. Sin embargo, en etapas tardías del proceso infeccioso, la fuerte inducción de CCS1, CSD1 y CSD2 desencadenada por ambas cepas, puede explicar la disminución de CSD3 como una adaptación de la planta para ahorrar cobre para su uso como cofactor de dichas enzimas en compartimientos celulares más comprometidos por la infección.

En relación con esta afirmación, la sobreacumulación de miR398 en etapas tardías de la infección fue inesperada, ya que según reportes bibliográficos, este miR es reprimido por ROS y estreses bióticos [229]. Sin embargo, miR398 se induce por el déficit de cobre [227], un mecanismo que le permite a la célula limitar la síntesis de proteínas CSDs y desviar este micronutriente para su uso en la plastocianina, un transportador de electrones sin cuya actividad la célula se paraliza metabólicamente [228]. Se sabe que miR398 es corregulado junto con miR397 y miR408 ante la deficiencia de cobre, vía su activación común por el TF SPL7 [336] (Figura 1.23D). Por lo tanto, se midió el perfil de acumulación de estos miRs a través del tiempo (Figura 4.8C). No pudo detectarse un patrón claro de sobreexpresión para estos miRs. Por lo tanto, parece poco probable que la falta de cobre sea la fuerza motriz actuante detrás de la sobreacumulación de miR398. Como miR398 se induce por varios estreses abióticos [168], la sobreacumulación observada puede ser el resultado de la integración de múltiples señales derivadas de los cambios complejos experimentados por las plantas bajo infecciones virales.

Al analizar en detalle el perfil de los cambios de miR408, se observa que el mismo sigue un perfil de acumulación similar a lo detectado por los microarreglos en plantas de tabaco infectadas con TMV: a una inducción a etapas intermedias de la infección, le sigue una subregulación a etapas tardías (Figura 3.8A y Figura 4.8C). Como se mencionó más arriba en el Capítulo 3 de esta Tesis, se ha sugerido que el blanco de miR408, la plantacianina está vinculada a respuestas de defensa y estrés y al intercambio redox [337], entre otros roles [338-339]. Desde este punto de vista, la subregulación de miR408 podría tener un valor adaptativo para la planta al permitir una sobreacumulación de su mRNA blanco.

Tomados en su conjunto, la fuerte y sostenida inducción de la acumulación de mRNA de Peroxidasa 71 (generadora de ROS) y la inducción tardía de LOX2 observadas sólo ante infecciones por UK1 (Figura 4.8A, C) junto con el perfil de acumulación diferencial observado para CSD2 (Figura 4.8B) son consistentes con la observada acumulación de ROS contrastante entre cepas (Figura 4.6). Entonces, tanto los sistemas enzimáticos de generación de ROS como su detoxificación fueron diferencialmente alterados por JPN1 y UK1.

### **El perfil de expresión de genes clave en la regulación de nutrientes puede indicar competición por recursos a etapas tardías de la infección**

Como se mencionó más arriba, el aumento en antocianinas en plantas infectadas con UK1 puede tener su origen al menos en parte en déficits de Pi y/o N. En este sentido, las evidencias obtenidas de la inducción de RNS1 y la represión de PHO2 (Figura 4.8A, C) indican que ambas cepas provocarían déficit de Pi, ya que RNS1 es una endorribonucleasa asociada a senescencia, cuya inducción se ha relacionado con la removilización de Pi y N de los ácidos nucleicos y PHO2 es un transportador de fosfato cuya expresión disminuye ante el déficit de Pi [279, 368, 375], aunque UK1 lo hace antes y con más intensidad (RNS1 a 10 dpi).

El análisis de dos trabajos recientes en los cuales se midieron por la técnica de HTS los sRNAs de plantas de Arabidopsis ante estreses, revela que miR408 y miR398 se

reprimen en tejidos aéreos por  $-Pi$  [383], mientras que miR397, miR398 y miR408 se reprimen por  $-N$  [219]. De manera interesante, UK1, que produce los cambios más marcados en la acumulación de los mRNAs relacionados con genes de estrés a tiempos tardíos, reprime a miR397 y a miR408 de manera significativa a 16 dpi (Figura 4.8C). JPN1 induce una ligera, aunque no significativa, represión en ambos casos a 16 dpi.

En definitiva, la visión inicial que otorgaba a cada miR un rol aparentemente exclusivo de respuesta a un estrés específico, está siendo reemplazada por otra que subraya las múltiples señales de estrés que pueden afectar a un mismo miR. Consecuentemente, es esperable detectar cambios que sean el resultado de la suma de esos estímulos, sobre todo en procesos complejos como las infecciones virales, donde los estreses y desarreglos hormonales pueden ser variados y en ocasiones, contrapuestos desde el punto de vista de la inducción/represión de un mismo miR. Este panorama complejo podría explicar que la corregulación de miRs relacionados con el metabolismo del cobre vista como respuesta a estreses abióticos ([336]) se viera afectada en el caso de infecciones virales, como parece ser el caso de miR398, que es inducido fuertemente. Esto último implica una regulación más compleja de dichos miRs, cuyos mRNAs blanco cumplen funciones diversas.

Ante este panorama, sería de interés averiguar si uno o los dos nutrientes están en defecto en las plantas ante las infecciones con ambas cepas. En este sentido, no sólo sería relevante realizar los experimentos en hidroponía sugeridos anteriormente para regular las concentraciones de Pi y N presentes, sino también ensayar mediciones adicionales que permitan identificar el estímulo de estrés más fuerte. Por ejemplo, miR399 (regulador negativo de PHO2) se reprime fuertemente por  $-N$  [219] pero se induce varias veces por  $-Pi$  [383]. Su acumulación relativa en plantas infectadas podría dar indicios acerca de cuál nutriente está afectando en mayor medida su respuesta ante las infecciones.

Otro gen de respuesta a estrés ensayado fue APS1 (Figura 4.8C). El mRNA de APS1 es regulado negativamente por el miR395 ante déficits de sulfato [198]. APS1 no sufrió cambios inducidos por JPN1 ni UK1 ni siquiera a etapas tardías de la infección. Este resultado puede reflejar sencillamente que las plantas infectadas no están bajo estrés de  $-S$ . Mientras que el N y el Pi son componentes principales de las cadenas de ácidos nucleicos y de las proteínas virales, las cuales se sintetizan masivamente en la célula y deben necesariamente sustraer elementos de su uso normal en la planta, el S forma parte del virus a lo sumo como componente de los aminoácidos que lo contengan. Alternativamente, la elección de cuantificación de mRNA de APS1 pudo no haber sido la más acertada para detectar estrés de  $-S$ . Aparentemente, el mRNA de APS4 es mucho más sensible a las diferencias de concentraciones de S en el tejido aéreo ([221]). Como ambos mRNAs son regulados por miR395, también sería interesante cuantificar este miR maduro. Probablemente, sí exista una regulación de miR395 y sus genes blanco durante las infecciones virales, al menos a etapas tardías, ya que durante la senescencia en la hoja de Arabidopsis el nivel de S cae en más del 60% [384], y la misma se encuentra acelerada por ambas cepas.

Este elemento no es el único reportado como disminuido durante la senescencia normal; los niveles de C, Cr, Cu, Fe, K, Mo, N, P, S y Zn caen al menos un 40% durante la senescencia de la hoja, indicando la removilización de nutrientes hacia otros tejidos [384]. En este sentido, las señales de déficit de cualquier nutriente deben

ser analizadas con cuidado, ya que pueden reflejar tanto una competición por recursos entre la planta y el virus, como la redistribución de los recursos de la hoja producto de la senescencia acelerada por las infecciones. Probablemente ambos factores estén actuando en simultáneo, aunque incidan de manera diferente para distintos elementos.

### **Los análisis transcriptómicos revelan una sobreacumulación temprana de SAGs inducida por UK1 y una convergencia tardía entre ambas cepas de TuMV**

Además de cumplir otras funciones como reguladores del crecimiento y de estar involucrados en las vías de síntesis de MeJA [200, 207], los TFs pertenecientes a la familia TCP se encuentran globalmente reprimidos durante las etapas finales de la senescencia normal de la hoja [267]. Coincidiendo con estos resultados, TCP4 mostró una subacumulación en plantas infectadas con UK1 recién a 16 dpi (Figura 4.8C). A pesar de que el proceso de senescencia está retrasado en plantas infectadas con JPN1 (respecto de UK1) y de la inducción mucho más tardía de la mayoría de los SAGs ante infecciones con JPN1, TCP4 se reprimió antes y con mayor intensidad en plantas infectadas con esta cepa. Esto podría estar reflejando, al menos para los días tempranos posinfección, un efecto sobre TCP4 más relacionado con sus roles en el crecimiento o el balance hormonal, o podría indicar la activación temprana de una red de senescencia diferente para JPN1. A 16 dpi, la subacumulación de TCP4 se observó en plantas infectadas con ambas cepas.

Como se mencionó en la introducción de este Capítulo, WRKY70 es un importante TF regulador de la senescencia foliar [281-283], es insensible a la regulación mediada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y posee una expresión creciente y dependiente de SA durante el proceso de senescencia, pero participa también de la señalización hormonal en los procesos de defensa ante patógenos [284-285]. Los integrantes de la familia WRKY muestran una inducción en etapas medias y tardías de la senescencia normal [267]. En base a estos datos, es posible postular que la sobreacumulación de WRKY70 observada a 4 y 10 dpi en hojas infectadas con UK1 recién emergidas responden a estímulos de estrés o señalización de defensa, tal vez mediada por SA; mientras que JPN1 no dispara estos mecanismos y sólo induce WRKY70 a etapas tardías de la infección, convergiendo con UK1 a 16 dpi (Figura 4.8A).

Los TFs de la familia NAC también se inducen en general durante la senescencia, pero a diferencia de los WRKYs, los NACs también están sobreacumulados en las primeras etapas de este proceso ([267]). Coincidentemente, ORE1 está activado muy fuertemente ya a 4 dpi en plantas infectadas con UK1, e incluso JPN1 indujo una pequeña activación a 4 dpi, si bien esta activación no se mantuvo a 10 dpi ante la infección con JPN1, probablemente por falta de un mecanismo de amplificación de las señales de senescencia.

Es importante resaltar que los promotores de ORE1 y ORS1 poseen motivos W-box y WRKY-box [263], por lo que al menos en parte la activación de los mismos podría ser reforzada por el aumento en acumulación de WRKYs.

Cuando se analizaron los regulones de ORE1 y ORS1 (Figuras 4.7 y 4.8A), se observaron notables diferencias en cambios de expresión génica inducidos por JPN1 y

UK1. Notablemente, UK1 indujo varios SAGs a 4 dpi, cuando la hoja 11 es apenas visible (Figuras 4.3A y 4.5). La sobreacumulación sostenida de ROS en hojas sistémicas infectadas con UK1 se asoció con una inducción temprana de SAGs, lo cual a su vez puede determinar un disparo irreversible de los mecanismos que llevan a la senescencia. Estos hallazgos están de acuerdo con un estudio que indicó un solapamiento extenso entre factores de transcripción inducidos por la senescencia y por patógenos [385]. A 10 dpi, cuando no se detecta amarilleamiento de las hojas 11 (Figura 4.5A), ambas cepas mantuvieron sus diferencias en inducción de SAGs. Sin embargo, a 16 dpi se observó una clara convergencia entre los perfiles de expresión relativa de SAGs determinados por ambas cepas. Esta situación está de acuerdo con un reporte reciente, que mostró que a etapas tardías las redes de senescencia disparadas por estímulos diversos tienden a converger [386].

ORE1 fue inducido por UK1 a 4 y 10 dpi, mientras que su regulador negativo, miR164, no mostró cambios en estas etapas. A 16 dpi, sin embargo, los cambios de acumulación relativa de miR164 y ORE1 estuvieron negativamente correlacionados ante los tratamientos por ambas cepas, como está reportado ante la senescencia normal [172]. Esto sugiere que hay una regulación transcripcional de ORE1 a etapas tempranas de la infección (probablemente mediada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o SA, estímulos a los cuales este gen responde -Figura 4.11 y [263]), pero a etapas tardías se agrega un efecto adicional de regulación postranscripcional determinado por la senescencia.

La fuerte subacumulación de su parálogo, ORS1, a 16 dpi fue inesperada no sólo debido a que está reportado que ORS1 es fuertemente inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un metabolito acumulado en hojas infectadas con UK1 (Figura 4.6A), sino porque ambos parálogos poseen una elevada conservación de secuencias promotoras y juegan roles similares en promover la senescencia [263]. Es interesante comprobar que ambas cepas indujeron cambios similares en el perfil de acumulación de estos reguladores maestros de la senescencia en *B. juncea* (Figura 4.9). Esto enfatiza no sólo la naturaleza conservada de la respuesta de ambos parálogos a un estrés común en *Brassicaceae*, sino también las respuestas diferenciales entre ellos ante un estímulo externo.

En plantas infectadas con JPN1, de los 11 genes ensayados en la Figura 4.8A (los cuales son genes relacionados con senescencia o respuesta a patógenos) tres se indujeron levemente a 4 dpi: ORE1 (AT4G19810), EF-hand calcium binding (AT4G27280) y PDF1.4 (AT1G19610). Todos ellos se inducen por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [263] y los dos primeros, también por SA (Figura 4.11A). Sin embargo, a 10 dpi sólo PDF1.4 continúa inducido en plantas tratadas con JPN1, y con menor intensidad. Como se mencionó anteriormente, PDF1.4 está implicado en reconocimiento de patógenos y defensa; en cuanto a EF-hand calcium binding, se ha reportado que cambios rápidos en concentraciones intracelulares de Ca<sup>2+</sup> son resultado de señalización por patógenos y la señalización de Ca<sup>2+</sup> está asociada a la producción del estallido oxidativo de defensa, formando ROS y Ca<sup>2+</sup> un bucle de retroalimentación positiva (resumido en [98]). Además, genes relacionados fueron reportados como SAGs dependientes de SA [267, 279]. En este contexto, la no sobreacumulación de ROS en plantas Col0 infectadas con JPN1 (Figura 4.6) permite hipotetizar que el reconocimiento transitorio de JPN1 por parte de la planta a 4 dpi no conduce a un mecanismo de retroalimentación positiva mediada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-SA que permita la sostenida inducción de genes responsables de producción de ROS en dpi posteriores.

La glicosil hidrolasa (AT4G19810) y RNS1 (AT2G02990) son SAGs reportados [278-279] que dependen fuertemente de ORE1 para su expresión [280]. Consistentemente con estos datos, su expresión aumenta con la de ORE1, sobre todo a etapas tardías para ambas cepas.

RLP23 (AT2G32680), peroxidasa 71 (AT5G64120) e YLS9 (AT2G35980) son SAGs [247, 263, 278-279, 387] que responden fuertemente a la aplicación de SA (Figura 4.11A). Su activación es temprana y fuerte ante UK1, pero tardía y mucho más débil (o inexistente, caso de la peroxidasa 71) con JPN1. Estos resultados abonan la idea de que UK1 induce la sobreacumulación de estos SAGs en estadios tempranos de la infección, cuando la hoja 11 es muy joven y no hay síntomas de senescencia visibles (amarilleamiento, Figura 4.5A), pero JPN1 no lo hace, o lo hace de manera transitoria y muy débil. La característica de SAG de muchos de estos genes activados, entre ellos peroxidasa 71, productora de ROS, haría que su sobreacumulación sostenida profundice en plantas infectadas con UK1 el proceso de senescencia, el cual a días tardíos también es acelerado por JPN1, pero por mecanismos distintos.

Por último, SAG12, que codifica para una cisteína proteasa [388], es un gen inducido por la senescencia normal ([389]) y ampliamente utilizado como marcador estándar de la senescencia (ejemplo: [172, 386]). SAG12 sólo fue detectado en plantas infectadas, y recién a 16 dpi (Figura 4.8C). Esto coincide con lo reportado en un trabajo previo, en el cual se observa que durante el proceso de senescencia natural SAG12 es inducido solamente a etapas tardías de la vida de la hoja [267]. Es importante destacar que estos resultados resaltan la relevancia de tener en cuenta la utilización de otros SAGs, de inducción más temprana, en caso de pretender su utilización como marcadores de senescencia en etapas tempranas (NACs) o intermedias (NACs, WRKYs) del proceso, cuando aún los parámetros bioquímicos clásicos de senescencia no muestran diferencias entre tratamientos [390].

### **SA y ROS, particularmente el $O_2^{\bullet-}$ generado por peroxidasas de pared, pueden explicar la reducción diferencial de crecimiento entre plantas Col0 y NahG infectadas con UK1**

La interrelación entre SA y moléculas señalizadoras como  $Ca^{2+}$  o ROS, particularmente  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$ , fue establecida por primera vez de forma clara utilizando células de tabaco BY-2. Al aplicar SA al cultivo, se elevó la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  procedente del exterior, dependiente de la producción de  $O_2^{\bullet-}$  extracelular [391]. Esta producción extracelular de  $O_2^{\bullet-}$  fue seguida de acumulación de  $H_2O_2$ , pero no del más peligroso radical libre  $HO^{\bullet}$ , cuya acumulación es inhibida *in vitro* por SA [392]. Asimismo, se ha visto que este disparo temprano de  $O_2^{\bullet-}$  es catalizado por peroxidasas extracelulares, tanto libres como unidas a pared celular, que generan SA activado ( $SA^{\bullet}$ ), el cual a su vez genera  $O_2^{\bullet-}$  [393]. De esta manera, la presencia de SA activa las peroxidasas de pared, las cuales al catalizar la generación de  $O_2^{\bullet-}$  provocan la entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula, determinando cambios en la expresión de genes de defensa [392]. En este sentido, cobra particular relevancia la observación de la inducción sostenida de varios genes de defensa en plantas Col0 infectadas con UK1, entre ellos la peroxidasa 71. Su inducción sostenida durante la infección no se observa en plantas infectadas

con JPN1 y podría explicar al menos en parte la constante sobreacumulación de ROS ante UK1 en plantas Col0, pero inducciones mucho menores de ROS en plantas NahG infectadas con UK1 (Figuras 4.6, 4.8A y 4.14). Debido a que hay varios mecanismos de producción de ROS en plantas, la sobreacumulación de  $O_2^{\bullet-}$  observada en plantas NahG infectadas con UK1 (aunque mucho menor que la producida en plantas Col0) podría tener un origen diferente. Alternativamente, podría hipotetizarse que su origen es idéntico y que los niveles muy reducidos de SA remanentes en estas plantas podrían ser suficientes para inducir un efecto mensurable ante la infección con esta cepa. Sin embargo, al acumular las NahG menos del 1/ del SA de las plantas WT [376], este mecanismo parece poco probable.

La acción del SA y las peroxidasas de pared como disparadores de acumulación de  $O_2^{\bullet-}$  e influjo de  $Ca^{2+}$  ha sido reportada también en células en suspensión de Arabidopsis [394]. Por otro lado, el  $O_2^{\bullet-}$  determina el cierre de estomas, el cual es un evento que depende de  $Ca^{2+}$  en varias especies, incluyendo Arabidopsis (resumido en [395]). Es interesante notar que se ha reportado que este cierre de estomas dependiente de SA puede ser inhibido por el agregado externo de detoxificadores de ROS como CSDs o catalasas, o por inhibidores selectivos de peroxidasas de pared, pero no por inhibición farmacológica de la actividad o mutaciones en NADPH oxidasas (otras enzimas productoras de ROS). Esto sugiere que la actividad de las peroxidasas de pared es la responsable del cierre de estomas dependiente de  $Ca^{2+}$  ante la aplicación de SA [395]. Así, la liberación de SA podría inducir el cierre de estomas; a largo plazo, la acumulación permanente de  $O_2^{\bullet-}$  determinaría un crecimiento celular menor ya que el cierre de estomas impide el intercambio gaseoso a tasas normales, con lo que el crecimiento se retarda. Esto puede explicar al menos parcialmente los fenotipos acusados de detención del crecimiento observados en plantas Col0 (y en menor medida, en plantas NahG, correspondiendo con su menor nivel de sobreacumulación de  $O_2^{\bullet-}$ ) sobre todo ante el tratamiento con UK1 (Figuras 4.5 y 4.13 y Tablas 4.2 y 4.3).

### **La interacción entre SA y $H_2O_2$ es un componente clave de las respuestas de senescencia diferenciales**

Estudios previos demostraron que las plantas NahG poseen una senescencia retrasada respecto a Col0 [279]. Aproximadamente el 20% de los SAGs inducidos por la senescencia vinculada al desarrollo normal están subregulados respecto a plantas Col0, incluyendo al marcador de senescencia tardío SAG12 y varios genes pertenecientes a las familias NAC y WRKY [279].

A la vez, los mismos genes maestros reguladores de senescencia ORE1 y ORS1 son inducibles por  $H_2O_2$  [263]. Así, las plantas NahG tienen seriamente comprometida la señalización de estas redes de senescencia a través tanto de la carencia en la acumulación de SA (al cual ORE1 y otros SAGs responden, ver Figura 4.11) como de  $H_2O_2$  (al cual ambos parálogos NAC responden). Desde este punto de vista la pérdida de aceleración de senescencia en plantas NahG infectadas con ambas cepas, respecto de los controles mock-inoculados, puede ser atribuida al menos en parte a la ruptura del sistema de retroalimentación positiva de SA- $H_2O_2$ .

El presente trabajo subraya un rol central del SA en determinar la progresión de la senescencia ante infecciones con diferentes cepas de TuMV. Llamativamente, un estudio reciente usó el potyvirus PVY<sup>NTN</sup> para demostrar que SA es esencial en la determinación del desarrollo de síntomas de enfermedad y de cambios transcriptómicos tempranos en interacciones compatibles con un cultivar de papa tolerante [396]. Otro trabajo relacionado, también en papa, mostró que los niveles de SA se elevaron en un cultivar susceptible después de la infección con PVY<sup>NTN</sup>, incluso en hojas sistémicas a tan sólo 1 dpi [397]. Sin embargo, se halló que plantas mutantes con la vía del SA disminuida no resultaron más susceptibles que plantas Col0 WT a infecciones con virus, lo cual difiere de lo reportado ante patógenos celulares [69]. Resultados similares se reportaron en un trabajo que mostró que plantas NahG desarrollan síntomas más suaves que los controles WT ante infecciones con diferentes virus con genoma de RNA, a pesar de sobreacumular en menor medida los transcritos de varios genes respondedores de SA considerados clave en el proceso de defensa [332]. Basado en los resultados de este Capítulo, se puede hipotetizar que la perturbación de las vías de senescencia controladas por ORE1/ORS1 podría estar jugando un rol central en determinar síntomas más suaves luego de las infecciones virales en plantas con disminución en la acumulación y/o biosíntesis de SA. Al efecto de poner a prueba esta hipótesis, sería de interés realizar un experimento análogo al de la Figura 4.8 con plantas NahG.

#### **Los síntomas desencadenados por las cepas de TuMV estarían determinados por la competición por recursos y por una diferente generación o percepción de la respuesta mediada por SA**

Mientras que se ha propuesto que los fenotipos foliares inducidos por TuMV se deben principalmente a la desregulación de ARF8 [398], los resultados de la Figura 4.8C muestran poco o ningún cambio en la acumulación del mRNA de ARF8 a diferentes dpi con JPN1 o UK1, a pesar de mostrar las plantas infectadas fenotipos claros. Estos resultados están en mejor sintonía con un trabajo previo que no había encontrado cambios significativos en la acumulación del mRNA de ARF8 en hojas inoculadas o sistémicamente infectadas con TuMV a 10 dpi [327]. También de acuerdo con lo mostrado en la Figura 4.8B, en dicho trabajo TuMV indujo significativamente la acumulación de CSD1 y CSD2 [327], resaltando la importancia de los procesos de detoxificación de ROS ante estas infecciones virales.

Sin embargo, se debe tener cuidado cuando se usan diferentes aproximaciones para el estudio de las infecciones virales. Las hojas infectadas comprenden una mezcla heterogénea de respuestas del huésped a medida que los patógenos se dispersan de las células inoculadas primarias [305]. Por eso mismo, las comparaciones directas entre resultados obtenidos en hojas inoculadas e infectadas sistémicamente deben ser interpretadas con precaución. Además, cuando se analiza RNA extraído de varias hojas de roseta diferentes, los efectos sobre los transcritos pueden ser diluidos artificialmente. Aquí, la elección de la hoja 11 como el sumidero preferencial de partículas virales (Tabla 4.1 y Figura 4.3) permitió usar una aproximación basada en qPCR, por lo general un método más sensible que el de microarreglos, para detectar

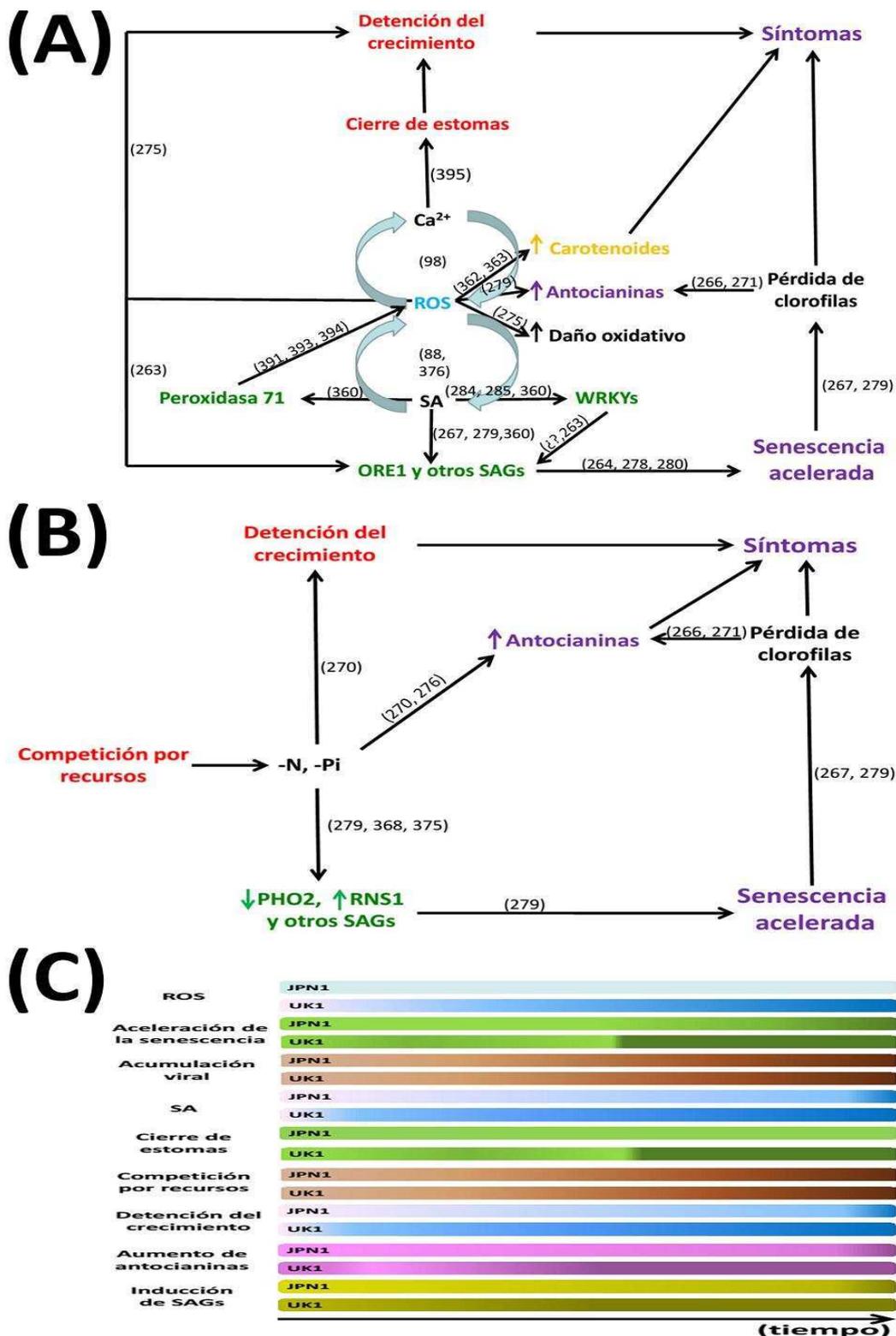
cambios que de otra manera podrían haber pasado desapercibidos, minimizando los efectos de falso-negativo de los microarreglos.

Tomados en su conjunto, los resultados indican que ambas cepas inducen senescencia y producen síntomas a través de vías parcialmente distintas. Ambas cepas inducirían déficit de nutrientes, como parecen indicarlo la subregulación de PHO2 y la inducción de RNS1 a 16 dpi, lo cual es consistente con el agotamiento de aminoácidos observado en otros patosistemas a etapas tardías de la infección viral (Figura 3.6A). El aumento en contenido de antocianinas observado en plantas infectadas con virus también puede ser un síntoma de  $-Pi$  y  $-N$  ([270, 276-277]). Para obtener soporte adicional para la hipótesis de competición por recursos, sería de interés establecer el porcentaje de las proteínas totales que pertenecen a proteínas virales de cada cepa en la planta a distintas etapas de la infección, o el porcentaje de peso fresco que corresponde a viriones [319]. De todos modos, como ambas cepas alcanzaron niveles similares de acumulación de RNA viral (Figura 4.4), la competición por recursos como causa única falla en la explicación de los síntomas diferenciales observados entre JPN1 y UK1. Sin embargo, el proceso de senescencia en plantas infectadas con JPN1 puede ser una consecuencia principal de este déficit. En plantas infectadas con UK1, este proceso estaría además exacerbado por la sobreacumulación de ROS inducida por las enzimas generadoras de ROS dependientes de SA y la activación temprana de los regulones de ORE1/ORS1.

Varias líneas de evidencia apuntan al SA como la hormona clave responsable de diferencias principales en los síntomas observados entre cepas. El extenso solapamiento entre la respuesta temprana ante UK1 de varios SAGs y el efecto del SA sobre los mismos, la abolición parcial de las diferencias de síntomas y la diferente acumulación de ROS entre cepas en plantas NahG respecto de Col0 WT, constituyen evidencia que apoya a esta hipótesis. Se necesitan investigaciones adicionales para hallar el mecanismo que subyace a las diferencias disparadas por ambas cepas de TuMV ante la infección, incluyendo mediciones de SA en tejidos sistémicos de plantas infectadas con ambas cepas.

La Figura 4.15 esquematiza los resultados obtenidos en el presente trabajo en el marco de la discusión con resultados previos, proponiendo mecanismos que actúan como base de las diferencias en síntomas producidos por ambas cepas de TuMV. La Figura 4.15A muestra que en plantas infectadas con UK1, el disparo temprano de SA determina el comienzo de una retroalimentación positiva con ROS [88, 376], el cual es reforzado por la inducción de la Peroxidasa 71 en la pared celular por esta hormona (esta Tesis, [360]), la cual es capaz a su vez de formar ROS [391, 393-394]. SA también induce TFs de la familia WRKY [284-285, 360], los cuales podrían activar SAGs de la familia de ORE1, que poseen motivos en sus promotores de unión a W-box y WRKY-box [263]. Por otro lado, las ROS también pueden activar ORE1 [263]. Como resultado de la activación de ORE1 su regulón, podría iniciarse un proceso de senescencia acelerada [264, 278, 280]. La pérdida de clorofilas consecuencia de su catabolismo determinado por el programa de senescencia, tiene como consecuencia probable el aumento de antocianinas que limitan el daño oxidativo resultante de los intermediarios de la degradación de éstas [266, 271]. Las antocianinas también pueden ser inducidas por ROS originadas a partir del bucle con SA [279], el mismo que sería responsable de inducir la síntesis de carotenoides [362-363] y de promover el daño

oxidativo [275]. La sobreacumulación de  $O_2^{\bullet-}$  en el apoplasto, consecuencia de la actividad de las peroxidasas de pared, genera un bucle de retroalimentación positiva con  $Ca^{2+}$ , [98] que al entrar en las células determina el cierre de estomas [395], llevando a un fenotipo de detención del crecimiento [275]. En su conjunto, estas respuestas determinan gran parte de los síntomas observados ante la infección por UK1. A su vez, UK1 y JPN1 inducen el déficit de N y Pi por competición por recursos con la planta, esencialmente aminoácidos y ácidos nucleicos (Figura 4.15B). Este déficit asimismo dispara la detención del crecimiento [270], la acumulación de antocianinas [270, 276] y la activación diferencial de genes de respuesta a estrés de nutrientes, algunos de los cuales son SAGs [279, 368, 375], los que a su vez determinan la aceleración de la senescencia [279]. Ésta induce la pérdida de clorofilas [267, 279], y la concomitante subida de las antocianinas [266, 271]. En su conjunto, estos factores determinan parte de los síntomas inducidos por ambas cepas. Finalmente, el panel C de la Figura 4.15 consta de un esquema que resume, en forma de gradientes temporales, los principales cambios inducidos por ambas cepas al infectar *A. thaliana*.



**Figura 4.15.** El bucle de retroalimentación positiva SA-ROS y la competencia por recursos determinan la diferencia de sintomatología producida entre cepas UK1 y JPN1. Los números entre paréntesis indican referencias bibliográficas. A) El bucle de retroalimentación positiva SA-ROS está en el centro del disparo de senescencia temprana producido por UK1 (pero no por JPN1). B) UK1 y JPN1 compiten por recursos con la planta, esencialmente por N y Pi. En VERDE, factores endógenos de la planta. C) Esquema que resume, en forma de gradientes temporales, los principales cambios inducidos por ambas cepas al infectar *A. thaliana*. Para detalles y referencias ver paneles A) y B) de esta Figura y el texto principal.

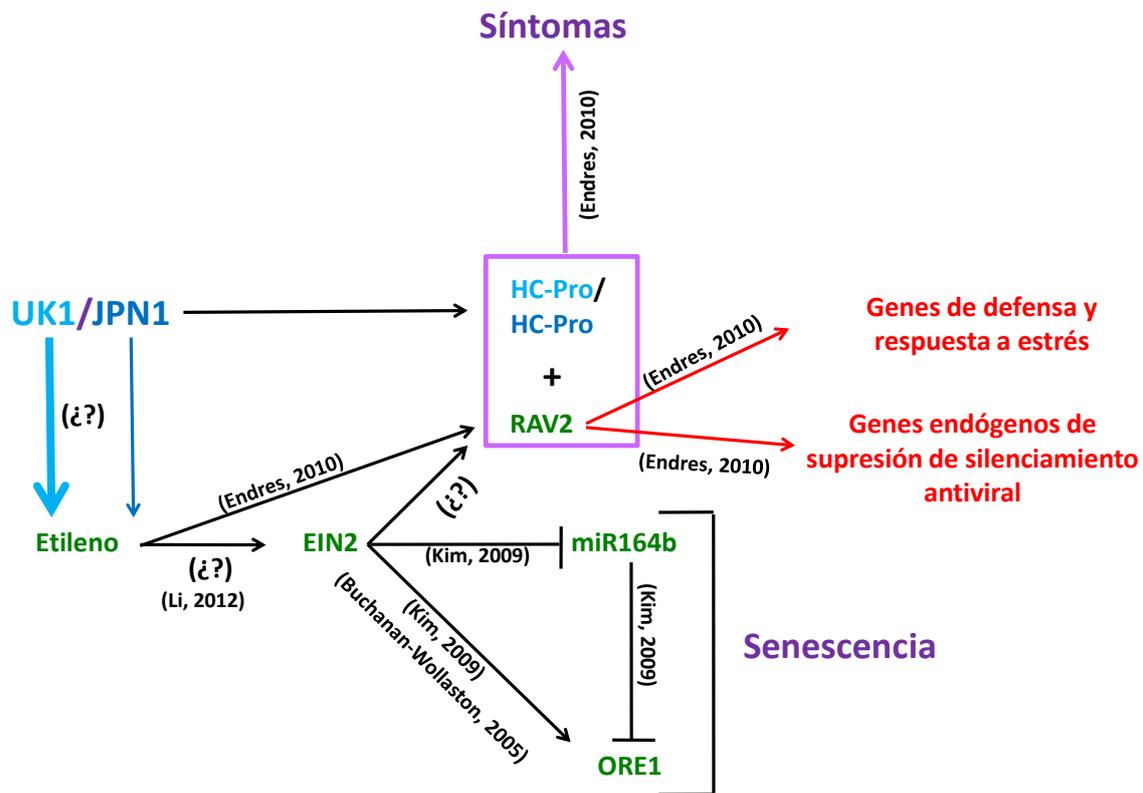
### **El posible efecto de factores virales sobre hormonas permite postular la existencia de mecanismos subyacentes a las diferencias entre JPN1 y UK1**

Algunos trabajos publicados en los últimos años indican que hay factores virales que, o bien en conjunción con otros factores del mismo virus o bien con factores del huésped, interfieren con las respuestas mediadas por hormonas ante la infección. Se están comenzando a vislumbrar posibles mecanismos por los cuales los mismos generan síntomas o influyen en la dispersión viral.

CMV, un ssRNA (+) virus posee una proteína supresora del silenciamiento (2b). Esta proteína tiene la capacidad de alterar la acumulación de SA (pero no actuando en forma independiente sino en el contexto de la infección) y la respuesta de cientos de transcritos ante la infección con CMV depende de ella [242]. Además, 2b en conjunto con otros factores, inhibe la respuesta mediada por MeJA de cerca del 90% de los genes inducidos normalmente por esta hormona. Se cree que esta modulación de SA y MeJA favorece la propagación por áfidos de CMV. Esta hipótesis es muy interesante en el caso del presente trabajo, ya que TuMV presenta características de dispersión similares y una respuesta diferencial entre cepas que parece tener su base en alteraciones en la vía del SA, potenciándola en el caso de UK1, sobre todo. Un efecto inverso sobre la interacción SA/JA ha sido descrito en plantas transgénicas sobreexpresando la proteína P6 de CaMV, un dsDNA virus; en ese caso, PR1 se encuentra subacumulada y la respuesta a la infección determina menores niveles de SA e inhibición de la inducción de sus genes dependientes, pero mayores niveles de MeJA y sus transcritos inducibles [399]. Un trabajo recientemente publicado en nuestro laboratorio, también apunta a la interferencia de proteínas virales con vías hormonales como base para la generación de síntomas ([323]).

Por último, es importante mencionar que en un trabajo reciente usando TuMV en *Arabidopsis*, por primera vez se demostró que un factor endógeno del huésped, RAV2, es necesario para el funcionamiento de un supresor del silenciamiento, el HC-Pro de TuMV, ya que es necesario que ambos interactúen físicamente para cumplir su rol en supresión de silenciamiento. RAV2 es necesario para la generación de gran parte de los síntomas por parte de HC-Pro, pero no alterando la vía de los miRs, sino permitiendo la acumulación de genes de defensa y estrés que interferirían con el silenciamiento génico [238]. La Figura 4.16 muestra en un esquema el mecanismo hipotético por el cual ambas cepas de TuMV podrían estar originando las diferencias vistas en el presente Capítulo. RAV2 depende de etileno, por lo que probablemente se encuentre bajo control de EIN2 durante la senescencia, al igual que lo está el bucle de retroalimentación positiva que incluye además a miR164/ORE1. Por un lado, UK1 y JPN1 podrían inducir diferentes niveles de etileno y por lo tanto, de activación de EIN2. Por otro, HC-Pro de ambas cepas podrían diferir en su capacidad de unión a RAV2 (y, por consiguiente, en la determinación de síntomas mediante la inducción más o menos fuerte de genes de respuesta a estrés o defensa. El uso de virus quiméricos sería útil para determinar esto). De esta manera, ambos mecanismos podrían estar actuando solos o en conjunto para establecer las diferencias de inducción génica, acumulación de ROS y síntomas diferenciales observados entre cepas, sin implicar cambios en la

acumulación viral. Por cuestiones de claridad, la influencia del SA y ROS no se señala en la Figura 4.16, aunque es probable que más de un mecanismo esté actuando simultáneamente para explicar los fenotipos diferenciales observados entre cepas virales.



**Figura 4.16.** ¿Podría la diferencia de síntomas entre UK1/JPN1 tener su origen en una diferente activación de la vía del etileno/RAV2? Se ha visto que EIN2 forma un bucle de retroalimentación positiva con miR164 y ORE1, dependiente de la edad, que dispara senescencia en la hoja (Kim et al., 2009 [172]). A medida que la edad de la planta avanza, EIN2 se induce (Li et al., 2012 [286]), reprimiendo a miR164 y reforzando la liberación de ORE1, que así puede inducir senescencia. Por otro lado, RAV2, un TF endógeno de plantas, responde a etileno (posiblemente a EIN2 u otro factor), y es necesario para que HC-Pro (a la cual se une) produzca gran parte de los síntomas en la roseta (Endres et al., 2010 [238]). RAV2 es un supresor del silenciamiento endógeno, y un activador de genes de defensa; al parecer, la activación de estos genes de defensa resulta perjudicial para la planta, al suprimir el silenciamiento y permitir la dispersión viral (Endres et al. 2010 [238]). Si UK1 y JPN1 indujeran diferentes niveles de etileno (flechas celeste/azul de diferente grosor) podría detectarse indirectamente midiendo EIN2. Entonces, los niveles de RAV2 serían diferentes y en consecuencia la asociación con HC-Pro sería distinta, produciendo síntomas diferentes. La diferente activación temprana (4 dpi y 10 dpi) de genes de defensa observada sólo en UK1, podría ser consecuencia de esto. Alternativamente, ambas cepas podrían no alterar niveles de etileno de manera diferencial, pero al tener ambas cepas HC-Pros diferentes, éstos podrían interactuar con RAV2 con diferente fuerza. En VERDE, factores endógenos de la planta.

## Conclusión

En el presente trabajo se caracterizaron los fenotipos desarrollados por la infección de dos cepas de TuMV, JPN1 y UK1 en *Arabidopsis thaliana*, con especial énfasis en la

senescencia. Se logró establecer que, a pesar de que ambas cepas acumulan cantidades comparables de RNA viral a lo largo del proceso infeccioso, UK1 induce una senescencia acelerada respecto también de JPN1. Esto coincidió en plantas UK1-infectadas con una sobreacumulación de ROS ( $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), una marcada detención del crecimiento, una mayor y más temprana inducción de SAGs de la vía de ORE1/ORS1 y una desregulación de los sistemas más importantes de generación y detoxificación de ROS: peroxidasa de pared y superóxido dismutasas. JPN1, mientras tanto, no indujo acumulación de ROS ni desarreglo temprano en expresión génica, sino que para esta cepa la competición por recursos podría ser una fuerza principal en la entrada prematura en senescencia respecto de los controles mock-inoculados. Los experimentos en *B. juncea* indican que los reguladores maestros de la senescencia ORE1 y ORS1 poseen respuestas diferentes entre sí pero conservadas en ambas brasicáceas ante ambas cepas. Los datos aportados por los experimentos de aplicación de hormonas SA y MeJA, así como los provenientes del uso de plantas transgénicas NahG, señalan un rol para el SA como determinante de la senescencia diferencial causada por las dos cepas. SA podría estar cumpliendo este rol implicado en el bucle de retroalimentación positivo SA- $\text{H}_2\text{O}_2$ , e induciendo así la expresión de genes SAGs, o como co-generador de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  en el espacio extracelular, disparando la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y el consecuente cierre de estomas, causando parte del fenotipo de detención del crecimiento observado ante la infección por UK1, o mediante un factor proteico viral que module la respuesta mediada por SA. Futuros experimentos deberían medir el nivel de acumulación de SA ante las infecciones con ambas cepas, así como investigar el posible rol de HC-Pro u otras proteínas virales en el establecimiento de síntomas diferenciales, utilizando virus quiméricos de reemplazo y plantas de *Arabidopsis* mutantes para los factores del huésped claves para la interacción con dicho VSR.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Las plantas de *Nicotiana benthamiana* fueron crecidas en invernadero con temperaturas dentro del rango de 20 a 26 °C con ciclos de 16 horas de luz y 8 de oscuridad (fotoperiodo 16:8 h). Las plantas de *Brassica juncea* fueron mantenidas en invernadero con fotoperiodo 16:8 h con un rango de temperaturas de 22-25 °C durante el día y 20 °C por la noche. En el caso de plantas *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col0 tipo salvaje y transgénicas NahG, las semillas fueron sembradas en macetas y dejadas a 4 °C por 3 días para estratificación. Las plantas luego se transfirieron a una cámara de crecimiento AR-95L Controlled Environmental Chamber (Percival, Perry, IA) donde crecieron bajo condiciones estándar de día largo adecuándose a [215] (fotoperiodo 16:8 h, Hr( / ) = 70/60 y T (°C)= 23/21 durante periodos de día/noche, respectivamente). La intensidad de luz a la altura de la roseta fue de 100-120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Las plantas fueron regadas por subirrigación cada dos o tres días, según lo necesario.

### Infecciones virales

Para infectar plantas de *Arabidopsis thaliana* y *Brassica juncea*, se utilizó siempre extracto fresco recién obtenido de un machacado de plantas infectadas previamente. Las cepas de potyvirus TuMV-UK1, TuMV-JPN1 y TuMV-GFP [358, 361, 365] se mantuvieron en plantas de *A. thaliana* ecotipo Col0 infectadas. Plantas mock-inoculadas fueron inoculadas con buffer sulfito de sodio (1/  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  + 0,1/  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  m/v) y los machacados infectivos se obtuvieron utilizando este buffer en relación 5:1 con tejido fresco infectado (v/m). Las plantas fueron raspadas mecánicamente de manera similar a lo descrito más arriba para las plantas de tabaco. Se eligió para infectar *A. thaliana* en un estadio previo a la transición vegetativo/reproductivo, a 21 días post-sembrado (dps), durante el estadio de desarrollo de la planta 1.08 [215]. La inoculación se realizó en la tercera hoja verdadera, ya que en ese estadio de desarrollo de la planta dicha hoja había prácticamente alcanzado su tamaño final. Entre 3 y 5  $\mu\text{L}$  de inóculo fueron utilizados por cada planta. El muestreo de las hojas número 5 de la roseta comenzó a 4 dpi y continuó a varios dpi hasta que las hojas de las plantas infectadas alcanzaron la senescencia completa (27 dpi). A cada tiempo de muestreo, las hojas 5 fueron muestreadas de plantas seleccionadas al azar para evitar sesgos procedentes de un efecto en la posición de la planta en cada bandeja o de diferencias entre plantas crecidas en bandejas diferentes, dentro de la cámara de crecimiento. Las hojas fueron rápidamente pesadas y fotografiadas con una regla para establecer la escala antes de ser colocadas en tubos individuales para proceder con los análisis de mediciones de pigmentos. El muestreo de las hojas número 11 de la roseta comenzó a 4 dpi y continuó hasta 21 dpi. El muestreo de dichas hojas se realizó de modo similar a

lo descrito para las hojas número 5. Las hojas fueron rápidamente fotografiadas con una regla inmediatamente antes de ser colocadas en tubos individuales e inmersas en nitrógeno líquido (hojas 11 usadas para extracción de RNA) o en pocillos individuales de placas conteniendo soluciones de tinción (hojas 11 usadas para ensayos de tinción de DAB o NBT).

En el caso de *B. juncea* se inocularon plantas en estadio 1.05 (alrededor de 18 dps) con 20  $\mu$ L de buffer o del machacado fresco proveniente de plantas Col0 infectadas con cada cepa. A los 4, 11 y 16 dpi se muestreó la hoja superior a la inoculada que formaba el menor ángulo con la misma (análogamente a lo realizado con *A. thaliana* al muestrear la hoja 11) e inmediatamente se congeló en nitrógeno líquido el material. Se mantuvo a  $-80$  °C hasta proceder con la extracción de RNA.

### Bombardeo génico

Las cepas virales de TuMV-JPN1, TuMV-UK1 y la recombinante TuMV-GFP (sintetizada a partir de un esqueleto de cepa UK1) fueron cedidas por el grupo de los Dres. Fernando Ponz y Flora Sánchez del laboratorio del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, CBGP (UPM-INIA) de Madrid, España. En el caso de TuMV-UK1 y TuMV-GFP se partió del plásmido conteniendo el clon infectivo, por lo que se procedió a bombardear plantas de *N. benthamiana* y *A. thaliana* Col0 para obtener plantas infectadas y en lo sucesivo mantener el inóculo en plantas de Col0 infectando manualmente. Se utilizó el Helios<sup>TM</sup> Gene Gun de Bio-Rad con este fin, adaptando las condiciones de bombardeo a partir del manual de instrucciones del fabricante y del reporte técnico correspondiente [400]. Brevemente, la metodología consiste en utilizar una pistola génica que funciona a base de aire comprimido (helio) para disparar cartuchos conteniendo adheridos en su cara interna la mezcla de partículas de oro recubiertas de DNA plasmídico (pDNA) portando la construcción de interés. En primer lugar se deben determinar el diámetro de las partículas de oro a utilizar, la cantidad (mg) de oro a usar por cartucho (*Microcarrier Loading Quantity*, MLQ) así como la cantidad de pDNA ( $\mu$ g) por mg de oro (*DNA Loading Ratio*, DLR). Se eligió un diámetro de 1.6  $\mu$ m para las partículas de oro. La MLQ elegida fue de 0.25 mg oro/cartucho. La DLR escogida fue de 1  $\mu$ g pDNA/mg oro. La concentración de polivinilpirrolidona (PVP) fue de 0.05 mg/mL. A continuación se bombardearon hojas expandidas de *N. benthamiana* y plantas enteras (en estadio vegetativo) de *A. thaliana* Col0 probando diferentes presiones de disparo (psi) con helio. Se encontró que 75 psi para *A. thaliana* y 100-125 psi para *N. benthamiana* permitían obtener eficiencias de infección cercanas al 100% , minimizando a la vez el daño en tejidos bombardeados.

### Cuantificación de proteínas

En todos los casos, la determinación de la concentración de proteínas totales se realizó utilizando el *Bio-Rad protein assay* de Bio-Rad, basado en el método de Bradford [313], según las especificaciones del fabricante. La proteína de las curvas de calibración fue BSA, la cual se diluyó en cada caso en el buffer de extracción

pertinente. Se utilizaron placas transparentes de 96 pocillos de Greiner Bio-one. Un espectrofotómetro Multiskan Spectrum (Thermo Corporation) fue usado para medir absorbancia a 595 nm.

### **Detección por DAS-ELISA de CP virales**

Para realizar la detección por DAS-ELISA de CP TuMV se utilizó el kit anti-Potyvirus de BIOREBA, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron placas transparentes de 96 pocillos Nunc MaxiSorp®. Un espectrofotómetro Multiskan Spectrum (Thermo Corporation) fue usado para medir absorbancia a 405 nm.

### **Técnicas clásicas de biología molecular**

Las técnicas de extracción de DNA plasmídico, digestión con enzimas de restricción, obtención de células *E. coli* químicamente competentes o electrocompetentes y su transformación, electroforesis de DNA en geles de agarosa y de PCR se realizaron según protocolos básicos [341-342] o utilizando kits comerciales, según lo indicado. Todas las enzimas de restricción y modificantes utilizadas fueron de New England Biolabs, a menos que se indique lo contrario y se utilizaron según las especificaciones del fabricante. La purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa se realizó con el kit *QIAEX II® Gel Extraction* (Qiagen) y las purificaciones de DNA plasmídico de alta calidad se realizaron con columnas del kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen). Para el clonado de vectores por métodos tradicionales se emplearon las cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes. Todos los cultivos bacterianos fueron realizados en medio “lysogeny broth” (LB) líquido [343] adicionado con el antibiótico de selección ampicilina 100  $\mu$ g/mL. El medio LB semisólido en placa se preparó agregando agar (1.5 g/100mL) e IPTG y X-Gal para observar las colonias transformadas.

### **Medición de pigmentos**

Los pigmentos fueron extraídos de muestras individuales de hojas verdaderas número cinco de *A. thaliana*. Clorofilas y carotenos fueron extraídos usando etanol 96/ (v/v) y luego almacenando las muestras a temperatura ambiente por 16 h con agitación suave protegiendo las muestras de la luz. Se midió absorbancia de 0.2 mL a 664, 649 y 470 nm en un espectrofotómetro Multiskan Spectrum (Thermo Corporation). Las concentraciones de clorofilas a y b se calcularon mediante las ecuaciones:  $C_{a+b}$  = clorofilas totales ( $\mu$ g/mL) =  $22.24 \times A_{649} + 5.24 \times A_{664}$ ,  $C_a$  = clorofila a ( $\mu$ g/mL) =  $13.46 \times A_{664} - 5.19 \times A_{649}$ , y  $C_b$  = clorofila b ( $\mu$ g/mL) =  $27.43 \times A_{649} - 8.12 \times A_{664}$ . La concentración de carotenos se calculó mediante la ecuación: = carotenoides totales ( $\mu$ g/mL) =  $(1000 \times A_{470} - 2.13 \times C_a - 97.64 \times C_b)/209$ . Los contenidos de antocianinas se midieron según lo descrito por [401], con modificaciones. En este caso los pigmentos fueron extraídos con una solución de metanol:HCl 99:1 (v/v) y luego

almacenadas a temperatura ambiente por 16 h con agitación suave protegiendo las muestras de la luz. Se midió absorbancia de 0.2 mL a 530 and 657 nm en el espectrofotómetro. La concentración de antocianinas se calculó mediante la ecuación:  $OD_{530} - 0.25 \times OD_{657}$ , para compensar el aporte de las clorofilas y sus productos de degradación a la absorbancia en 530 nm.

### **Detección y cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en hojas mediante la técnica de DAB**

El tratamiento de DAB fue adaptado de [402], con modificaciones. A diferentes días post-inoculación con los tres tratamientos (4, 11, 16 y 21 dpi) se cortaron las hojas número 11 a la altura del pecíolo con tijeras quirúrgicas y se mantuvieron inmersas durante 16 h en solución 1 mg/mL (pH = 3.9) de 3,3-diaminobencidina (DAB) (Sigma-Aldrich, Germany) en la oscuridad, bajo agitación suave. Las reacciones se detuvieron mediante la remoción de la solución de tinción y su reemplazo por la adición de etanol 96/ caliente. Se realizaron repetidos lavados del mismo modo hasta blanquear las hojas, removiendo los pigmentos orgánicos. Para cuantificar el nivel de tinción de DAB, las muestras se escanearon utilizando el Image Scanner (GE Healthcare, Piscataway, NJ) y las densitometrías fueron obtenidas usando el programa de análisis de imagen ImageJ para Windows v1.46p. El rango posible de densidades estuvo entre 0 y 255. El ruido de fondo (“background”) se calculó sumergiendo hojas de plantas inoculadas con cada uno de los tres tratamientos en solución pH = 3.9 sin reactivo de DAB, incubando de idéntica manera y lavando con etanol 96/ caliente la misma cantidad de veces que lo hecho para hojas incubadas con DAB. Se escanearon al mismo tiempo que las demás hojas y se restó el valor promedio del ruido de fondo correspondiente a cada día posinfección a los valores obtenidos para las hojas tratadas con DAB con idéntico tratamiento (mock, JPN1 o UK1). Los promedios de valores de DAB correspondientes a cada tratamiento con virus fueron normalizados a los valores promedio de mock-inoculadas para su correspondiente dpi.

### **Detección y cuantificación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en hojas mediante la técnica de NBT**

Para la cuantificación de tinción de nitro blue tetrazolium chloride (NBT), las hojas número 11 fueron muestreadas idénticamente a lo hecho para tratamiento de DAB. Las hojas se sumergieron en una solución de 0.1/ NBT (Invitrogen, Molecular Probes, Eugen, OR) en buffer fosfato de sodio 50 mM pH = 7.8, como se describió previamente [403]. La solución se infiltró en las hojas mediante la aplicación de vacío por dos minutos en una cámara de vacío. Luego, las hojas infiltradas fueron incubadas por alrededor de 2 horas en la oscuridad, bajo agitación suave. Las hojas fueron clarificadas con etanol, escaneadas y medidas densitométricamente como se describió más arriba para tinción de DAB. Muestras preparadas para medir el ruido de fondo de la tinción sin NBT fueron tratadas análogamente a lo descrito para tinción de DAB. Los promedios de valores de NBT correspondientes a cada tratamiento con virus fueron normalizados a los valores promedio de mock-inoculadas para su correspondiente dpi.

### **Cálculo del área de las hojas**

Se utilizaron los datos obtenidos con el programa ImageJ a partir de los escaneos de hojas número 11 de los ensayos de DAB y NBT para comparar el crecimiento de las hojas entre- e intra-tratamientos.

### **Tratamientos con hormonas**

Los tratamientos de ácido salicílico (SA) o metil-jasmonato (MeJA) 0.5 mM o agua pH = 7 (control) se realizaron aplicando 0.5 mL de un aerosol esparcido por la roseta entera de plantas Col0 en el estadio de desarrollo 1.08. La efectividad de cada tratamiento fue confirmada mediante qRT-PCR usando LOX2 (AT3G45140), el cual es inducible por MeJA [374] o PR1 (AT2G14610), inducible por SA [373] (ver Figura 4.10 y Tabla E2 del Apéndice E de esta Tesis).

### **Extracción de RNA para experimentos de qPCR**

El RNA utilizado para experimentos de qPCR fue obtenido mediante la puesta a punto de un protocolo de extracción de RNA total con fenol ácido usando *TRIZOL*<sup>®</sup> (Invitrogen) y adaptándolo para trabajar con baja masa de tejido (Ver Apéndice D de esta Tesis).

### **Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)**

Ver detalles acerca del cumplimiento de los requerimientos MIQE listados en la Tabla E2 del Apéndice E de esta Tesis.

### **Análisis estadísticos**

Las pruebas de ANOVA de una vía con prueba a posteriori de Tukey y las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis con prueba a posteriori de Dunn se llevaron a cabo usando el programa GraphPad Prism versión 5.03 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Para todos los análisis estadísticos el nivel de significancia elegido fue: \*/ $\Delta$  =  $0.01 \leq p \leq 0.05$ ; \*\*/ $\Delta\Delta$  =  $0.001 \leq p \leq 0.01$ ; \*\*\*/ $\Delta\Delta\Delta$  =  $p \leq 0.001$ , a través de todos los experimentos de este capítulo de la Tesis. Para los análisis de qPCR, se utilizaron el programa LingRegPCR [404] y el método de normalización de [318]. Los cocientes de expresión relativa y los análisis estadísticos fueron calculados usando el paquete estadístico de fgStatistics (Di Rienzo J.A, 2009, <http://sites.google.com/site/fgStatistics/>). Se calculó un ajuste de

frecuencias de falsos positivos (FDR, *false discovery rate*) para corregir ante comparaciones múltiples [405] usando un umbral de 0.05.

### **Cebadores para PCR y qPCR**

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para PCR y qPCR se diseñaron utilizando el programa Vector NTI Advance 9 (Life Technologies). Los cebadores de microRNAs para la síntesis de cDNA y ensayos de qPCR fueron diseñados en base a [347]. Todos los cebadores están listados en las Tablas F4, F5 y F6 del Apéndice F de esta Tesis.

## CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES INTEGRADORAS

El siguiente capítulo de esta Tesis plantea una interpretación integral de los resultados obtenidos en los capítulos previos a la luz de las hipótesis y objetivos planteados al comienzo de la misma. Los resultados logrados permiten sustentar las hipótesis planteadas al comienzo de esta Tesis.

En los Capítulos 2 y 3 de esta Tesis, se ahondó en el impacto que las infecciones con tobamovirus producen en las plantas, enfocando en particular en las consecuencias que dichas infecciones tienen en la inducción transcripcional del PmiR164a (Figura 2.4) y luego, de modo más general, en la acumulación diferencial de un conjunto amplio de miRs maduros (Figura 3.8). Estos estudios son relevantes porque los miRs poseen un rol determinante en los procesos de desarrollo más diversos de las plantas [201]. Como es de esperar teniendo en cuenta que las fitohormonas son también fundamentales para dichos procesos, existen interrelaciones entre éstas y los miRs ([164, 222, 230]), lo cual se pudo observar por ejemplo en la inducción del PmiR164a con GA3 (Figura 2.6). De este modo, se pudo validar la hipótesis anexa 1 planteada, y demostrar por primera vez que al menos en algunos casos, el cambio relativo en acumulación de miRs maduros ante infecciones virales en plantas tiene un componente transcripcional. Además, dado que el miR164 es relevante en procesos morfogénicos y de senescencia en plantas [144-146, 172] estos resultados indicaron que la alteración de hormonas inducidas por virus podría afectar la expresión de estos importantes reguladores maestros de la expresión génica, dando lugar a cambios fenotípicos pleiotrópicos. El primer objetivo específico planteado fue cumplido mediante la observación de la expresión espaciotemporal del miR164a, el cual se detectó en varios tejidos, sobre todo a etapas tempranas y medias del desarrollo normal de *Arabidopsis* (Figura 2.2), corroborando lo reportado en un trabajo independiente [172]. Debido a que el cambio de actividad del PmiR164a o incluso la acumulación diferencial del miR164 maduro ante infecciones virales no producirían un cambio en el fenotipo de la planta infectada *per se*, se vincularon estos cambios con el impacto en los genes blanco de este miR, los cuales son relevantes para el proceso de desarrollo y senescencia. Es significativo notar que durante el desarrollo de este trabajo, los importantes resultados publicados en [172] acerca del rol regulatorio de miR164 sobre ORE1 aún eran desconocidos, y tampoco se comprendía la relevancia de este SAG como regulador maestro de una amplia y conservada red de senescencia en *brassicáceas* [264, 280]. Por tal motivo, el análisis de los mRNAs blanco de miR164 se limitó a los por entonces ya bien caracterizados CUC1 y CUC2, genes NAC cuya relevancia estriba sobre todo en sus roles en morfogénesis foliar y floral [144-146, 172]. Al analizar la acumulación de estos mRNAs blanco durante el proceso de infección con dos tobamovirus que inducen el PmiR164a y la sobreacumulación de miR164 maduro, se encontraron resultados inesperados. En efecto, el mRNA de CUC1 se sobreacumuló respecto de plantas no infectadas (Figura 2.5). Se mencionó en la Discusión del Capítulo 2 la posibilidad de que este efecto estuviera producido por la inhibición de la traducción del mRNA de CUC1 o por la actividad de supresores del silenciamiento génico de los tobamovirus ensayados. Otra explicación, sin embargo, apunta a la posibilidad de que la generación de vsiRNAs esté produciendo una competición por proteínas del complejo RISC, tales como AGO1, entre dichos vsiRNAs y

los miRs endógenos. Al menos en células animales, se ha demostrado que la competencia entre miRs endógenos y siRNAs transfectados existe ([182]) y afecta al nivel de acumulación de mRNAs blanco de miRs (Figura 1.24). Ambos mecanismos propuestos de inhibición de actividad de miRs podrían dar lugar a mecanismos de retroalimentación negativa (Figura 1.23B) que induzcan la síntesis de más miR debido al exceso del mRNA blanco y expliquen la sobreacumulación de ambos observada. Para finalizar el análisis del primer objetivo específico, podemos decir que la alteración del miR164, tanto a nivel transcripcional como de acumulación de miR maduro y relativo a sus efectos sobre los genes blanco analizados, fue mayor ante la infección con ORMV, el virus más severo, que ante Cg. Es decir, se encontró una correlación positiva entre el nivel de desarreglo de la vía del miR analizado y la severidad de los síntomas desencadenados por ambos tobamovirus.

Un impacto diferencial similar se observó infectando *N. tabacum* con dos tobamovirus, TMV y ShMV (Capítulo 3). También aquí, el virus más lento y con síntomas más suaves (ShMV, Figura 3.9) produjo cambios menores en la acumulación de precursores de miRs y miRs maduros, y su efecto sobre los mRNAs blanco fue menor y más tardío que en el caso de TMV, más severo (Figuras 3.12 y 3.13), cumpliendo con el objetivo específico número 3 detallado al comienzo de esta Tesis. La validación por qPCR de los niveles de acumulación de varios miRs maduros y sus genes blanco evidenció también en estos patosistemas, que un aumento de miR maduro no necesariamente correlaciona negativamente con la acumulación de sus mRNAs blanco (miR156 y SPL2). En cambio, para el caso de la disminución de miRs maduros, sí pudo observarse un aumento correspondiente de sus mRNAs blancos (miRs 166 y 171 con ATHB-8 y SCLIII-6, respectivamente). Estos hallazgos son coherentes con la hipótesis planteada para el Capítulo 2 basada en [182] acerca de la posible competencia entre vsRNAs y miRs endógenos. En este trabajo, se analizó el precursor del miR166a (también relevante en procesos de desarrollo, como diferenciación abaxial/adaxial de tejidos de hoja, [171, 213]). El mismo se subexpresó en plantas infectadas (un efecto opuesto al que había sido observado con el pre-miR164a en Arabidopsis), evidenciando que el efecto transcriptómico sobre los microRNAs durante las infecciones virales es propio de cada gen. Esto tiene pleno sentido a la luz de la caracterización bioinformática de los diferentes motivos hallados en secuencias promotoras de microRNAs de plantas [176], los cuales se vinculan con respuestas a estreses variados y en particular, a diferentes hormonas. Precisamente, al analizar los cambios metabolómicos de plantas de tabaco infectadas con TMV a etapas muy tempranas de la infección (Figuras 3.4 y 3.5), se detectó un aumento de acumulación de precursores de hormonas SA y MeJA, las cuales son determinantes en muchos procesos de infección viral. Este estudio metabolómico fue solapado con la caracterización del perfil transcriptómico de miRs totales mediante análisis por microarreglos. Esto permitió correlacionar patrones de acumulación diferencial entre metabolitos y miRs de plantas infectadas o mock-inoculadas (permitiendo el cumplimiento del objetivo específico número 2), lo cual permitió hallar interesantes nexos, como por ejemplo los que unen al miR408 con metabolitos del ciclo de Krebs. La importancia de este descubrimiento es evidenciada por el papel central que cumple este miR al regular un mRNA blanco que codifica para un factor proteico que contiene cobre, la plantacianina; ésta puede estar vinculada con la defensa, el intercambio

redox con moléculas pequeñas y la respuesta a estrés, entre otros roles [337-339]. De este modo, se puso en evidencia no sólo la relevancia de analizar los cambios producidos por las infecciones virales a una escala amplia, sino de relacionar diferentes modos de evaluar dichos cambios, lo cual puede poner de manifiesto relaciones insospechadas *a priori* entre diferentes componentes celulares. Especialmente relevante demostró ser el enfoque temporal de los análisis realizados en dicho Capítulo 3, ya que reveló perfiles de acumulación diferencial de virus, de transcriptos y de metabolitos marcadamente diferenciados según el dpi analizado. El hallazgo de que el PmiR164a es inducible por infecciones virales y tratamiento con GA3 (Capítulo 2), llevó a pensar que los promotores de los miRs podrían alterar su actividad incluso antes de la invasión de los virus del tejido sistémico, influidos por señales hormonales provenientes de hojas inoculadas inicialmente, y así originar una respuesta en avance a la infección en tejidos sistémicos. Para probar esta hipótesis, fue esencial el diseño de los experimentos del Capítulo 3, en el cual para los primeros dpi analizados el tejido sistémico muestreado estuvo libre de virus (Figuras 3.2 y 3.7). Esto constituyó una parte de la comprobación de la hipótesis principal planteada en esta Tesis, ya que efectivamente, la primera etapa de la bifase de acumulación de miRs encontrada (Figura 3.8) comprende un descenso en la acumulación de un grupo de miRs con importantes roles en morfogénesis y respuesta a estrés, entre otros roles, ya a 5 dpi. Además, el enfoque detallado de elección de tejido sistémico a muestrear en el Capítulo 3 (sólo la hoja número 8) representó un avance metodológico, ya que esto permite disminuir el “ruido” que puede originarse a partir de un muestreo más heterogéneo de tejidos como el realizado en el Capítulo 2 (plantas enteras de *Arabidopsis*).

Este enfoque fue profundizado y sistematizado al comenzar el trabajo del Capítulo 4. En efecto, como requisito previo para cumplir los objetivos específicos número 4 y 5, se realizó un análisis teórico y práctico que permitiera reconocer el tejido sumidero preferencial de los fotoasimilados (y por ende, de hormonas y virus) provenientes de la hoja inoculada (Tabla 4.1 y Figuras 1.7, 1.8 y 4.3). La elección de la hoja 11 como el sumidero preferencial de partículas virales permitió usar una aproximación basada en qPCR, por lo general un método más sensible que el de microarreglos, para detectar cambios que de otra manera podrían haber pasado desapercibidos, minimizando los efectos de falso-negativo de los microarreglos. Por supuesto, la desventaja estriba en el nivel más acotado del análisis respecto de lo que permiten las técnicas de microarreglos o secuenciación de alto rendimiento (*HTS*), pero la naturaleza del ensayo justifica el enfoque. Esto es así debido a que la hoja seleccionada para el análisis posee una masa muy baja a 4 dpi, el primer día analizado, y las dificultades técnicas para alcanzar la masa mínima de RNA para las técnicas mencionadas son muy grandes. Además, la muy baja expresión de muchos SAGs a 4 dpi hace necesaria una técnica como la qPCR, que permite identificar cambios a partir de un muy bajo número de copias de mRNA celular. Esta puede ser una de las razones por las cuales algunos de los SAGs detectados como diferencialmente acumulados ante el tratamiento con UK1 a 4 dpi podrían aparecer como falsos negativos usando microarreglos. En definitiva, las técnicas de muestreo y análisis mostraron un avance significativo desde el punto de vista metodológico de la precisión, minimización del ruido de fondo, reducción de falsos negativos y nivel de detección, partiendo del uso

de homogenatos de plantas enteras (Capítulo 2), pasando por la selección de una hoja sistémica ya emergida al momento de infectar (Capítulo 3) y llegando a la identificación de una hoja que al momento de inocular, no era visible, pero que se transforma en sumidero preferencial de los virus (Capítulo 4).

Este nivel de análisis fue el requerido para encarar los objetivos específicos número 4 y 5 y confirmar la hipótesis principal, ya que efectivamente, la hoja 11 mostró un fuerte impacto en su morfología y fenotipos de detención del crecimiento acusados (Tabla 4.2 y Figuras 4.3 y 4.5).

En el Capítulo 4, el uso de dos cepas de TuMV que producen síntomas contrastantes permitió, junto con el análisis detallado a nivel bioquímico y molecular, constatar una vez más que el virus más severo (UK1) produce un desarreglo mayor en todos los parámetros analizados. Los mismos incluyeron una senescencia más temprana (Figuras 4.1 y 4.2), una acumulación de ROS que no se observa ante el tratamiento con JPN1 (Figura 4.6) y una inducción más temprana y más marcada de SAGs importantes en determinar senescencia pero también estrés oxidativo (Figura 4.8), los cuales en su mayoría son inducibles por SA (Figura 4.11). Estos datos constituyen el cumplimiento del objetivo específico número 4 y un avance en la validación de la hipótesis planteada en esta Tesis. Es importante notar que en el Capítulo 4, el enfoque de los análisis viró desde uno centrado en el impacto de las infecciones virales sobre los niveles de respuesta de miRs, ya sea a nivel individual y transcripcional (Capítulo 2) o global y transcriptómico de acumulación de miRs maduros (Capítulo 3), hacia otro dirigido a estudiar el impacto de dichas infecciones directamente sobre los mRNAs de SAGs y los parámetros fisiológicos de interés. Sólo los niveles de un miR maduro, miR164, fueron cuantificados, y en relación al proceso de senescencia diferencial entre cepas vinculado a los niveles de acumulación de ORE1, un blanco de dicho miR. En este caso, se encontró una correlación negativa entre miR maduro y su gen blanco analizado, pero sólo a tiempos avanzados de la infección, indicando que ORE1 es probablemente regulado transcripcionalmente a tiempos tempranos, y sólo más tarde podría el miR164 cumplir un rol regulatorio posttranscripcional sobre este mRNA blanco. Estos resultados evidencian la necesidad de tener en cuenta los múltiples niveles regulatorios afectando a un gen dado, de los cuales su regulación posttranscripcional por microRNAs constituye sólo uno de los determinantes de su acumulación. Dicha diferencia de enfoque sobre el estudio de los efectos de las infecciones virales con diferentes cepas permitió establecer un rol de relevancia para el SA en la diferenciación de los fenotipos de senescencia y acumulación de ROS diferenciales entre las mismas (Figuras 4.12 y 4.14). También, en los efectos de detención de crecimiento diferenciales (Tabla 4.3 y Figura 4.13). El tratamiento con SA y MeJA de plantas Col0 WT más el uso de plantas transgénicas NahG infectadas con ambas cepas, permitió entonces cumplir con el objetivo específico número 5, ya que se demostró que una acumulación normal de SA es necesaria para mantener las diferencias fenotípicas y bioquímicas mencionadas. Si bien la hipótesis anexa 2 recibe apoyo de los resultados mencionados, se necesitan experimentos adicionales para soportarla en toda su extensión. En este sentido, sería de utilidad realizar la medición de SA en tejidos sistémicos de plantas Col0 WT infectadas con ambas cepas e infectar NahG y otras plantas mutantes con alteración en vías hormonales diferentes (MeJA, ABA y etileno) con ambas cepas y realizar sobre

ellas análisis transcriptómicos similares a los realizados en la Figura 3.8 a tiempos tempranos. Asimismo, y en vista de la gran similitud entre cepas UK1 y JPN1, sería de interés realizar infecciones con cepas quiméricas de reemplazo que permitieran mapear en zonas precisas del genoma de TuMV su capacidad de generar respuestas oxidativas e interferencia con la expresión de SAGs a tiempos tempranos.

## APÉNDICE A: PUESTA A PUNTO DEL ENSAYO FLUORIMÉTRICO DE ACTIVIDAD *B-GLUCURONIDASA (GUS)* EN ARABIDOPSIS

### Introducción

Con el objetivo de medir la actividad del promotor del miR164a fusionado a GUS ante la aplicación de diferentes tratamientos en plantas de Arabidopsis, se utilizó la técnica de medición de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa en tiempo real mediante el uso de un espectrofluorímetro. Mientras se llevaban a cabo estas mediciones se presentaron dificultades de tipo técnico. Dichas dificultades pusieron en cuestión la posibilidad de continuar adelante con el trabajo, al quedar comprometida la capacidad de efectuar experimentos de tipo cuantitativo para medir la actividad enzimática con la exactitud requerida. Esto nos condujo a replantearnos el protocolo de extracción y realizar experimentos adicionales con el fin de ajustar la técnica mejor a nuestras necesidades, así como de explicar la fuente de error en los resultados previos.

Inicialmente, y para descartar un posible efecto de la posición del transgén PmiR164a:GUS en los resultados obtenidos al aplicar diferentes tratamientos, se seleccionaron 3 líneas transgénicas para la misma construcción. Las mismas poseen niveles de expresión diferentes, como se pudo comprobar tanto por ensayos histoquímicos con X-Glu (ver Figura 2.2, Panel A2-4). Se denominaron 164 L35, 164 L50 y 164 L56, en orden de expresión de GUS creciente, respectivamente. Cada tratamiento, tanto con hormonas como con infecciones virales, fue repetido para cada línea, con el fin de observar resultados comparables que nos permitieran concluir la independencia de los resultados con respecto a la ubicación genómica en la que se había insertado el transgén, pudiendo así atribuir una diferencia de expresión respecto a los tratamientos de control solamente al efecto de dichos tratamientos sobre el promotor PmiR164a.

Sin embargo, mientras que ensayos fluorimétricos con la línea 164 L56 (de alta expresión) permitieron obtener resultados cuantificables, ensayos con las otras dos líneas arrojaron resultados erráticos. Es decir, mientras que para algunas muestras los valores de fluorescencia medidos por el espectrofluorímetro aumentaban de manera constante y lineal durante el tiempo de reacción (por la acumulación del producto 4-MU debido a la actividad enzimática), otras réplicas biológicas producían valores erráticos de medición. A continuación se describirá brevemente el protocolo inicialmente utilizado, el hallazgo del problema para la detección de actividad  $\beta$ -glucuronidasa en algunas muestras, las pruebas para descubrir el origen del mismo, las hipótesis y pruebas posteriores que permitieron desarrollar un protocolo propio para subsanarlos.

### Resultados

Se extrajeron proteínas totales de plantas de *A. thaliana* transgénicas PmiR164a:GUS o P35S:GUS sujetas a diferentes tratamientos utilizando el buffer de reacción para ensayo fluorimétrico de 4-MUG [314] excepto por el agregado del reactivo 4-MUG. Mediante la técnica de Bradford se cuantificó la cantidad de proteínas

totales para cada muestra, y a continuación se sembró la misma cantidad de proteína total en cada pocillo de la placa opaca a utilizar en la fluorimetría. Se completó el volumen de reacción con buffer 4-MUG con sustrato en exceso (1 mM de 4-MUG). Se dejó incubar hasta que la placa dentro del espectrofluorímetro llegara a 37 °C y se procedió a programar el aparato para medir la fluorescencia cada determinado lapso de tiempo. La fluorescencia es informada por el software Soft Max Pro como RFUs (por *Relative Fluorescence Units*) en tiempo real, para cada punto. Luego, automáticamente se obtiene la pendiente que indica RFU/s, dando una velocidad de reacción que se relaciona con la cantidad de enzima en el extracto proteico de cada pocillo.

Cuando se realizó la medición de plantas de 164 L50 tratadas con hormonas, el resultado fue el siguiente:

**Tabla A1.** Resultado de fluorimetrías de plantas de *A. thaliana* transgénicas 164 L50 tratadas con 3 hormonas diferentes, o agua (indicado por diferentes colores y letras). Se sembraron 50 µg totales de proteína en cada pocillo de reacción, se llevó a 60 µL el volumen con buffer de extracción sin MUG para igualar volúmenes y se agregaron 140 µL de buffer de reacción (con el sustrato 4-MUG 1 mM) para llegar a un volumen final de reacción de 200 µL.

#### ESQUEMA

	1	2	3	4
A	A 1	V 1	S 1	R 1
B	A 2	V 2	S 2	R 2
C	A 3	V 3	S 3	R 3
D	A 4	V 4	S 4	R 4
E	A 5	V 5	S 5	R 5
F	A 6	V 6	S 6	R 6
G	A 7	V 7	S 7	R 7
H	A 8	V 8	S 8	R 8

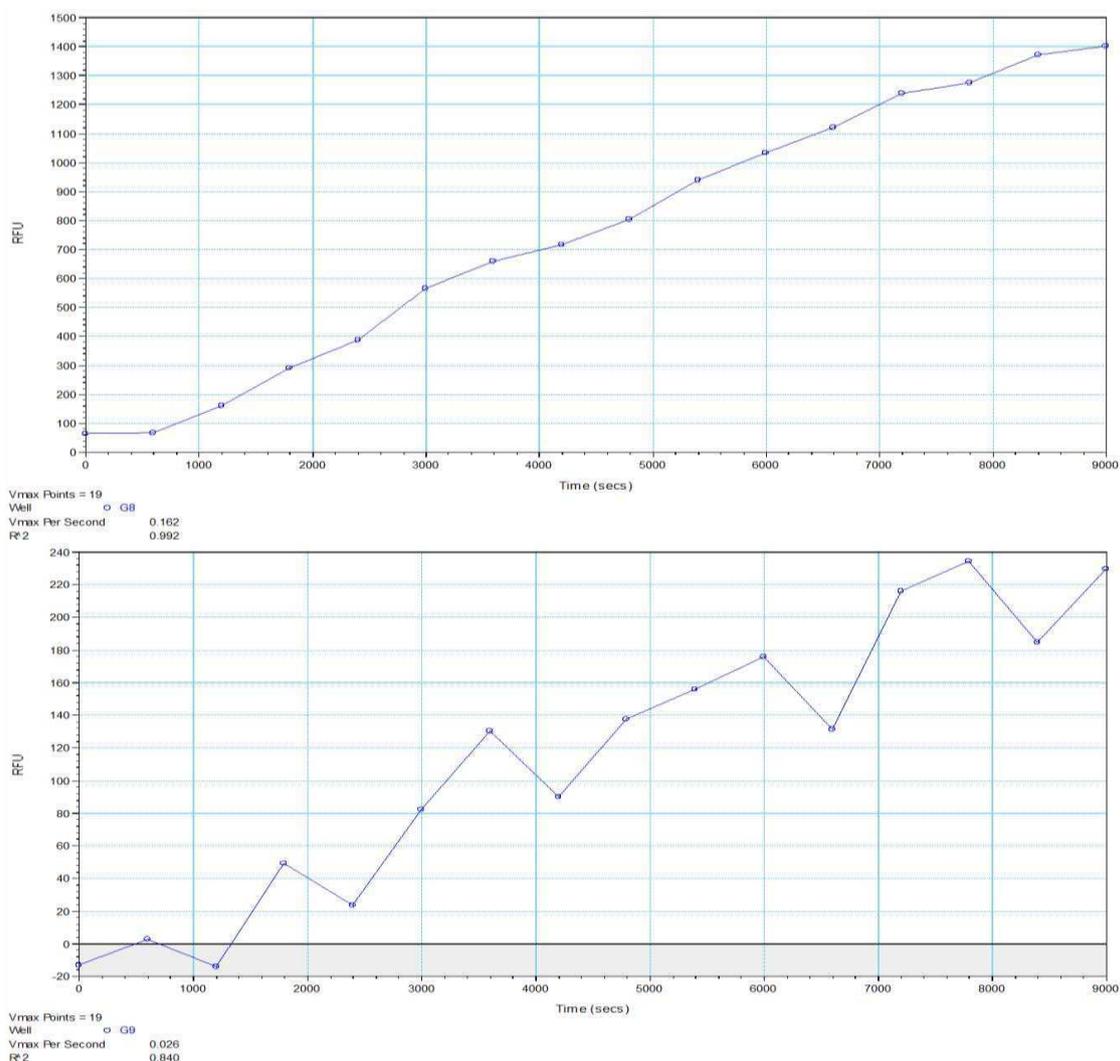
#### RESULTADOS (RFUs/min):

	1	2	3	4
A	NoFit	-0.060312	NoFit	0.185098
B	0.090778	NoFit	NoFit	0.279418
C	0.213644	NoFit	NoFit	0.434139
D	NoFit	NoFit	NoFit	0.04905
E	NoFit	NoFit	NoFit	NoFit
F	0.00398	NoFit	NoFit	NoFit
G	0.13413	NoFit	NoFit	NoFit
H	NoFit	NoFit	NoFit	0.035623

Como puede observarse, la mayoría de las muestras no mostraron reacción (“*No fit*”) o bien la pendiente de la recta RFU/s fue muy baja. Estos resultados llamaron la atención debido a que en tinciones histoquímicas previas con X-Glu se había observado claramente el precipitado azul característico de actividad de la enzima (Figura 2.2, Panel A2-4).

Por consiguiente, pensamos que agregar más enzima (es decir, mayor volumen de extracto) podría llevar a detectar mayores niveles de 4-MU producidos por la

misma. Si bien esto lleva a reducir la cantidad de buffer de reacción por debajo de los 140  $\mu\text{L}$ , estimamos que como el 4-MUG está usado en concentración 1 mM, la cual permite medir actividad enzimática de los controles positivos P35S:GUS (que llegan a valores de 10000 RFU antes de llegar al amesetamiento), de todos modos el reactivo estaría en exceso. Sobre todo, teniendo en cuenta que extractos de plantas de líneas 164 L56 (las que más expresan) llegan hasta 2500 RFU luego de las 2 horas de reacción, y se analizarían actividades enzimáticas de extractos de plantas de líneas 164 L50, de expresión intermedia. De modo que se procedió a realizar *pooles* de las muestras “Rojo” y “Azul”, por separado (las que habían mostrado mayor cantidad de muestras con actividad detectable), y a sembrar por un lado, 30  $\mu\text{L}$  de extracto + 30  $\mu\text{L}$  buffer de reacción sin 4-MUG + 140  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción con 4-MUG; y por el otro, 120  $\mu\text{L}$  de extracto + 80  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción con 4-MUG. Los resultados fueron:

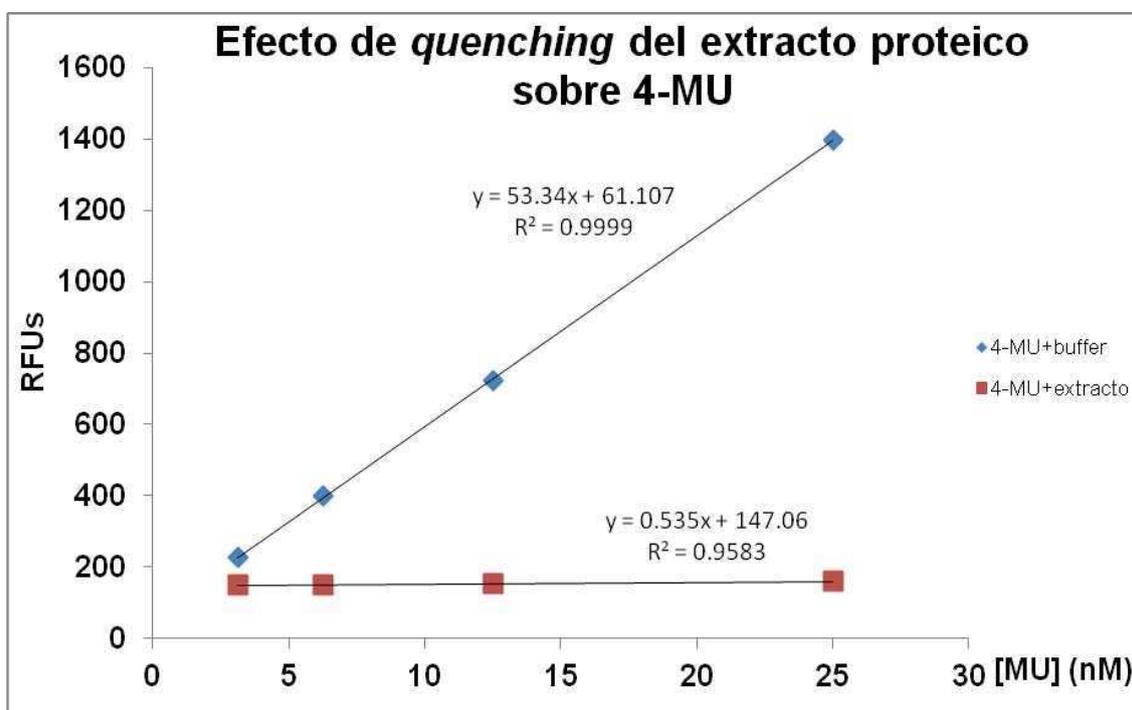


**Figura A1.** Resultados de ensayos fluorimétricos de diferentes volúmenes de extractos proteicos del conjunto de muestras de plantas bajo el tratamiento “Rojo”. Arriba, resultados obtenidos en el pocillo sembrado con 30  $\mu\text{L}$  de extracto + 30  $\mu\text{L}$  buffer de reacción sin 4-MUG + 140  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción con 4-MUG; abajo, 120  $\mu\text{L}$  de extracto + 80  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción con 4-MUG. El eje de las ordenadas indica la acumulación de producto mediante la acumulación de fluorescencia (RFUs) a través de las 2.5 h de duración del ensayo. Nótese la escala en cada caso. Similares resultados fueron obtenidos ensayando *pooles* de muestras de tratamiento “Azul” en la misma placa.

Estos resultados nos sorprendieron. Agregar 4 veces más enzima (gráfico inferior) produjo una reducción de cerca de 6 veces en la detección de fluorescencia (RFUs), resultado de la aparición del producto 4-MU. Además, se correlacionó con una pendiente de  $V_{m\acute{a}x}$  menor, y un ajuste a la linealidad con menor valor de  $R^2$ . La baja en la cantidad de reactivo 4-MUG, de 140  $\mu\text{L}$  (arriba) a 80  $\mu\text{L}$  (abajo) es de sólo un 40% y difícilmente explica este comportamiento, debido a que muestras de plantas P35S:GUS no agotan el sustrato durante las reacciones. Para explicar estos resultados, se propusieron dos hipótesis:

- 1) Hay un efecto inhibitorio sobre la enzima, proveniente de algún componente del extracto proteico, cuyo efecto se incrementa con el agregado de más extracto, de manera no lineal al concomitante aumento de la cantidad de enzima.
- 2) La señal fluorescente del producto es apagada (efecto de “*quenching*”) por algún componente del extracto proteico.

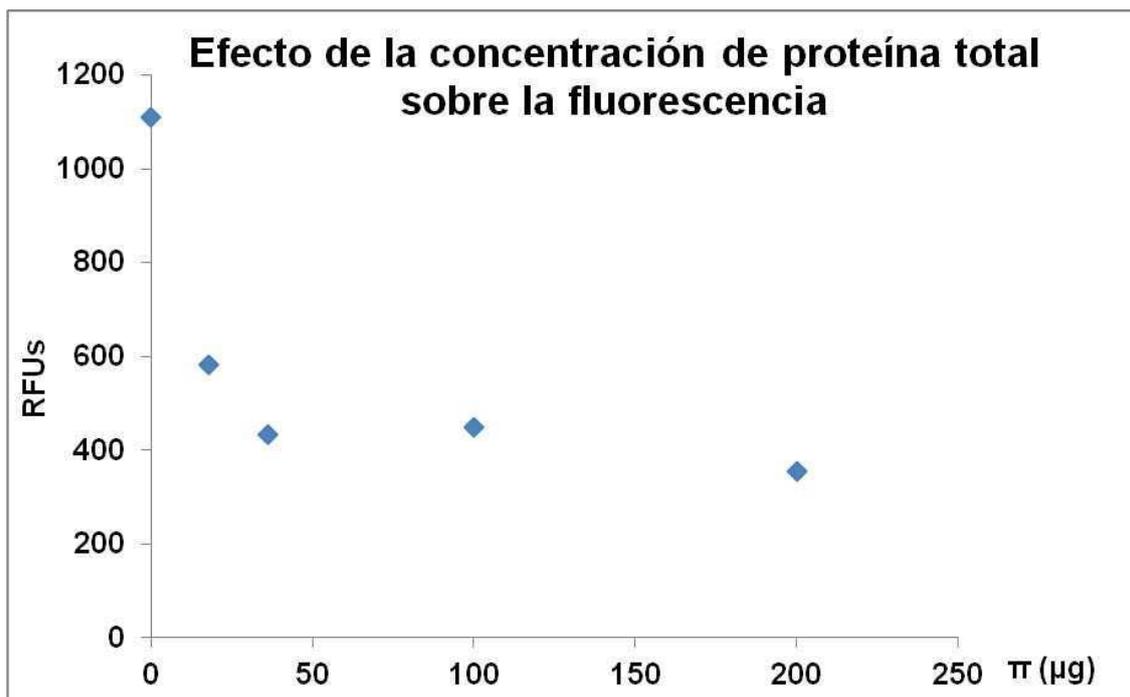
A continuación se estudió el efecto posible de *quenching* del extracto crudo de plantas de *Arabidopsis* sobre el 4-MU. Para ello, se preparó un experimento consistente en sembrar curvas estándar de 4-MU purificado diluidas tanto en buffer de extracción como, por otro lado, en extractos proteicos de *poles* de plantas transgénicas con diversos tratamientos, sin sustrato 4-MUG. Los resultados se resumen en la Figura A2:



**Figura A2.** El extracto proteico de *Arabidopsis* reduce la detección del producto 4-MU. Para cada punto de la curva, 120  $\mu\text{L}$  de buffer sólo o 120  $\mu\text{L}$  de extracto de plantas se adicionaron a 80  $\mu\text{L}$  de concentraciones variables de 4-MU diluido en el mismo buffer. Se indican las concentraciones finales para 4-MU en cada caso.

Puede observarse claramente que excepto para el punto de mayor dilución de 4-MU, la diferencia de fluorescencia detectada es muy amplia en las muestras con extracto respecto de las diluidas en buffer solo. A valores bajos de [MU], los valores de RFU en dilución con buffer solo o con extractos son bastante aproximados. Es decir, si bien no puede descartarse que en los ensayos de actividad  $\beta$ -glucuronidasa no esté jugando un rol la inhibición de la actividad enzimática, este experimento sin reactivo muestra que el apagamiento de la fluorescencia de 4-MU por parte del extracto proteico, por sí solo, puede ser de gran magnitud y llevar a enmascarar importantes diferencias en la generación de producto en ensayos. Por lo pronto, concluimos así que aumentar la cantidad de muestra en los pocillos podría no resolver el problema inicial de baja detección para muchas muestras.

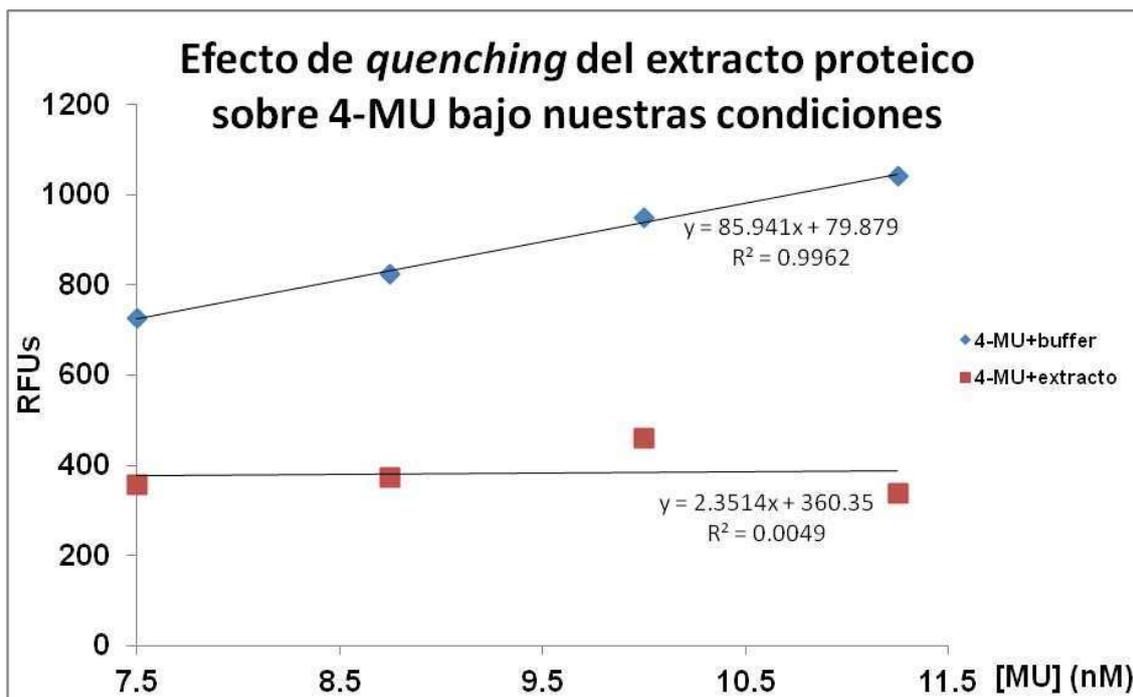
Se intentó conocer a continuación si este efecto, observado con grandes volúmenes de extracto proteico (120  $\mu$ L en un volumen final de pocillo siempre en 200  $\mu$ L) existía también en gran magnitud con 10-60  $\mu$ L de extracto más 190-140  $\mu$ L de buffer, y una concentración de proteína total en el extracto de alrededor de 50  $\mu$ g, que son las condiciones técnicas en las que realizamos este tipo de ensayos habitualmente. En un primer experimento en este sentido, se realizó una extracción de proteínas con el buffer indicado de tejido de plantas de las líneas de PmiR164a:GUS, de manera de obtener un sobrenadante muy concentrado. De esta manera, se procedió a diluir en varias concentraciones diferentes de proteína total, cada una de las cuales se usó para tomar una alícuota de 60  $\mu$ L. Se intentó de esta manera cubrir el rango posible de concentraciones proteicas totales utilizados en nuestros ensayos habitualmente, en un volumen de extracto también común en nuestros experimentos. Los 140  $\mu$ L restantes se completaron con buffer de extracción conteniendo 4-MU en concentración final 12.5 nM en los 200  $\mu$ L finales por pocillo. Esta concentración de 4-MU se eligió porque en el experimento de la Figura A2 se asoció a valores de RFU (muestras con 4-MU + buffer solo) que están dentro de la linealidad de detección, y de magnitud comparable con la detectada por la actividad enzimática de los extractos utilizados en nuestros ensayos (Figura A1, arriba). La cantidad de proteína total ensayada en cada pocillo fue de entre 18 y 200  $\mu$ g. Los resultados se ven en la Figura A3:



**Figura A3.** Mayores concentraciones del extracto proteico aumentan el efecto de *quenching*, a volumen constante. 60  $\mu\text{L}$  de un extracto proteico diluido a diferentes concentraciones de proteína total final se adicionaron a 140  $\mu\text{L}$  de buffer conteniendo una solución 12.5 nM de 4-MU. El punto correspondiente a 0 mg de proteína total corresponde a una solución de 60  $\mu\text{L}$  de buffer de extracción solo más 140  $\mu\text{L}$  de solución de 4-MU (blanco).

Se pueden sacar varias conclusiones a partir de los datos del gráfico. La primera, que el efecto de la concentración de proteína sobre el enmascaramiento de la fluorescencia existe, y es relevante en las condiciones que hasta el momento usábamos en nuestros ensayos (18-100  $\mu\text{g}$  de proteína total, 60  $\mu\text{L}$  de extracto y valores de RFU detectados de alrededor de 1000). Esto es muy importante, debido a que hasta el momento, sólo se procedía a sembrar una masa conocida de proteína total, medida antes de la fluorimetría mediante Bradford, y luego se procedía a escalar todo a valores supuestamente comparables relativizando. Estos resultados muestran que no es correcto proceder de este modo. En segundo lugar, la relación no es lineal. Hay una caída muy brusca de 0 a 18  $\mu\text{g}$  (cerca del 50%) y luego la caída es más suave entre 18 y 200  $\mu\text{g}$ .

A modo de resumen de lo que analizamos, repetimos el experimento de la Figura A2, para evaluar el efecto del extracto proteico sobre la fluorescencia detectada, pero esta vez en condiciones de concentración de proteína total y volumen de extracción más cercanas a las que usamos de manera rutinaria en los ensayos de actividad  $\beta$ -glucuronidasa en tiempo real. Asimismo, acotamos el rango de [MU], para chequear si estábamos en condiciones de detectar diferencias pequeñas en la generación de producto. Para ello, se tomó un extracto proteico y se sembró, por un lado, una curva con buffer sólo más 4-MU en concentraciones desde 7.5 a 11.25 nM, y por otro, 50  $\mu\text{g}$  de proteínas totales (en 20  $\mu\text{L}$  de extracto) más 180  $\mu\text{L}$  de buffer con la curva de 4-MU. Los resultados se ven en la Figura A4:



**Figura A4.** En nuestras condiciones, el extracto proteico de *Arabidopsis* reduce la detección del producto 4-MU y anula las diferencias de acumulación del producto observado. Se indican las concentraciones finales para 4-MU en cada caso.

Los resultados muestran que, en nuestras condiciones, si detectamos mediante fluorimetría un valor de RFU de 400, esto puede corresponder a la generación de entre 7.5 y 11.25 nM MU, es decir un margen de error del 66% por lo menos. Esto hace a dichas condiciones de ensayo inapropiadas e inexactas para detectar diferencias de actividad de  $\beta$ -glucuronidasa en tiempo real en experimentos en los que se deseen ver cambios en su acumulación como efecto de los tratamientos sobre el PmiR164a:GUS. Como consecuencia, nos replanteamos las condiciones del ensayo enzimático y nos dispusimos a optimizar el protocolo de manera de minimizar el efecto de *quenching*.

En primer lugar, observamos que mayores volúmenes de sembrado acentúan el efecto de enmascaramiento de la fluorescencia (Figura A1), que valores de concentración altos de proteína producen el mismo efecto y que al acercarse asintóticamente a 0  $\mu$ g de proteína total los valores de RFU parecen aumentar (Figura A3). La idea que surgió fue la de acercarse asintóticamente a 0  $\mu$ g, si es posible sin perder la actividad MUG, para intentar minimizar los efectos apreciables del *quenching*. Por consiguiente realizamos un ensayo consistente en sembrar muy poca masa de proteína total (entre 2 y 15  $\mu$ g) a diferentes concentraciones de 4-MU presentes en el buffer, para evaluar si el efecto de *quenching* se anulaba al sembrar muy poca masa y/o con la acumulación total del producto, y en qué medida. Los resultados se muestran en la Tabla A2:

**Tabla A2.** RFUs obtenidos al sembrar diferentes cantidades de proteína total del mismo extracto en pocillos con buffer con distintas concentraciones de 4-MU. En cada pocillo se sembraron menos de 4  $\mu$ L de extracto, se agregaron hasta 20  $\mu$ L con buffer sólo y se completó el volumen con 180  $\mu$ L de buffer con 4-MU en diferentes concentraciones. La fila de 0  $\mu$ g corresponde a una curva estándar sin extracto proteico.

	9 nM	18 nM	36 nM	72 nM
$\mu$ g prot total	RFU	RFU	RFU	RFU
0	956	1741	3166	6336
2	849	1555	2878	5579
5	798	1381	2541	4953
10	729	1229	2185	4088
15	691	1082	1842	3425

¿Cuál es la concentración de proteína que provoca menor apagamiento de la fluorescencia relativo? Y, ¿da lo mismo cualquier [MU] en el extracto para inducir dicho apagamiento? Estas preguntas se responden más fácilmente procesando los datos de la Tabla A2 para formar la Tabla A3:

**Tabla A3.** Porcentaje de conservación de la fluorescencia emitida (RFUs) de cada cantidad de proteína total sembrada y cada [MU] ensayada, respecto del control de curva estándar sin extracto proteico (0  $\mu$ g), con buffer con diferentes concentraciones de [MU]. El gradiente de color hacia el rojo indica mayor efecto de enmascaramiento.

		/ Conservación RFU X $\mu$ g/RFU 0 $\mu$ g			
Comparación de valores RFU entre:		9 nM	18 nM	36 nM	72 nM
2 $\mu$ g/0 $\mu$ g prot. total		89	89	91	88
5 $\mu$ g/0 $\mu$ g prot. total		83	79	80	78
10 $\mu$ g/0 $\mu$ g prot. total		76	71	69	65
15 $\mu$ g/0 $\mu$ g prot. total		72	62	58	54

Los valores de la Tabla A2 se analizan más fácilmente en la Figura A5:

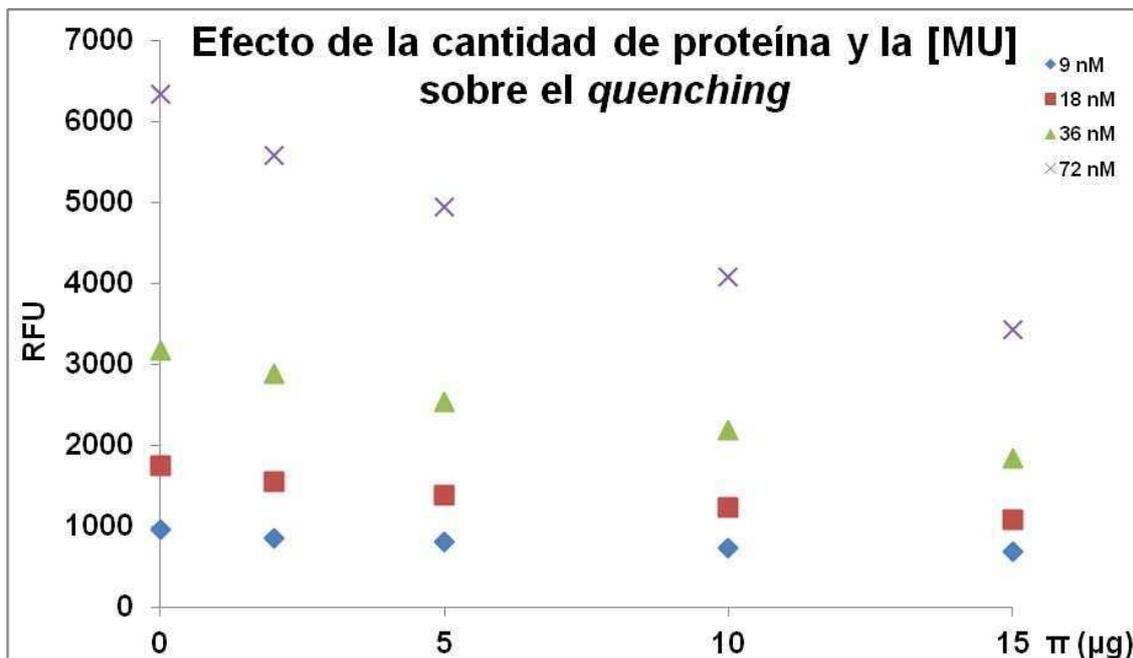


Figura A5. Representación de los valores de la Tabla A2.

A su vez, la Tabla A4 muestra el grado de enmascaramiento de la fluorescencia dependiendo de la concentración del extracto proteico sembrado y la de MU:

**Tabla A4.** Cantidad de fluorescencia detectada por unidad de concentración de MU (RFU/nM MU) para cada cantidad de proteína total sembrada y [MU] ensayada. Los porcentajes de RFU enmascarados entre [MU]= 72 nM y [MU]= 9 nM por las diferentes cantidades de proteína total se muestran en la última columna. El gradiente de color hacia el rojo indica mayor efecto de enmascaramiento.

µg prot total	9 nM	18 nM	36 nM	72 nM	/ Variación 72 nM/9 nM
	RFU/nM MU	RFU/nM MU	RFU/nM MU	RFU/nM MU	
2	94	86	80	77	18
5	89	77	71	69	22
10	81	68	61	57	30
15	77	60	51	48	38

Datos que se visualizan en la Figura A6:

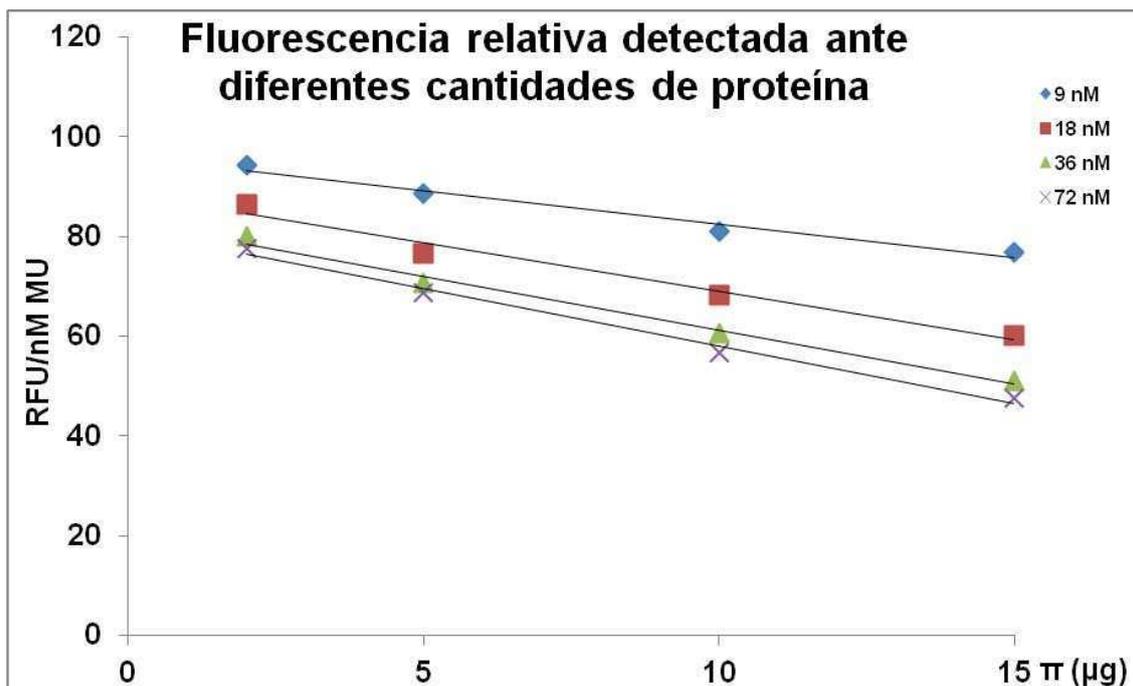
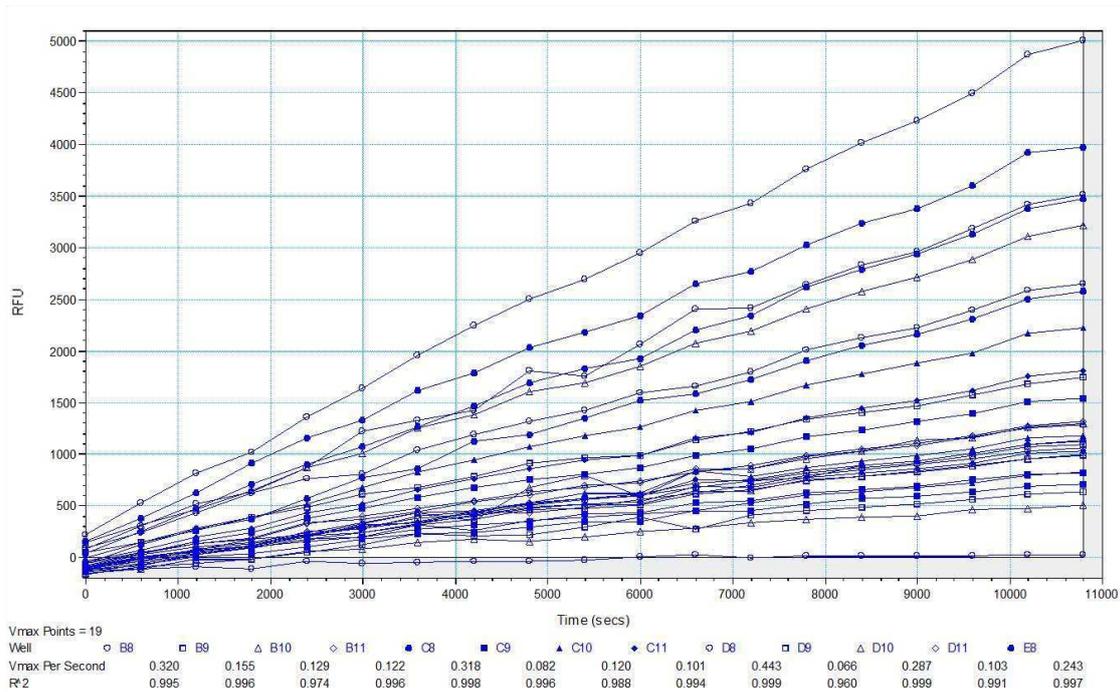


Figura A6. Representación de los valores de la Tabla A4.

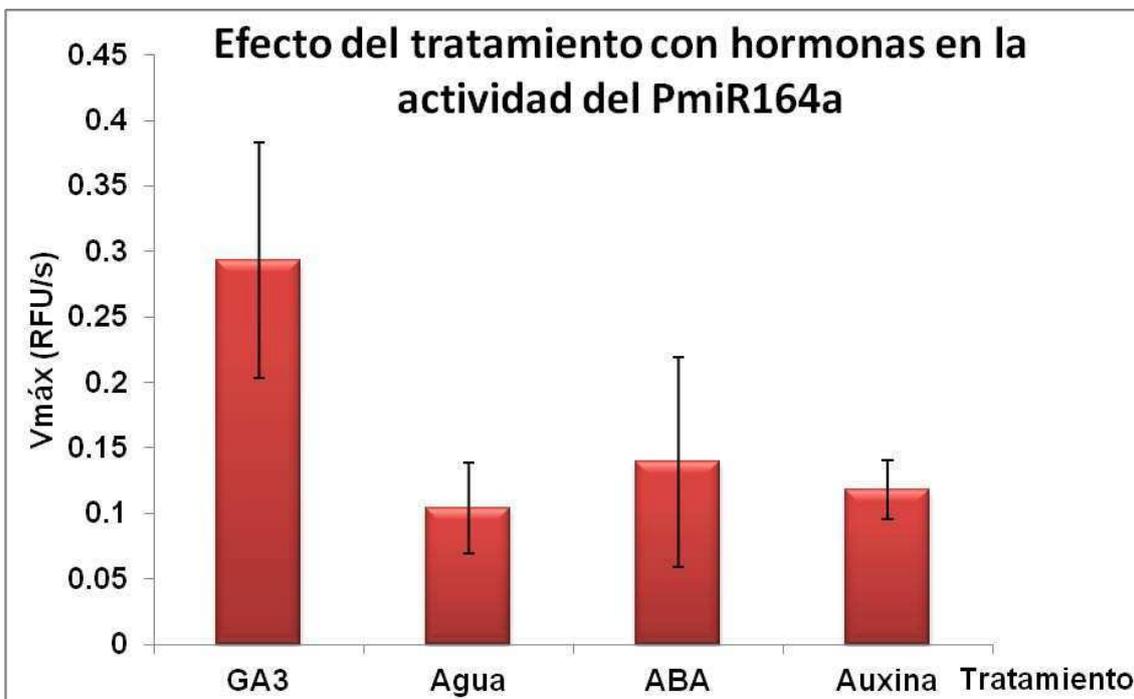
Hay algunos puntos interesantes a resaltar a partir de estas Tablas y sus Figuras. Primero, que para cualquier concentración de [MU] analizada el mayor valor de RFU corresponde a la menor masa sembrada (2 μg) (Tabla A2). Segundo, los valores de RFU observados son bastante altos, incluso para la siembra de sólo 2 μg (cerca de 800 RFU) con la mayor dilución (9 nM). Esto nos permite trabajar cerca del límite teórico de detección del aparato (3 nM). Tercero, el efecto de acercamiento asintótico a los máximos valores de RFU posibles (los respectivos a la curva de calibración, sin extracto) es verdadero (Figura A5), y a 2 μg de proteína total, el efecto del quenching afecta a sólo un 10% del RFU medido para todo el rango de [MU] analizadas (Tabla A3). Cuarto, a mayor [MU], mayor es el efecto de enmascaramiento para los extractos, sobre todo aquellos que poseen más de 5 μg de proteína total (Tabla A4 y Figura A6). Con todos estos datos, volvimos a nuestras plantas PmiR164a:GUS. Estimamos que si podíamos obtener datos a partir de la línea que menos expresa la enzima (la 164 L35, según lo visto por histoquímica), el protocolo estaría puesto a punto.

Procedimos a extraer lo más concentrado posible las muestras de plantas bajo diferentes tratamientos con hormonas (GA3, ABA, IAA) y controles (agua). Mediante un Bradford comprobamos la alta concentración de proteínas en los mismos y se sembraron menos de 5 μL de extracto en cada pocillo, para obtener en cada uno una masa de proteína total de 5 μg. El resultado se detalla en la Figura A7:



**Figura A7.** Resultados de ensayos fluorimétricos de muestras extraídas de plantas 164 L35 tratadas con diferentes hormonas o agua (control) con el protocolo nuevo. Nótese la mayor pendiente de  $V_{m\acute{a}x}$  comparada con la Figura A1, un ajuste a la linealidad con elevado valor de  $R^2$  y los valores de RFU finales de entre 500 y 5000 para casi todas las muestras. Sólo algunas muestras se exhiben, para mayor claridad.

A partir de lo cual se obtuvo la Figura A8:



**Figura A8.** GA3 induce la actividad del PmiR164a en la línea 164 L35. Se muestra sólo un experimento de los varios que originaron la Figura 2.6 correspondiente al Capítulo 2 de esta Tesis.

## Discusión

Mediante el análisis de diferentes volúmenes de extracto utilizado, concentraciones de 4-MU y de proteína total o combinaciones de estos factores, se lograron en gran medida los objetivos planteados al desarrollar un nuevo protocolo. Se encontró que el extracto proteico de *Arabidopsis* por sí solo es capaz de enmascarar la fluorescencia del producto 4-MU (Figura A2), de manera no lineal respecto de la concentración de proteína total (Figura A3) ni de la [MU] (Figura A4) ni de una combinación de ambas (Figuras A5 y A6). Al utilizar una dilución alta de las muestras se lograron obtener valores de actividad enzimática adecuados para el análisis de la actividad relativa del PmiR164a ante el tratamiento con hormonas (Figuras A7 y A8), obteniendo un protocolo mejorado.

Sin embargo, en el presente trabajo no se probó la hipótesis planteada acerca del posible efecto de la presencia de inhibidores que pudieran estar afectando la actividad enzimática, como causa posible de la baja fluorescencia detectada en los experimentos de las Figuras A1 y A2. Dicho análisis requeriría de materiales específicos (tales como enzima GUS purificada de *E.coli*) y conocimientos específicos de bioquímica y enzimología que van más allá del propósito de este trabajo. Por otro lado, aún cuando hubiera un aporte de inhibidores en el extracto proteico que explicara parte del descenso en la actividad enzimática detectada, los resultados de los experimentos llevados a cabo sólo con el producto 4-MU y no con la enzima (ver Figura A2) demuestran que el efecto del *quenching* es importante y puede explicar una parte del efecto observado. Más aún, se pudo (al menos parcialmente) corregir el problema efectuando altas diluciones. Así, se pudieron medir actividades enzimáticas en muestras de la línea que menos expresa el transgén, y detectarse diferencias entre tratamientos (Figura A8). La extracción muy concentrada y la alta dilución utilizada permiten sembrar típicamente alrededor de 2  $\mu$ L (correspondientes a 5  $\mu$ g de proteínas totales) para cada muestra. Esto permite homogeneizar el “ruido” que pudiera provenir de sustancias inhibitoras, tendiendo a igualarlas entre las muestras y tratamientos y minimizando el sesgo, a la vez que permite evitar en gran medida el problema de *quenching*. Esto es particularmente relevante al considerar que no buscamos en el presente trabajo encontrar los niveles absolutos de actividad del PmiR164a, sino su actividad relativa ante tratamientos, respecto de un control.

Después de publicar el trabajo en el cual se utilizó esta técnica [292] y que forma parte del Capítulo 2 de la presente Tesis, se publicaron dos trabajos que abordan la problemática tanto de *quenching* sobre 4-MU como del efecto inhibitor sobre la  $\beta$ -glucuronidasa de *E.coli* del extracto soluble de *Arabidopsis* y otras plantas [296-297]. Acerca del problema del *quenching*, los autores recomiendan efectuar una corrección para expresar los resultados en nM MU producidos. Como en nuestro trabajo, como se mencionó, nos alcanza con referir el efecto sobre el PmiR164a en un tratamiento respecto del control, y no expresar actividad absoluta en nM MU, este trabajo ([296]) nos fue útil para confirmar la existencia del efecto de *quenching* que habíamos postulado. En [297], los autores abordan de lleno el efecto de inhibición del extracto de *Arabidopsis* sobre la enzima y revelan las características principales de las moléculas inhibitoras. Hallan que las mismas poseen un peso molecular de menos de

10 kDa, que probablemente corresponde a moléculas grandes no proteicas, como compuestos fenólicos, y los ensayos enzimáticos demuestran inhibición competitiva reversible como mecanismo de acción. Esto significa, explican los autores, que la capacidad inhibitoria del extracto disminuye con la dilución. Esta solución práctica fue la que encontramos en nuestro trabajo también. Además, los autores afirman que los ensayos de GUS más susceptibles de mostrar efectos de la inhibición apreciables son aquellos que usan promotores débiles (cierto sobre todo para nuestras líneas de L35 y L50) o activos en sólo partes de tejido específicas (cierto para todas nuestras líneas transgénicas excepto P35S), los cuales difícilmente pueden ser diluidos sin perder capacidad de medición. La extracción muy concentrada nos permitió efectuar diluciones muy altas (cerca de 1:100) y diluir a la vez los factores que enmascaran la fluorescencia y los inhibidores.

Las soluciones propuestas en [297] están también en línea con las que hallamos en el presente trabajo. Entre ellas, en primer lugar realizar pruebas fluorimétricas para medir la velocidad enzimática a diferentes diluciones del extracto, para verificar la proporcionalidad entre el factor de dilución empleado y las velocidades de reacción obtenidas. Una actividad enzimática mayor a lo esperada, observada en el extracto menos concentrado, indica claramente la presencia de inhibidores que interfieren con la medición. En nuestras manos, este resultado fue visto en el experimento de la Figura A1.

## Conclusiones

Tanto el efecto de enmascaramiento (“*quenching*”) del producto 4-MU como la inhibición de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa están presentes en los extractos proteicos de *Arabidopsis* utilizados. Si bien la modificación del protocolo se realizó atendiendo al efecto de *quenching* solamente, ambos efectos fueron reducidos en gran medida mediante dicha modificación. La solución práctica encontrada coincide con recomendaciones al respecto de reportes técnicos específicos publicados poco después de realizados nuestros ensayos. El desarrollo de un protocolo modificado fue lo que nos permitió realizar ensayos fluorimétricos en tiempo real de GUS que constituyeron el núcleo de los resultados y conclusiones más relevantes de nuestra publicación [292].

### **Protocolo modificado para ensayo fluorimétrico de actividad $\beta$ -glucuronidasa (GUS) en *Arabidopsis*:**

#### **EXTRACCIÓN:**

- 1) Tomar la muestra del tejido de interés, o machacado de planta entera, en eppendorf de 2 mL. Pesar la muestra. Colocar 2 bolitas de carburo de tungsteno en el tubo. En caso de varias muestras, intentar colocar similar masa en c/tubo.
- 2) Congelar en N<sub>2</sub> líquido.
- 3) Inmediatamente después de sacar las muestras del N<sub>2</sub> líquido, para aprovechar el estado quebradizo de la muestra, romper el tejido en TISSUE LYSER (Qiagen),

- 1 minuto a 20 Hz para poca muestra (0.1 – 0.2 gramos), o 2 minutos a 20 Hz en caso de mayor masa.
- 4) Se extrae lo más concentrado posible. Poner, en caso de tener cerca de 0.1 g de muestra, 20  $\mu$ L buffer extracción GUS con  $\beta$ -Mercaptoetanol 10 mM. En caso de tener unos 0.3 g muestra, 30  $\mu$ L de buffer de extracción con  $\beta$ -Mercaptoetanol 10 mM.
  - 5) 1 minuto en TISSUE LYSER a 20 Hz.
  - 6) Poner muestras en hielo.
  - 7) Centrifugar a 11000 rpm por 20 minutos, a 4  $^{\circ}$ C (las muestras deben estar frescas pero no congeladas, caso contrario la centrifugación rompe los tubos por las bolitas).
  - 8) Pasar a tubos de 1.5 mL los sobrenadantes, para evitar posteriores centrifugaciones por resuspensión.

#### **BRADFORD:**

- 9) Si la extracción fue concentrada como debería, con sólo 1  $\mu$ L de muestra alcanza; hacer cada punto por duplicado. Curva de BSA, diluida en buffer GUS con  $\beta$ -Mercaptoetanol 10 mM (10  $\mu$ L de cada dilución, de 0.5 a 0.05  $\mu$ g/ $\mu$ L de BSA). Blanco: 1  $\mu$ L de buffer GUS con  $\beta$ -Mercaptoetanol 10 mM.
- 10) Se debería conseguir una concentración de proteína total de al menos 2  $\mu$ g/ $\mu$ L. Esto permite sembrar como máximo 2.5  $\mu$ L para la fluorimetría, en cada pocillo, y tener 5  $\mu$ g proteína total.

#### **FLUORIMETRÍA:**

- 11) Encender el SpectraMax<sup>®</sup> GEMINI EM, programar T a 37  $^{\circ}$ C y dejar calentando.
- 12) En placa opaca de 96 pocillos se siembran las muestras, que como máximo necesitan 2.5  $\mu$ L para llegar a 5  $\mu$ g de proteína total. La siembra se realiza manteniendo la placa sobre hielo, para evitar degradación de la muestra. No hace falta sembrar por duplicado.
- 13) Curva: en caso de no tener muestras que posean GUS bajo el promotor 35 S, los puntos son (en nM de MU): 500, 100, 50, 25 y 12.5. Con 35 S, tomar también MU 1  $\mu$ M (1000 nM). Por duplicado.
- 14) Blancos: 2.5  $\mu$ L de buffer GUS con  $\beta$ -Mercaptoetanol 10 mM. Por duplicado.
- 15) En pocillos con blancos y muestras, poner 195-200  $\mu$ L de buffer de reacción, que contiene 1 mM de MUG en buffer de extracción GUS con  $\beta$ -Mercaptoetanol 10 mM. **TAPAR INMEDIATAMENTE DE LA LUZ CON ALUMINIO.**
- 16) Poner la placa en el espectrofluorímetro ya calentado; esperar a medir cuando no haya burbujas en los pocillos (interfieren con la medición).
- 17) Primera medición, ENDPOINT, seleccionando la curva y los blancos.
- 18) Segunda medición, CINÉTICA, seleccionando las muestras y los blancos.
- 19) Para muestras no 35 S, se puede dejar 3 h midiendo, con intervalos de 10 min., y agitación de 5 seg de la placa antes de cada medición. EXCITACIÓN: 365 nm; EMISIÓN: 455 nm.

## APÉNDICE B. ACUMULACIÓN RELATIVA DE METABOLITOS DE TABACO ANTE INFECCIÓN CON TMV

Tabla B1. Acumulación relativa de metabolitos primarios y secundarios de tabaco ante infección por TMV.

METABOLITO	1 dpi				5 dpi				detectado por
	MOCK		TMV		MOCK		TMV		
	Prom	SE	Prom	SE	Prom	SE	Prom	SE	
2-oxoglutarate	1	± 0.28	1.35	± 0.19	1	± 0.18	0.77	± 0.19	GC-MS
2-oxogulonate	1	± 0.17	1.38	± 0.15	1	± 0.09	0.85	± 0.10	GC-MS
4-hydroxybutyrate	1	± 0.10	1.21	± 0.16	1	± 0.16	0.86	± 0.13	GC-MS
4-hydroxycinnamate	1	± 0.06	1.26	± 0.18	1	± 0.12	0.95	± 0.08	GC-MS
Adenine	1	± 0.22	1.86	± 0.27	1	± 0.09	0.86	± 0.12	GC-MS
Alanine	1	± 0.25	1.04	± 0.28	1	± 0.33	0.87	± 0.25	GC-MS
Asparagine	1	± 0.18	1.41	± 0.20	1	± 0.26	0.74	± 0.11	GC-MS
Benzoate	1	± 0.10	1.52	± 0.13	1	± 0.10	1.00	± 0.15	GC-MS
Beta-alanine	1	± 0.10	1.01	± 0.12	1	± 0.09	1.12	± 0.06	GC-MS
Caffeate	1	± 0.19	1.29	± 0.10	1	± 0.17	0.93	± 0.14	GC-MS
Cellobiose	1	± 0.20	N/D	± N/D	1	± 0.26	N/D	± N/D	GC-MS
Chrologenate related 1	1	± 0.05	1.04	± 0.04	1	± 0.05	1.02	± 0.09	LC-MS
Chrologenate related 2	1	± 0.05	0.99	± 0.06	1	± 0.05	1.04	± 0.06	LC-MS
Chrologenate related 3	1	± 0.06	0.98	± 0.07	1	± 0.04	0.90	± 0.08	LC-MS
CGA (Cafferoyl-4-quinat)	1	± 0.03	0.92	± 0.06	1	± 0.06	1.25	± 0.07	LC-MS
CGA (putative caffeyol-3-quinat)	1	± 0.07	1.14	± 0.12	1	± 0.09	0.84	± 0.05	LC-MS
CGA (putative caffeyol-5-quinat)	1	± 0.04	0.91	± 0.14	1	± 0.13	1.21	± 0.11	LC-MS
Chrologenate related 4	1	± 0.04	1.04	± 0.04	1	± 0.08	0.73	± 0.04	LC-MS
Coumaroly-4-quinat	1	± 0.02	1.02	± 0.02	1	± 0.02	1.00	± 0.03	LC-MS
Citrate	1	± 0.19	0.95	± 0.28	1	± 0.14	1.50	± 0.46	GC-MS
Dehydroascorbate	1	± 0.46	1.80	± 0.50	1	± 0.17	0.67	± 0.26	GC-MS
Fructose	1	± 0.11	1.23	± 0.09	1	± 0.10	0.94	± 0.08	GC-MS
Fructose-6-phosphate	1	± 0.50	1.07	± 0.31	1	± 0.17	1.36	± 0.23	GC-MS
Fumarate	1	± 0.16	1.01	± 0.17	1	± 0.14	0.92	± 0.09	GC-MS
GABA	1	± 0.12	1.54	± 0.13	1	± 0.09	0.95	± 0.05	GC-MS
Glucarate	1	± 0.10	1.17	± 0.07	1	± 0.09	0.75	± 0.09	GC-MS
Glucose	1	± 0.06	1.04	± 0.10	1	± 0.12	1.06	± 0.07	GC-MS
Glucose-6-phosphate	1	± 0.46	0.78	± 0.16	1	± 0.22	1.24	± 0.32	GC-MS
Glutamate	1	± 0.06	0.94	± 0.12	1	± 0.20	0.94	± 0.17	GC-MS
Glutamine	1	± 0.24	1.54	± 0.46	1	± 0.28	1.19	± 0.23	GC-MS
Glutarate	1	± 0.12	0.73	± 0.07	1	± 0.21	1.07	± N/D	GC-MS
Glycerate	1	± 0.12	1.23	± 0.07	1	± 0.19	0.63	± 0.08	GC-MS
Glycerol	1	± 0.39	0.97	± 0.19	1	± 0.19	1.36	± 0.26	GC-MS
Glycine	1	± 0.14	1.04	± 0.13	1	± 0.14	0.87	± 0.06	GC-MS
Glycolate	1	± 0.10	1.00	± 0.08	1	± 0.07	0.96	± 0.16	GC-MS
Gulonate	1	± 0.16	1.41	± 0.14	1	± 0.09	0.73	± 0.07	GC-MS
Isocitrate	1	± 0.07	1.33	± 0.06	1	± 0.10	0.77	± 0.06	GC-MS
Kaempferol-3Glc-6"Rha	1	± 0.07	0.97	± 0.07	1	± 0.05	1.12	± 0.11	LC-MS
Kaempferol-glycoside 1 (593m/z)	1	± 0.05	0.99	± 0.05	1	± 0.07	1.74	± 0.18	LC-MS
Kaempferol-glycoside 2 (593m/z)	N/D	± N/D	N/D	± N/D	N/D	± N/D	N/D	± N/D	LC-MS
Lactate	1	± 0.47	1.51	± 0.62	1	± 0.28	0.67	± 0.07	GC-MS
Lactulose	1	± 0.16	0.82	± 0.09	1	± 0.18	0.95	± 0.17	GC-MS
Lysine	1	± 0.11	1.41	± 0.20	1	± 0.07	0.87	± 0.11	GC-MS
Malate	1	± 0.08	1.38	± 0.16	1	± 0.06	1.08	± 0.10	GC-MS
Maleate	1	± 0.16	1.15	± 0.15	1	± 0.09	0.90	± 0.06	GC-MS
Malonate	1	± 0.12	1.21	± 0.21	1	± 0.13	0.84	± 0.09	GC-MS
Maltose	1	± 0.17	1.10	± 0.20	1	± 0.13	0.72	± 0.15	GC-MS
Mannose	1	± 0.10	1.99	± 0.46	1	± 0.13	0.94	± 0.23	GC-MS
Methionine	1	± 0.16	1.40	± 0.08	1	± 0.11	1.03	± 0.23	GC-MS
Myo-inositol	1	± 0.08	1.27	± 0.09	1	± 0.06	0.90	± 0.07	GC-MS
Myristate	1	± 0.07	1.54	± 0.18	1	± 0.05	1.00	± 0.08	GC-MS
Nicotinate	1	± 0.14	1.26	± 0.12	1	± 0.07	0.90	± 0.10	GC-MS
Palmitate	1	± 0.08	1.63	± 0.22	1	± 0.07	0.98	± 0.08	GC-MS
Pelargonate	1	± 0.16	1.38	± 0.10	1	± 0.08	1.20	± 0.22	GC-MS
Phenylalanine	1	± 0.10	1.20	± 0.15	1	± 0.07	0.99	± 0.09	GC-MS
Phosphorate	1	± 0.16	1.54	± 0.26	1	± 0.15	1.28	± 0.13	GC-MS
Proline	1	± 0.17	1.28	± 0.18	1	± 0.32	0.83	± 0.20	GC-MS
Putrescine	1	± 0.14	1.06	± 0.16	1	± 0.21	0.77	± 0.19	GC-MS
Pyruvate	1	± 0.36	1.85	± 0.19	1	± 0.18	0.55	± 0.13	GC-MS
Quercetin-3Glc	1	± 0.05	0.89	± 0.05	1	± 0.03	0.90	± 0.06	LC-MS
Raffinose	N/D	± N/D	N/D	± N/D	N/D	± N/D	N/D	± N/D	GC-MS
Rhamnose	1	± 0.08	1.28	± 0.08	1	± 0.10	0.92	± 0.07	GC-MS
Ribose	1	± 0.07	1.39	± 0.11	1	± 0.10	0.78	± 0.08	GC-MS
Quercetin-3Glc-6"Rha (Rutin)	1	± 0.07	0.97	± 0.07	1	± 0.06	0.74	± 0.12	LC-MS

Saccharopine	1	± 0.15	1.19	± 0.19	1	± 0.13	0.80	± 0.17	GC-MS
Serine	1	± 0.09	1.14	± 0.11	1	± 0.12	0.80	± 0.09	GC-MS
Sorbose	1	± 0.08	1.39	± 0.15	1	± 0.07	1.00	± 0.08	GC-MS
Squalene	1	± 0.16	7.58	± 4.81	1	± 0.14	1.03	± 0.17	GC-MS
Stearate	1	± 0.09	1.44	± 0.11	1	± 0.06	1.00	± 0.10	GC-MS
Succinate	1	± 0.23	0.87	± 0.24	1	± 0.16	1.20	± 0.26	GC-MS
Sucrose	1	± 0.06	1.06	± 0.04	1	± 0.07	1.01	± 0.07	GC-MS
Tagatose	1	± 0.15	1.34	± 0.13	1	± 0.14	1.09	± 0.15	GC-MS
Threitol	1	± 0.14	1.54	± 0.12	1	± 0.08	0.82	± 0.10	GC-MS
Threonate	1	± 0.07	1.31	± 0.12	1	± 0.05	1.04	± 0.10	GC-MS
Threonine	1	± 0.06	1.24	± 0.11	1	± 0.09	0.91	± 0.10	GC-MS
Trehalose	1	± 0.11	1.07	± 0.14	1	± 0.05	0.74	± 0.09	GC-MS
Tyrosine	1	± 0.10	1.43	± 0.20	1	± 0.06	0.88	± 0.08	GC-MS
Nicotianoside tetra-glycoside 1	1	± 0.16	0.86	± 0.08	1	± 0.10	1.25	± 0.15	LC-MS
Nicotianoside tetra-glycoside 2	1	± 0.07	1.29	± 0.08	1	± 0.15	1.03	± 0.12	LC-MS
Nicotianoside tetra-glycoside 3	1	± 0.18	1.26	± 0.10	1	± 0.21	1.34	± 0.19	LC-MS
Nicotianoside tetra-glycoside 4	1	± 0.09	1.25	± 0.17	1	± 0.12	0.85	± 0.07	LC-MS
Nicotianoside tetra-glycoside 5	1	± 0.14	0.83	± 0.10	1	± 0.15	0.85	± 0.12	LC-MS
Nicotianoside tetra-glycoside 6	1	± 0.13	1.35	± 0.06	1	± 0.17	1.05	± 0.13	LC-MS
CGA-related (353 m/z)	1	± 0.02	0.92	± 0.03	1	± 0.03	1.05	± 0.05	LC-MS
CGA-related (715 m/z)	1	± 0.01	0.92	± 0.04	1	± 0.03	0.99	± 0.04	LC-MS
Nicotianoside di-glycoside 1	1	± 0.15	1.54	± 0.13	1	± 0.13	1.32	± 0.20	LC-MS
Nicotianoside di-glycoside 2	1	± 0.05	1.33	± 0.06	1	± 0.07	1.27	± 0.18	LC-MS
Nicotianoside tri-glycoside 1	1	± 0.13	1.28	± 0.08	1	± 0.11	1.26	± 0.15	LC-MS
Nicotianoside tri-glycoside 2	1	± 0.06	1.06	± 0.05	1	± 0.07	1.05	± 0.13	LC-MS
Nicotianoside tri-glycoside 3	1	± 0.11	1.23	± 0.08	1	± 0.17	1.16	± 0.14	LC-MS
Nicotianoside tri-glycoside 4	1	± 0.09	1.29	± 0.12	1	± 0.08	1.04	± 0.10	LC-MS
Nicotianoside tri-glycoside 5	N/D	± N/D	N/D	± N/D	N/D	± N/D	N/D	± N/D	LC-MS
Nicotianoside tri-glycoside 6	1	± 0.17	1.23	± 0.11	1	± 0.13	1.52	± 0.19	LC-MS
unknown	1	± 0.08	1.05	± 0.11	1	± 0.09	0.89	± 0.08	LC-MS
Valine	1	± 0.05	1.26	± 0.15	1	± 0.08	0.89	± 0.07	GC-MS

METABOLITO	8 dpi				15 dpi				detectad por
	MOCK		TMV		MOCK		TMV		
	Prom	SE	Prom	SE	Prom	SE	Prom	SE	
2-oxoglutarate	1	± 0.26	1.33	± 0.31	1	± 0.24	1.49	± 0.26	GC-MS
2-oxogulonate	1	± 0.16	1.19	± 0.11	1	± 0.19	0.68	± 0.20	GC-MS
4-hydroxybutyrate	1	± 0.15	0.58	± 0.11	1	± 0.21	0.73	± 0.11	GC-MS
4-hydroxycinnamate	1	± 0.05	1.22	± 0.02	1	± 0.16	1.17	± 0.41	GC-MS
Adenine	1	± 0.07	1.45	± 0.04	1	± 0.32	0.58	± 0.15	GC-MS
Alanine	1	± 0.23	1.00	± 0.20	1	± 0.31	0.60	± 0.06	GC-MS
Asparagine	1	± 0.16	1.19	± 0.27	1	± 0.14	0.89	± N/D	GC-MS
Benzoate	1	± 0.42	0.95	± 0.03	1	± 0.23	0.94	± 0.10	GC-MS
Beta-alanine	1	± 0.15	1.02	± 0.15	1	± 0.26	0.52	± 0.12	GC-MS
Caffeate	1	± 0.45	0.69	± 0.12	1	± 0.22	0.90	± 0.12	GC-MS
Cellobiose	1	± 0.18	0.75	± 0.17	1	± 0.24	5.84	± 1.30	GC-MS
Chrologenate related 1	1	± 0.11	1.02	± 0.06	1	± 0.07	1.17	± 0.08	LC-MS
Chrologenate related 2	1	± 0.03	1.08	± 0.08	1	± 0.06	1.07	± 0.07	LC-MS
Chrologenate related 3	1	± 0.04	1.16	± 0.07	1	± 0.05	1.14	± 0.07	LC-MS
CGA (Caffeoyl-4-quinat)	1	± 0.08	1.20	± 0.03	1	± 0.07	1.35	± 0.09	LC-MS
CGA (putative caffeoyl-3-quinat)	1	± 0.11	0.92	± 0.04	1	± 0.12	1.33	± 0.07	LC-MS
CGA (putative caffeoyl-5-quinat)	1	± 0.69	2.57	± 0.44	1	± 0.06	1.22	± 0.03	LC-MS
Chrologenate related 4	1	± 0.07	1.03	± 0.05	1	± 0.08	1.16	± 0.06	LC-MS
Coumaroyl-4-quinat	1	± 0.02	1.07	± 0.03	1	± 0.05	0.93	± 0.03	LC-MS
Citrate	1	± 0.17	0.93	± 0.18	1	± 0.27	1.45	± 0.39	GC-MS
Dehydroascorbate	1	± 0.44	0.81	± 0.13	1	± 0.20	1.09	± 0.17	GC-MS
Fructose	1	± 0.08	1.20	± 0.21	1	± 0.05	0.75	± 0.07	GC-MS
Fructose-6-phosphate	1	± 0.19	1.26	± 0.24	1	± 0.35	2.04	± 0.47	GC-MS
Fumarate	1	± 0.25	0.62	± 0.08	1	± 0.16	0.90	± 0.17	GC-MS
GABA	1	± 0.13	1.10	± 0.12	1	± 0.13	0.56	± 0.10	GC-MS
Glucarate	1	± 0.18	0.90	± 0.08	1	± 0.09	0.94	± 0.11	GC-MS
Glucose	1	± 0.15	1.13	± 0.20	1	± 0.03	0.77	± 0.10	GC-MS
Glucose-6-phosphate	1	± 0.17	1.41	± 0.37	1	± 0.34	1.60	± 0.42	GC-MS
Glutamate	1	± 0.20	1.04	± 0.11	1	± 0.18	0.52	± 0.05	GC-MS
Glutamine	1	± 0.38	1.01	± 0.29	1	± 0.43	0.20	± 0.04	GC-MS
Glutarate	1	± N/D	0.60	± N/D	N/D	± N/D	N/D	± N/D	GC-MS
Glycerate	1	± 0.17	0.74	± 0.09	1	± 0.14	0.51	± 0.11	GC-MS

Glycerol	1	± 0.40	1.21 ± 0.06	1	± 0.41	1.91 ± 0.22	GC-MS
Glycine	1	± 0.10	0.92 ± 0.11	1	± 0.12	0.58 ± 0.07	GC-MS
Glycolate	1	± 0.10	0.85 ± 0.09	1	± 0.17	1.64 ± 0.38	GC-MS
Gulonate	1	± 0.15	1.28 ± 0.14	1	± 0.14	0.79 ± 0.20	GC-MS
Isocitrate	1	± 0.19	1.40 ± 0.11	1	± 0.15	0.79 ± 0.19	GC-MS
Kaempferol-3Glc-6"Rha	1	± 0.11	1.46 ± 0.13	1	± 0.05	1.29 ± 0.10	LC-MS
Kaempferol-glycoside 1 (593m/z)	1	± 0.06	0.97 ± 0.07	1	± 0.05	1.17 ± 0.09	LC-MS
Kaempferol-glycoside 2 (593m/z)	1	± 0.23	1.09 ± 0.26	1	± 0.04	1.27 ± 0.15	LC-MS
Lactate	1	± 0.32	0.81 ± 0.07	1	± 0.24	0.89 ± 0.14	GC-MS
Lactulose	1	± 0.33	0.83 ± 0.06	1	± 0.15	1.55 ± 0.14	GC-MS
Lysine	1	± 0.33	1.34 ± 0.19	1	± 0.19	1.98 ± 0.33	GC-MS
Malate	1	± 0.16	0.84 ± 0.04	1	± 0.16	1.00 ± 0.19	GC-MS
Maleate	1	± 0.26	0.57 ± 0.03	1	± 0.11	0.86 ± 0.11	GC-MS
Malonate	1	± 0.17	0.70 ± 0.08	1	± 0.14	0.71 ± 0.11	GC-MS
Maltose	1	± 0.21	1.20 ± 0.15	1	± 0.09	0.99 ± 0.10	GC-MS
Mannose	1	± 0.23	1.89 ± 0.56	1	± 0.12	2.02 ± 0.37	GC-MS
Methionine	1	± 0.26	1.57 ± 0.28	1	± 0.11	4.32 ± 0.62	GC-MS
Myo-inositol	1	± 0.19	0.92 ± 0.04	1	± 0.17	0.96 ± 0.18	GC-MS
Myristate	1	± 0.27	0.72 ± 0.01	1	± 0.13	0.95 ± 0.16	GC-MS
Nicotinate	1	± 0.36	0.63 ± 0.08	1	± 0.18	0.87 ± 0.11	GC-MS
Palmitate	1	± 0.35	1.12 ± 0.02	1	± 0.15	1.22 ± 0.16	GC-MS
Pelargonate	1	± 0.38	1.10 ± 0.04	1	± 0.26	1.52 ± 0.10	GC-MS
Phenylalanine	1	± 0.10	1.09 ± 0.12	1	± 0.17	0.47 ± 0.09	GC-MS
Phosphorate	1	± 0.18	0.63 ± 0.11	1	± 0.13	1.09 ± 0.21	GC-MS
Proline	1	± 0.32	0.96 ± 0.28	1	± 0.26	0.28 ± 0.13	GC-MS
Putrescine	1	± 0.34	0.98 ± 0.16	1	± 0.11	0.38 ± 0.08	GC-MS
Pyruvate	1	± 0.30	1.05 ± 0.23	1	± 0.15	0.78 ± 0.22	GC-MS
Quercetin-3Glc	1	± 0.08	1.40 ± 0.08	1	± 0.06	1.31 ± 0.09	LC-MS
Raffinose	N/D	± N/D	N/D ± N/D	N/D	± N/D	N/D ± N/D	GC-MS
Rhamnose	1	± 0.16	1.01 ± 0.13	1	± 0.17	1.14 ± 0.17	GC-MS
Ribose	1	± 0.17	1.15 ± 0.10	1	± 0.09	0.87 ± 0.13	GC-MS
Quercetin-3Glc-6"Rha (Rutin)	1	± 0.10	1.29 ± 0.08	1	± 0.05	1.12 ± 0.06	LC-MS
Saccharopine	1	± 0.25	N/D ± N/D	N/D	± N/D	N/D ± N/D	GC-MS
Serine	1	± 0.14	1.17 ± 0.12	1	± 0.14	0.34 ± 0.05	GC-MS
Sorbose	1	± 0.23	0.93 ± 0.06	1	± 0.17	0.97 ± 0.20	GC-MS
Squalene	1	± 0.26	0.74 ± 0.12	1	± 0.20	0.68 ± 0.24	GC-MS
Stearate	1	± 0.42	1.14 ± 0.02	1	± 0.16	1.25 ± 0.15	GC-MS
Succinate	1	± 0.23	0.99 ± 0.14	1	± 0.29	0.93 ± 0.15	GC-MS
Sucrose	1	± 0.11	0.98 ± 0.17	1	± 0.08	0.99 ± 0.09	GC-MS
Tagatose	1	± 0.54	0.55 ± 0.06	1	± 0.13	0.91 ± 0.15	GC-MS
Threitol	1	± 0.14	1.25 ± 0.10	1	± 0.12	1.03 ± 0.09	GC-MS
Threonate	1	± 0.11	0.95 ± 0.06	1	± 0.16	0.91 ± 0.16	GC-MS
Threonine	1	± 0.12	1.05 ± 0.10	1	± 0.10	0.27 ± 0.04	GC-MS
Trehalose	1	± 0.08	1.14 ± 0.14	1	± 0.11	0.96 ± 0.12	GC-MS
Tyrosine	1	± 0.12	1.01 ± 0.06	1	± 0.12	0.90 ± 0.16	GC-MS
Nicotianoside tetra-glycoside 1	1	± 0.10	1.14 ± 0.15	1	± 0.13	0.89 ± 0.07	LC-MS
Nicotianoside tetra-glycoside 2	1	± 0.14	1.24 ± 0.11	1	± 0.12	0.80 ± 0.07	LC-MS
Nicotianoside tetra-glycoside 3	1	± 0.19	1.35 ± 0.14	1	± 0.16	0.83 ± 0.07	LC-MS
Nicotianoside tetra-glycoside 4	1	± 0.15	0.85 ± 0.06	1	± 0.08	0.88 ± 0.08	LC-MS
Nicotianoside tetra-glycoside 5	1	± 0.16	1.08 ± 0.13	1	± 0.15	1.09 ± 0.16	LC-MS
Nicotianoside tetra-glycoside 6	1	± 0.16	1.35 ± 0.14	1	± 0.14	0.90 ± 0.07	LC-MS
CGA-related (353 m/z)	1	± 0.06	1.08 ± 0.04	1	± 0.06	1.04 ± 0.04	LC-MS
CGA-related (715 m/z)	1	± 0.06	1.04 ± 0.04	1	± 0.06	1.03 ± 0.03	LC-MS
Nicotianoside di-glycoside 1	1	± 0.15	1.47 ± 0.16	1	± 0.17	0.87 ± 0.12	LC-MS
Nicotianoside di-glycoside 2	1	± 0.13	1.08 ± 0.06	1	± 0.04	0.86 ± 0.07	LC-MS
Nicotianoside tri-glycoside 1	1	± 0.12	1.43 ± 0.15	1	± 0.14	0.82 ± 0.08	LC-MS
Nicotianoside tri-glycoside 2	1	± 0.11	1.57 ± 0.11	1	± 0.06	0.93 ± 0.07	LC-MS
Nicotianoside tri-glycoside 3	1	± 0.13	1.19 ± 0.11	1	± 0.15	0.80 ± 0.06	LC-MS
Nicotianoside tri-glycoside 4	1	± 0.12	1.67 ± 0.04	1	± 0.06	0.95 ± 0.11	LC-MS
Nicotianoside tri-glycoside 5	N/D	± N/D	N/D ± N/D	N/D	± N/D	N/D ± N/D	LC-MS
Nicotianoside tri-glycoside 6	1	± 0.16	1.35 ± 0.14	1	± 0.15	0.93 ± 0.10	LC-MS
unknown	1	± 0.16	0.89 ± 0.06	1	± 0.06	0.68 ± 0.06	LC-MS
Valine	1	± 0.07	0.97 ± 0.08	1	± 0.17	0.48 ± 0.08	GC-MS

METABOLITO	22 dpi				detecta por
	MOCK		TMV		
	Prom	SE	Prom	SE	
2-oxoglutarate	1	± 0.15	1.11	± 0.21	GC-MS
2-oxogulonate	1	± 0.22	1.04	± 0.18	GC-MS
4-hydroxybutyrate	1	± 0.13	0.71	± 0.19	GC-MS
4-hydroxycinnamate	1	± 0.18	0.88	± 0.07	GC-MS
Adenine	1	± 0.21	1.22	± 0.21	GC-MS
Alanine	1	± 0.28	0.50	± 0.09	GC-MS
Asparagine	1	± 0.19	0.45	± 0.09	GC-MS
Benzoate	1	± 0.12	1.25	± 0.26	GC-MS
Beta-alanine	1	± 0.08	0.64	± 0.08	GC-MS
Caffeate	1	± 0.12	1.01	± 0.06	GC-MS
Cellobiose	1	± 0.10	6.11	± 1.29	GC-MS
Chrologenate related 1	1	± 0.03	1.12	± 0.04	LC-MS
Chrologenate related 2	1	± 0.03	1.08	± 0.05	LC-MS
Chrologenate related 3	1	± 0.02	1.17	± 0.04	LC-MS
CGA (Cafferoyl-4-quinat)	1	± 0.02	1.34	± 0.11	LC-MS
CGA (putative cafferoyl-3-quinat)	1	± 0.02	1.68	± 0.13	LC-MS
CGA (putative cafferoyl-5-quinat)	1	± 0.05	0.95	± 0.14	LC-MS
Chrologenate related 4	1	± 0.03	0.94	± 0.05	LC-MS
Coumaroly-4-quinat	1	± 0.04	1.06	± 0.01	LC-MS
Citrate	1	± 0.33	0.70	± 0.15	GC-MS
Dehydroascorbate	1	± 0.20	0.42	± 0.11	GC-MS
Fructose	1	± 0.03	0.76	± 0.04	GC-MS
Fructose-6-phosphate	1	± 0.32	0.92	± 0.20	GC-MS
Fumarate	1	± 0.08	0.72	± 0.14	GC-MS
GABA	1	± 0.23	0.60	± 0.02	GC-MS
Glucarate	1	± 0.06	1.06	± 0.03	GC-MS
Glucose	1	± 0.02	0.87	± 0.07	GC-MS
Glucose-6-phosphate	1	± 0.39	0.81	± 0.15	GC-MS
Glutamate	1	± 0.08	0.66	± 0.08	GC-MS
Glutamine	1	± 0.12	0.50	± 0.09	GC-MS
Glutarate	N/D	± N/D	N/D	± N/D	GC-MS
Glycerate	1	± 0.25	0.60	± 0.09	GC-MS
Glycerol	1	± 0.13	1.08	± 0.29	GC-MS
Glycine	1	± 0.10	0.77	± 0.08	GC-MS
Glycolate	1	± 0.14	2.90	± 0.78	GC-MS
Gulonate	1	± 0.12	0.82	± 0.12	GC-MS
Isocitrate	1	± 0.08	0.88	± 0.10	GC-MS
Kaempferol-3Glc-6"Rha	1	± 0.04	1.25	± 0.07	LC-MS
Kaempferol-glycoside 1 (593m/z)	1	± 0.03	1.10	± 0.05	LC-MS
Kaempferol-glycoside 2 (593m/z)	1	± 0.02	1.60	± 0.07	LC-MS
Lactate	1	± 0.18	0.85	± 0.06	GC-MS
Lactulose	1	± 0.10	1.19	± 0.17	GC-MS
Lysine	1	± 0.13	5.29	± 1.30	GC-MS
Malate	1	± 0.10	1.24	± 0.13	GC-MS
Maleate	1	± 0.12	1.07	± 0.05	GC-MS
Malonate	1	± 0.12	0.68	± 0.12	GC-MS
Maltose	1	± 0.07	1.10	± 0.14	GC-MS
Mannose	1	± 0.15	1.21	± 0.08	GC-MS
Methionine	1	± 0.12	4.87	± 0.66	GC-MS
Myo-inositol	1	± 0.10	1.14	± 0.15	GC-MS
Myristate	1	± 0.12	1.09	± 0.09	GC-MS
Nicotinate	1	± 0.14	0.94	± 0.07	GC-MS
Palmitate	1	± 0.13	1.26	± 0.10	GC-MS
Pelargonate	1	± 0.16	0.65	± 0.10	GC-MS
Phenylalanine	1	± 0.14	0.47	± 0.05	GC-MS
Phosphorate	1	± 0.10	0.98	± 0.11	GC-MS
Proline	1	± 0.24	0.75	± 0.28	GC-MS
Putrescine	1	± 0.12	0.70	± 0.08	GC-MS
Pyruvate	1	± 0.15	0.46	± 0.06	GC-MS
Quercetin-3Glc	1	± 0.05	0.89	± 0.06	LC-MS
Raffinose	1	± 0.18	3.24	± 0.99	GC-MS
Rhamnose	1	± 0.04	1.13	± 0.08	GC-MS
Ribose	1	± 0.07	0.80	± 0.02	GC-MS
Quercetin-3Glc-6"Rha (Rutin)	1	± 0.03	1.01	± 0.05	LC-MS

Saccharopine	1	± 0.15	N/D	± N/D	GC-MS
Serine	1	± 0.11	0.70	± 0.10	GC-MS
Sorbose	1	± 0.12	1.06	± 0.14	GC-MS
Squalene	1	± 0.24	0.89	± 0.17	GC-MS
Stearate	1	± 0.14	1.32	± 0.10	GC-MS
Succinate	1	± 0.14	1.27	± 0.17	GC-MS
Sucrose	1	± 0.02	0.85	± 0.06	GC-MS
Tagatose	1	± 0.16	0.88	± 0.12	GC-MS
Threitol	1	± 0.04	0.97	± 0.09	GC-MS
Threonate	1	± 0.09	1.12	± 0.12	GC-MS
Threonine	1	± 0.07	0.42	± 0.04	GC-MS
Trehalose	1	± 0.10	0.63	± 0.07	GC-MS
Tyrosine	1	± 0.08	1.08	± 0.11	GC-MS
Nicotianoside tetra-glycoside 1	1	± 0.11	2.02	± 0.24	LC-MS
Nicotianoside tetra-glycoside 2	1	± 0.02	1.00	± 0.03	LC-MS
Nicotianoside tetra-glycoside 3	1	± 0.04	1.19	± 0.08	LC-MS
Nicotianoside tetra-glycoside 4	1	± 0.07	1.59	± 0.09	LC-MS
Nicotianoside tetra-glycoside 5	1	± 0.09	2.25	± 0.24	LC-MS
Nicotianoside tetra-glycoside 6	1	± 0.05	1.50	± 0.11	LC-MS
CGA-related (353 m/z)	1	± 0.02	0.95	± 0.04	LC-MS
CGA-related (715 m/z)	1	± 0.03	1.13	± 0.10	LC-MS
Nicotianoside di-glycoside 1	1	± 0.07	0.46	± 0.04	LC-MS
Nicotianoside di-glycoside 2	1	± 0.04	0.64	± 0.05	LC-MS
Nicotianoside tri-glycoside 1	1	± 0.05	0.68	± N/D	LC-MS
Nicotianoside tri-glycoside 2	1	± 0.05	0.76	± 0.04	LC-MS
Nicotianoside tri-glycoside 3	1	± 0.04	1.02	± 0.06	LC-MS
Nicotianoside tri-glycoside 4	1	± 0.04	0.93	± 0.07	LC-MS
Nicotianoside tri-glycoside 5	1	± 0.12	2.13	± 0.20	LC-MS
Nicotianoside tri-glycoside 6	1	± 0.05	0.81	± 0.06	LC-MS
unknown	1	± 0.06	0.71	± 0.06	LC-MS
Valine	1	± 0.09	0.74	± 0.05	GC-MS

Tabla B2. Acumulación relativa de metabolitos primarios y secundarios de tabaco durante el desarrollo

METABOLITO	1 dpi		5 dpi		8 dpi		detectado por
	Prom	SE	Prom	SE	Prom	SE	
2-oxoglutarate	1	± 0.21	1.06	± 0.19	0.24	± 0.05	GC-MS
2-oxogulonate	1	± 0.18	1.04	± 0.09	0.69	± 0.10	GC-MS
4-hydroxybutyrate	1	± 0.08	0.89	± 0.13	1.18	± 0.08	GC-MS
4-hydroxycinnamate	1	± 0.04	0.82	± 0.10	1.07	± 0.04	GC-MS
Adenine	1	± 0.17	1.12	± 0.10	0.78	± 0.04	GC-MS
Alanine	1	± 0.15	0.16	± 0.04	0.42	± 0.10	GC-MS
Asparagine	1	± 0.18	0.62	± 0.16	1.05	± 0.16	GC-MS
Benzoate	1	± 0.10	0.89	± 0.08	0.87	± 0.07	GC-MS
Beta-alanine	1	± 0.10	0.61	± 0.05	0.36	± 0.05	GC-MS
Caffeate	1	± 0.09	0.85	± 0.06	0.59	± 0.05	GC-MS
Cellobiose	1	± 0.20	0.72	± 0.19	0.92	± 0.16	GC-MS
Chrologenate related 1	1	± 0.05	0.93	± 0.05	1.25	± 0.13	LC-MS
Chrologenate related 2	1	± 0.05	0.93	± 0.05	2.06	± 0.06	LC-MS
Chrologenate related 3	1	± 0.06	1.35	± 0.05	2.25	± 0.09	LC-MS
CGA (Caffeoyl-4-quinat)	1	± 0.03	1.22	± 0.07	1.04	± 0.08	LC-MS
CGA (putative caffeoyl-3-quinat)	1	± 0.07	1.11	± 0.10	1.37	± 0.16	LC-MS
CGA (putative caffeoyl-5-quinat)	1	± 0.04	0.53	± 0.07	0.37	± 0.26	LC-MS
Chrologenate related 4	1	± 0.04	1.12	± 0.08	1.01	± 0.07	LC-MS
Coumaroyl-4-quinat	1	± 0.02	0.95	± 0.02	1.10	± 0.02	LC-MS
Citrate	1	± 0.19	0.35	± 0.02	0.08	± 0.01	GC-MS
Dehydroascorbate	1	± 0.23	1.54	± 0.26	1.14	± 0.58	GC-MS
Fructose	1	± 0.11	0.84	± 0.09	0.81	± 0.07	GC-MS
Fructose-6-phosphate	1	± 0.50	1.39	± 0.23	1.59	± 0.30	GC-MS
Fumarate	1	± 0.16	0.29	± 0.04	0.17	± 0.02	GC-MS
GABA	1	± 0.11	0.76	± 0.07	0.66	± 0.05	GC-MS
Glucarate	1	± 0.10	0.99	± 0.08	1.34	± 0.18	GC-MS
Glucose	1	± 0.06	0.65	± 0.08	0.63	± 0.09	GC-MS
Glucose-6-phosphate	1	± 0.46	1.36	± 0.29	1.38	± 0.24	GC-MS
Glutamate	1	± 0.05	0.47	± 0.09	0.54	± 0.08	GC-MS
Glutamine	1	± 0.18	0.41	± 0.12	0.80	± 0.30	GC-MS
Glutarate	1	± 0.05	0.69	± 0.07	1.06	± 0.09	GC-MS
Glycerate	1	± 0.12	0.46	± 0.10	0.69	± 0.05	GC-MS
Glycerol	1	± 0.18	0.83	± 0.16	0.68	± 0.09	GC-MS
Glycine	1	± 0.11	1.12	± 0.16	0.37	± 0.04	GC-MS
Glycolate	1	± 0.10	1.08	± 0.08	0.50	± 0.04	GC-MS
Gulonate	1	± 0.10	0.88	± 0.08	0.67	± 0.03	GC-MS
Isocitrate	1	± 0.07	0.84	± 0.06	0.68	± 0.07	GC-MS
Kaempferol-3Glc-6"Rha	1	± 0.07	0.75	± 0.04	0.86	± 0.10	LC-MS
Kaempferol-glycoside 1 (593m/z)	1	± 0.05	0.50	± 0.04	0.82	± 0.05	LC-MS
Kaempferol-glycoside 2 (593m/z)	1	± 0.05	0.99	± 0.02	1.01	± 0.03	LC-MS
Lactate	1	± 0.17	0.70	± 0.04	0.66	± 0.16	GC-MS
Lactulose	1	± 0.10	0.81	± 0.15	1.60	± 0.45	GC-MS
Lysine	1	± 0.07	0.97	± 0.07	0.99	± 0.14	GC-MS
Malate	1	± 0.06	0.78	± 0.06	0.88	± 0.08	GC-MS
Maleate	1	± 0.10	0.78	± 0.07	0.88	± 0.18	GC-MS
Malonate	1	± 0.11	0.95	± 0.10	1.16	± 0.07	GC-MS
Maltose	1	± 0.17	1.68	± 0.20	2.37	± 0.55	GC-MS
Mannose	1	± 0.10	1.23	± 0.15	0.89	± 0.09	GC-MS
Methionine	1	± 0.12	0.65	± 0.07	0.36	± 0.04	GC-MS
Myo-inositol	1	± 0.08	0.95	± 0.05	0.93	± 0.09	GC-MS
Myristate	1	± 0.06	0.96	± 0.05	0.80	± 0.04	GC-MS
Nicotinate	1	± 0.09	0.73	± 0.05	0.55	± 0.06	GC-MS
Palmitate	1	± 0.08	0.92	± 0.07	0.78	± 0.04	GC-MS
Pelargonate	1	± 0.15	0.96	± 0.08	0.87	± 0.09	GC-MS
Phenylalanine	1	± 0.04	0.89	± 0.06	0.33	± 0.02	GC-MS
Phosphorate	1	± 0.11	1.28	± 0.17	1.10	± 0.18	GC-MS
Proline	1	± 0.09	0.10	± 0.02	0.40	± 0.10	GC-MS

METABOLITO	15 dpi		22 dpi		detectado
	Prom	SE	Prom	SE	
2-oxoglutarate	0.34	± 0.08	0.67	± 0.10	GC-MS
2-oxogulonate	0.93	± 0.09	0.88	± 0.12	GC-MS
4-hydroxybutyrate	0.81	± 0.11	0.48	± 0.06	GC-MS
4-hydroxycinnamate	1.08	± 0.17	1.64	± 0.23	GC-MS
Adenine	1.99	± 0.18	1.23	± 0.17	GC-MS
Alanine	0.10	± 0.00	0.25	± 0.07	GC-MS
Asparagine	1.18	± 0.16	1.28	± 0.24	GC-MS
Benzoate	0.96	± 0.12	0.88	± 0.05	GC-MS
Beta-alanine	0.29	± 0.04	0.33	± 0.02	GC-MS
Caffeate	0.95	± 0.23	1.22	± 0.11	GC-MS
Cellobiose	1.00	± 0.02	1.86	± 0.17	GC-MS
Chrologenate related 1	2.34	± 0.16	4.30	± 0.14	LC-MS
Chrologenate related 2	2.42	± 0.14	2.11	± 0.07	LC-MS
Chrologenate related 3	3.10	± 0.15	3.15	± 0.06	LC-MS
CGA (Caffeoyl-4-quinat)	1.35	± 0.10	2.79	± 0.06	LC-MS
CGA (putative caffeoyl-3-quinat)	1.50	± 0.18	1.32	± 0.02	LC-MS
CGA (putative caffeoyl-5-quinat)	1.31	± 0.08	2.34	± 0.13	LC-MS
Chrologenate related 4	1.12	± 0.08	1.61	± 0.04	LC-MS
Coumaroly-4-quinat	1.30	± 0.06	1.19	± 0.04	LC-MS
Citrate	0.26	± 0.07	0.45	± 0.04	GC-MS
Dehydroascorbate	1.53	± 0.31	2.31	± 0.42	GC-MS
Fructose	1.07	± 0.05	1.14	± 0.04	GC-MS
Fructose-6-phosphate	1.03	± 0.36	1.64	± 0.53	GC-MS
Fumarate	0.20	± 0.03	0.27	± 0.01	GC-MS
GABA	0.85	± 0.12	0.76	± 0.04	GC-MS
Glucarate	2.54	± 0.24	2.10	± 0.12	GC-MS
Glucose	1.01	± 0.03	0.98	± 0.02	GC-MS
Glucose-6-phosphate	1.06	± 0.36	1.53	± 0.59	GC-MS
Glutamate	0.33	± 0.05	0.54	± 0.04	GC-MS
Glutamine	1.01	± 0.44	0.62	± 0.03	GC-MS
Glutarate	N/D	± N/D	N/D	± N/D	GC-MS
Glycerate	0.44	± 0.06	0.21	± 0.04	GC-MS
Glycerol	1.07	± 0.32	0.64	± 0.03	GC-MS
Glycine	2.60	± 0.15	2.05	± 0.14	GC-MS
Glycolate	1.37	± 0.17	1.11	± 0.09	GC-MS
Gulonate	0.80	± 0.04	0.61	± 0.08	GC-MS
Isocitrate	0.96	± 0.05	0.78	± 0.06	GC-MS
Kaempferol-3Glc-6"Rha	1.57	± 0.08	3.18	± 0.14	LC-MS
Kaempferol-glycoside 1 (593m/z)	1.02	± 0.05	2.11	± 0.07	LC-MS
Kaempferol-glycoside 2 (593m/z)	2.67	± 0.05	5.20	± 0.04	LC-MS
Lactate	0.70	± 0.15	0.68	± 0.02	GC-MS
Lactulose	2.65	± 0.25	3.62	± 0.30	GC-MS
Lysine	3.10	± 0.64	1.17	± 0.06	GC-MS
Malate	1.13	± 0.20	0.93	± 0.04	GC-MS
Maleate	1.13	± 0.11	0.93	± 0.09	GC-MS
Malonate	1.20	± 0.14	0.85	± 0.07	GC-MS
Maltose	9.87	± 0.61	9.45	± 0.45	GC-MS
Mannose	1.26	± 0.10	1.46	± 0.11	GC-MS
Methionine	0.91	± 0.10	0.85	± 0.08	GC-MS
Myo-inositol	1.73	± 0.29	1.00	± 0.07	GC-MS
Myristate	1.13	± 0.10	0.96	± 0.02	GC-MS
Nicotinate	0.64	± 0.05	0.70	± 0.09	GC-MS
Palmitate	1.09	± 0.13	0.84	± 0.05	GC-MS
Pelargonate	1.02	± 0.18	1.33	± 0.14	GC-MS
Phenylalanine	0.46	± 0.05	0.71	± 0.09	GC-MS
Phosphorate	0.30	± 0.02	0.16	± 0.01	GC-MS
Proline	0.34	± 0.07	0.23	± 0.05	GC-MS

## APÉNDICE C. ACUMULACIÓN RELATIVA DE MICRORNAS DE TABACO ANTE INFECCIÓN CON TMV

Tabla C1. Acumulación relativa de metabolitos primarios y secundarios de tabaco ante infección por TMV.

miR	5 dpi	15 dpi	22 dpi
<b>miR156/7</b>	-0.38	0.47	0.70
<b>miR159/319</b>	-0.08	-0.05	-0.02
<b>miR160</b>	-1.06	1.32	0.19
<b>miR164</b>	-0.39	-0.01	0.47
<b>miR165/6</b>	-0.81	1.14	0.22
<b>miR167</b>	-1.02	1.39	1.16
<b>miR168</b>	-0.48	1.75	1.19
<b>miR169</b>	0.24	-0.13	0.17
<b>miR171</b>	-1.03	0.28	0.94
<b>miR172</b>	-0.83	-0.05	0.32
<b>miR390</b>	-0.35	0.61	0.94
<b>miR391</b>	0.34	0.80	0.20
<b>miR395</b>	0.48	-0.05	0.10
<b>miR397</b>	-0.94	0.76	0.79
<b>miR398</b>	-0.40	0.44	1.75
<b>miR399</b>	0.36	0.29	0.20
<b>miR403</b>	0.08	-0.05	-0.45
<b>mR408</b>	0.43	0.85	-1.08
<b>miR415</b>	-0.47	0.16	0.64
<b>miR472</b>	0.67	-0.13	0.03
<b>miR474</b>	-0.24	-0.21	0.18
<b>miR535</b>	-0.78	0.99	0.58

## APÉNDICE D. PROTOCOLO *TRIZOL*<sup>®</sup> SCALE-DOWN

Se adapta la extracción original que parte de 1g de tejido vegetal y 10 mL de *TRIZOL*<sup>®</sup> (Invitrogen) a una extracción a partir de menos masa.

- 1) Moler en eppendorf de 1.5 mL 20-100 mg de tejido con Tissue Lyser (Qiagen) utilizando nitrógeno líquido para enfriar
- 2) Agregar enseguida 1 ml de *TRIZOL*<sup>®</sup>
- 3) Homogeneizar usando vórtex o Tissue Lyser; luego incubar 5 min a Tamb.
- 4) Centrifugar a 12000 g por 10 min a 4<sup>o</sup> C. Pasar el sobrenadante a tubos limpios. Enfriar mientras tanto a -20 °C isopropanol y EtOH 75/ (25/ H<sub>2</sub>O DEPC + 75/ EtOH de grado de Biología Molecular).
- 5) Agregar a los tubos nuevos un volumen de Cloroformo igual a 3/10 del volumen del sobrenadante pasado.
- 6) Aplicar vórtex o Tissue Lyser por 15 s, luego incubar a Tamb por 3 min.
- 7) Centrifugar a 12000 g por 15 min a 4<sup>o</sup> C. El RNA queda en fase acuosa (superior). Transferirla a nuevo tubo, y descartar apropiadamente el tubo con la fase orgánica con cloroformo (inferior).
- 8) Repetir con la fase acuosa pasos **5)** al **7)**, siempre recuperando fase acuosa y eliminando apropiadamente la orgánica (inferior) con cloroformo. Esto aumenta la eficiencia de la separación. El volumen de cloroformo es el mismo que el del paso **5)** (3/10 del vol inicial del sobrenadante).
- 9) Pasar la fase acuosa a tubos limpios. Agregar 1 volumen de isopropanol frío. Poner los tubos por 30 min en hielo. Este paso precipita el RNA.
- 10) Centrifugar por 20 min a 4 °C y 12000 g.
- 11) Deacartar el sobrenadante. Lavar el pellet con aproximadamente 1 mL de EtOH 75/ frío, agitando suavemente hasta desprender el pellet.
- 12) Centrifugar a a 12000 g por 15 min a 4 °C. Descartar el sobrenadante con pipeta. Dejar secar el pellet al aire (5-10 min, no excederse).
- 13) Disolver el pellet en 20-30 µL H<sub>2</sub>O DEPC o milliQ estéril. Si necesario, calentar a 65 °C por 5-10 min.
- 14) Cuantificar algunas muestras en NanoDrop. Si tanto A<sub>260/280</sub> como A<sub>260/230</sub> son >1.8, termina aquí. Si A<sub>260/230</sub> <1.8, indica contaminación con carbohidratos u otras moléculas orgánicas. En ese caso precipitar con LiCl.
- 15) Agregar LiCl 7.5M Ambion hasta Cf = 2.5 M al RNA resuspendido en H<sub>2</sub>O del paso **13)**. Dejar a -20 °C por 30 min y centrifugar a 16000 g a 4 °C por 30 min (este paso es crítico para el rendimiento).
- 16) Descartar el sobrenadante y lavar con 1 mL EtOH 75/ frío agitando suavemente hasta desprender el pellet.

- 17)** Centrifugar a a 12000 g por 15 min a 4 °C. Descartar el sobrenadante con pipeta. Dejar secar el pellet al aire (5-10 min, no excederse).
- 18)** Disolver el pellet en 20-30 µL H<sub>2</sub>O DEPC o milliQ estéril. Si necesario, calentar a 65 °C por 5-10 min.
- 19)** Cuantificar el RNA. Se necesitan al menos 150 ng/µL. La  $A_{260/230}$  indica contaminación con compuestos orgánicos aparte de proteínas, y una relación cercana a 2 se recomienda. Después del paso de LiCl dicha relación suele ser mayor a 2.

## APÉNDICE E. REQUERIMIENTOS MIQE DE ENSAYOS DE QPCR

**Tabla E1. Requerimientos MIQE de las condiciones experimentales usadas en el Capítulo 3 de la Tesis para cuantificación de RNA mediante qPCR.**

### A: RT-qPCR de miRNAs maduros.

<b>Diseño experimental</b>	
Grupos de control	<i>N. tabacum</i> cv. Xanthi nn inoculadas con buffer (2 grupos, a 6 y 11 dpi)
Grupos de tratamiento	<i>N. tabacum</i> cv. Xanthi nn inoculadas con TMV o ShMV (4 grupos, a 6 y 11 dpi)
<b>Muestras</b>	
Tipo de muestras	Hojas número 8 individuales
Procedimiento de procesado	Homogeneización mediante N <sub>2</sub> (l)
Condiciones de almacenamiento de las muestras	-80 °C
Réplicas biológicas	n = 5 para cada tratamiento y dpi.
<b>Extracción de RNA</b>	
Procedimiento	Extracción con fenol ácido
Reactivos	TRIzol (Invitrogen)
Tratamiento con DNasa	DNase I Amp Grade (Invitrogen), 15 min a temperatura ambiente
Evaluación de contaminación	< 3/
Cuantificación de ácidos nucleicos	Absorbancia a 260 nm
Instrumento y método	NanoDrop
Pureza (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )	>1.8
Integridad del RNA	Analizada por electroforesis en gel de agarosa
<b>Transcripción reversa</b>	
Condiciones de reacción completas	Protocolo modificado a partir de [347]
Cantidad de RNA y volumen de reacción	100 ng de RNA, 20 µL
Oligonucleótido cebador	Cebadores del tipo tallo y lazo (“stem-loop”) diseñados para cada miR a amplificar, más cebadores reversos para cada gen de referencia a ensayar.
Transcriptasa reversa	SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen), 60 U por reacción
Temperatura y tiempo de reacción	30 min 16 °C, (30 seg 30 °C, 30 seg 42 °C, 30 seg 50 °C) x 60 ciclos, 5 min 85 °C
<b>Protocolo de qPCR</b>	
Condiciones de reacción completas	5 min 95 °C, (30 seg 95 °C, 1 min 60 °C) x 40 ciclos
Cantidad de cDNA y volumen de reacción	20 µL de reacción, 20-200 ng de RNA
Concentración de Cebadores, Mg <sup>2+</sup> y dNTPs	3mM Mg <sup>2+</sup> , 200 nM cebadores, 0,2 mM de dNTPs
Polimerasa	Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen)
Buffer	20 mM Tris-HCL (pH = 8.4), 50 mM KCl
Modelo y fabricante del instrumento de qPCR	ABI 7500, Applied Biosystems

<b>Validación de las qPCRs</b>	
Especificidad	Analizada por electroforesis en gel de agarosa y parámetros de la curva de fusión (“melting curve”) de cada corrida de qPCR.
Método de cálculo de la eficiencia de la qPCR	Eficiencia promedio de PCR por amplicón fue calculada por el programa LinRegPCR ([404])
<b>Análisis de los datos</b>	
Programa de análisis de qPCR	Programa LinRegPCR
Método de determinación de los valores de Cq	Programa LinRegPCR
Identificación de outliers	Programa LinRegPCR
Justificación del número y elección de genes de referencia	Se ensayó la estabilidad relativa de 3 genes de referencia (Actina, SGN-U431117; Ubi-3, GB:X58253 y EF-1 $\alpha$ , SGN-U446573) usando tres algoritmos diferentes de determinación de estabilidad (GeNorm, Bestkeeper y NormFinder). EF-1 $\alpha$ fue encontrado como el más estable.
Descripción del método de normalización	Fórmula desarrollada en [318]:  $R = \frac{E^{(control\ Ct\ mean - sample\ Ct\ mean)_{target}}}{E^{(control\ Ct\ mean - sample\ Ct\ mean)_{reference}}}$ Incorporada en el programa fgStatistics
Número de réplicas técnicas	3
Método estadístico	Prueba de permutación
Programa informático	fgStatistics software (Di Rienzo J.A, 2009, <a href="http://sites.google.com/site/fgStatistics/">http://sites.google.com/site/fgStatistics/</a> )
Repetibilidad (variación intra-ensayo) (SD de valores Cq)	0.092

## B: RT-qPCR de mRNAs y pre-miRs.

<b>Diseño experimental</b>	
Grupos de control	<i>N. tabacum</i> cv. Xanthi nn inoculadas con buffer (2 grupos, a 6 y 11 dpi)
Grupos de tratamiento	<i>N. tabacum</i> cv. Xanthi nn inoculadas con TMV o ShMV (4 grupos, a 6 y 11 dpi)
<b>Muestras</b>	
Tipo de muestras	Hojas número 8 individuales
Procedimiento de procesado	Homogeneización mediante N <sub>2</sub> (l)
Condiciones de almacenamiento de las muestras	-80 °C
Réplicas biológicas	n = 5 para cada tratamiento y dpi.
<b>Extracción de RNA</b>	
Procedimiento	Extracción con fenol ácido
Reactivos	TRIzol (Invitrogen)
Tratamiento con DNasa	DNase I Amp Grade (Invitrogen), 15 min a temperatura ambiente
Evaluación de contaminación	< 3/
Cuantificación de ácidos nucleicos	Absorbancia a 260 nm
Instrumento y método	NanoDrop
Pureza (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )	>1.8
Integridad del RNA	Analizada por electroforesis en gel de agarosa

<b>Transcripción reversa</b>	
Condiciones de reacción completas	Como se describen en las instrucciones del fabricante (Invitrogen®)
Cantidad de RNA y volumen de reacción	1 µg de RNA, 20 µL
Oligonucleótido cebador	Cebadores oligo d(T)20 (Invitrogen®)
Transcriptasa reversa	M-MLV (Invitrogen).
Temperatura y tiempo de reacción	1 h, 50 °C
<b>Protocolo de qPCR</b>	
Condiciones de reacción completas	5 min 95 °C , (30 seg 95 °C, 1 min 60 °C) x 40 ciclos
Cantidad de cDNA y volumen de reacción	20 µL reacción, 20-200 ng de RNA
Concentración de Cebadores, Mg <sup>2+</sup> y dNTPs	3mM Mg <sup>2+</sup> , 200nM cebadores, 0,2 mM de dNTPs
Polimerasa	Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen)
Buffer	20 mM Tris-HCL (pH = 8.4), 50 mM KCl
Modelo y fabricante del instrumento de qPCR	ABI 7500, Applied Biosystems
<b>Validación de las qPCRs</b>	
Especificidad	Analizada por electroforesis en gel de agarosa y parámetros de la curva de fusión (“melting curve”) de cada corrida de qPCR.
Método de cálculo de la eficiencia de la qPCR	Eficiencia promedio de PCR por amplicón fue calculada por el programa LinRegPCR ([404])
<b>Análisis de los datos</b>	
Programa de análisis de qPCR	Programa LinRegPCR
Método de determinación de los valores de Cq	Programa LinRegPCR
Identificación de outliers	Programa LinRegPCR
Justificación del número y elección de genes de referencia	Se ensayó la estabilidad relativa de 3 conocidos genes de referencia (Actina, SGN-U431117; Ubi-3, GB:X58253 y EF-1α, SGN-U446573) usando tres algoritmos diferentes de determinación de estabilidad (GeNorm, Bestkeeper y NormFinder). EF-1α fue encontrado como el más estable.
Descripción del método de normalización	Fórmula desarrollada en [318]: $R = \frac{E_{\text{target}}^{(\text{control Ct mean} - \text{sample Ct mean})_{\text{target}}}}{E_{\text{reference}}^{(\text{control Ct mean} - \text{sample Ct mean})_{\text{reference}}}}$ Incorporada en el programa fgStatistics
Número de réplicas técnicas	3
Método estadístico	Prueba de permutación
Programa informático	fgStatistics software (Di Rienzo J.A, 2009, ( <a href="http://sites.google.com/site/fgStatistics/">http://sites.google.com/site/fgStatistics/</a> ))
Repetibilidad (variación intra-ensayo) (SD de valores Cq)	0.17

**Tabla E2. Requerimientos MIQE de las condiciones experimentales usadas en el Capítulo 4 de la Tesis para cuantificación de RNA mediante qPCR.**

**A: RT-qPCR de miRNAs maduros.**

<b>Diseño experimental</b>	
Grupos de control	<i>A.thaliana</i> Col0 inoculadas con buffer
Grupos de tratamiento	<i>A.thaliana</i> Col0 inoculadas con cepas JPN1 o UK1 de TuMV
<b>Muestras</b>	
Tipo de muestras	Hojas número 11 (experimentos de infección)
Procedimiento de procesado	Homogeneización mediante N <sub>2</sub> (l)
Condiciones de almacenamiento de las muestras	-80 °C
Réplicas biológicas	Las hojas de diferentes plantas fueron agrupadas en caso de necesidad para obtener suficiente masa de tejido para las extracciones de RNA (4dpi, 6≤n≤8; 10dpi, n=2-3 para cada conjunto). Cada conjunto se trató como una réplica biológica y los experimentos de qRT-PCR se llevaron a cabo con 4≤n≤7 réplicas (conjuntos) para cada tratamiento y dpi (experimentos de infección).
<b>Extracción de RNA</b>	
Procedimiento	Extracción con fenol ácido
Reactivos	TRIzol (Invitrogen)
Tratamiento con DNasa	DNase I Amp Grade (Invitrogen), 15 min a temperatura ambiente
Evaluación de contaminación	< 3/
Cuantificación de ácidos nucleicos	Absorbancia a 260 nm
Instrumento y método	NanoDrop
Pureza (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )	>1.8
Integridad del RNA	Analizada por electroforesis en gel de agarosa
<b>Transcripción reversa</b>	
Condiciones de reacción completas	Protocolo modificado a partir de [347]
Cantidad de RNA y volumen de reacción	100 ng de RNA, 20 µL
Oligonucleótido cebador	Cebadores del tipo tallo y lazo ("stem-loop") diseñados para cada miR a amplificar, más cebadores reversos para cada gen de referencia a ensayar.
Transcriptasa reversa	SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen).
Temperatura y tiempo de reacción	30 min 16 °C, (30 seg 30 °C, 30 seg 42 °C, 30 seg 50 °C) x 60 ciclos, 5 min 85 °C
<b>Protocolo de qPCR</b>	
Condiciones de reacción completas (*)	5 min 95 °C, (15 s 95 °C, 1 min 60 °C) x 45 ciclos

Cantidad de cDNA y volumen de reacción	2 µL de una dilución 1/20 del cDNA sintetizado, en un volumen final de reacción de 20 µL.
Concentración de Cebadores, Mg <sup>2+</sup> y dNTPs	3mM Mg <sup>2+</sup> , 200 nM cebadores, 0,2 mM de dNTPs
Polimerasa	Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen)
Buffer	20 mM Tris-HCL (pH = 8.4), 50 mM KCl
Modelo y fabricante del instrumento de qPCR	ABI 7500, Applied Biosystems
<b>Validación de las qPCRs</b>	
Especificidad	Analizada por electroforesis en gel de agarosa y parámetros de la curva de fusión (“melting curve”) de cada corrida de qPCR.
Método de cálculo de la eficiencia de la qPCR	Eficiencia promedio de PCR por amplicón fue calculada por el programa LingRegPCR ([404])
<b>Análisis de los datos</b>	
Programa de análisis de qPCR	Programa LinRegPCR
Método de determinación de los valores de Cq	Programa LinRegPCR
Identificación de outliers	Programa LinRegPCR
Justificación del número y elección de genes de referencia	Se ensayó la estabilidad relativa de 4 conocidos genes de referencia (GAPC1, AT3G04120; TUB4, AT5G44340; UBQ5, AT3G62250; y EF1-α, AT5G60390, usando el algoritmo de determinación de estabilidad Bestkeeper. UBQ5 fue hallado el gen de referencia más estable.
Descripción del método de normalización	Fórmula desarrollada en [318]:  $R = \frac{E_{target}^{-(control\ Ct\ mean - sample\ Ct\ mean)}}{E_{reference}^{-(control\ Ct\ mean - sample\ Ct\ mean)}}$ Incorporada en el programa fgStatistics
Número de réplicas técnicas	3
Método estadístico	Prueba de permutación
Programa informático	fgStatistics software (Di Rienzo J.A, 2009, <a href="http://sites.google.com/site/fgStatistics/">http://sites.google.com/site/fgStatistics/</a> )
Repetibilidad (variación intra-ensayo) (SD de valores Cq)	Entre 0.07 y 0.20, dependiendo del amplicón ensayado.

(\*) Se muestran condiciones genéricas para un ensayo típico de qPCR. Otras temperaturas de unión al templado y extensión fueron usadas para diferentes amplicones.

## B: RT-qPCR de mRNAs.

<b>Diseño experimental</b>	
Grupos de control	<i>A.thaliana</i> Col0 inoculadas con buffer (experimentos de infección) / <i>A.thaliana</i> Col0 rociadas con 0.5 mL de una solución de H <sub>2</sub> O pH = 7.0 (experimentos de hormonas)
Grupos de tratamiento	<i>A.thaliana</i> Col0 inoculadas con cepas JPN1 o UK1 de TuMV (experimentos de infección) / <i>A.thaliana</i> Col0 rociadas con 0.5 mL de una solución de 0.5 mM ácido salicílico o 0.5 mM metil jasmonato (experimentos de hormonas)

<b>Muestras</b>	
Tipo de muestras	Hojas número 11 (experimentos de infección) / hojas de roseta (experimentos de hormonas)
Procedimiento de procesado	Homogeneización mediante N <sub>2</sub> (l)
Condiciones de almacenamiento de las muestras	-80 °C
Réplicas biológicas	Las hojas de diferentes plantas fueron juntadas en caso de necesidad para obtener suficiente masa de tejido para las extracciones de RNA (4dpi, 6≤n≤8; 10dpi, n=2-3 para cada conjunto). Cada conjunto se trató como una réplica biológica y los experimentos de qRT-PCR se llevaron a cabo con 4≤n≤7 réplicas (conjuntos) para cada tratamiento y dpi (experimentos de infección) / n=4-5 para cada tratamiento y tiempo post-tratamiento (experimentos de hormonas)
<b>Extracción de RNA</b>	
Procedimiento	Extracción con fenol ácido
Reactivos	TRIzol (Invitrogen)
Tratamiento con DNasa	DNase I Amp Grade (Invitrogen), 15 min a temperatura ambiente
Evaluación de contaminación	< 3/
Cuantificación de ácidos nucleicos	Absorbancia a 260 nm
Instrumento y método	NanoDrop
Pureza (A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> )	>1.8
Integridad del RNA	Analizada por electroforesis en gel de agarosa
<b>Transcripción reversa</b>	
Condiciones de reacción completas	Como se describen en las instrucciones del fabricante (Invitrogen®)
Cantidad de RNA y volumen de reacción	1 µg de RNA, 20 µL
Oligonucleótido cebador	Random primers (Invitrogen)
Transcriptasa reversa	M-MLV (Invitrogen).
Temperatura y tiempo de reacción	10 min 50 °C, 50 min 37 °C, 15 min 70 °C.
<b>Protocolo de qPCR</b>	
Condiciones de reacción completas (*)	5 min 95 °C, (15 s 95 °C, 30 s 60 °C, 40 s 72 °C) x 45 ciclos
Cantidad de cDNA y volumen de reacción	2 µL de una dilución 1/20 del cDNA sintetizado, en un volumen final de reacción de 20 µL.
Concentración de Cebadores, Mg <sup>2+</sup> y dNTPs	3 mM Mg <sup>2+</sup> , 200 nM cebadores, 0,2 mM dNTPs
Polimerasa	Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen)
Buffer	20 mM Tris-HCL (pH = 8.4), 50 mM KCl
Modelo y fabricante del instrumento de qPCR	ABI 7500, Applied Biosystems
<b>Validación de las qPCRs</b>	
Especificidad	Analizada por electroforesis en gel de agarosa y parámetros de la curva de fusión ("melting curve") de cada corrida de qPCR.
Método de cálculo de la eficiencia de la qPCR	Eficiencia promedio de PCR por amplicón fue calculada por el programa LingRegPCR ([404])

<b>Análisis de los datos</b>	
Programa de análisis de qPCR	Programa LinRegPCR
Método de determinación de los valores de Cq	Programa LinRegPCR
Identificación de outliers	Programa LinRegPCR
Justificación del número y elección de genes de referencia	Se ensayó la estabilidad relativa de 4 conocidos genes de referencia (GAPC1, AT3G04120; TUB4, AT5G44340; UBQ5, AT3G62250; y EF1- $\alpha$ , AT5G60390, usando el algoritmo de determinación de estabilidad Bestkeeper. UBQ5 fue hallado el gen de referencia más estable.
Descripción del método de normalización	Fórmula desarrollada en [318]:  $R = \frac{E_{target}^{(control\ Ct\ mean - sample\ Ct\ mean)_{target}}}{E_{reference}^{(control\ Ct\ mean - sample\ Ct\ mean)_{reference}}}$ Incorporada en el programa fgStatistics
Número de réplicas técnicas	3
Método estadístico	Prueba de permutación
Programa informático	fgStatistics software (Di Rienzo J.A, 2009, <a href="http://sites.google.com/site/fgStatistics/">http://sites.google.com/site/fgStatistics/</a> )
Repetibilidad (variación intra-ensayo) (SD de valores Cq)	Entre 0.05 y 0.20, dependiendo del amplicón ensayado.

(\*) Se muestran condiciones genéricas para un ensayo típico de qPCR. Otras temperaturas de unión al templado y extensión fueron usadas para diferentes amplicones.

## APÉNDICE F. LISTA DE OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS

**Tabla F1. Lista de cebadores utilizados para clonado y transgénesis de construcciones reporteras PmiR164a:GUS y P35S:GUS del Capítulo 2 de esta Tesis.**

Cebador/ Identificador AGI	Descripción	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Notas
PMIR 164a	Amplifican región de 2522 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción del miR164a	<u>CTGCAG</u> CATGCCCATGAACCTCAGC	CACCCGCATTCCAAGCA	Subrayadas las bases del <i>Forward primer</i> con sitio de corte de PstI
P164-300	Cebador complementario a región clonada del PmiR164a	AGTTCAACCCCTCTTTTGCGTG		Para verificación de presencia y dirección del inserto en líneas transgénicas PmiR164a:GUS
35S	Cebador complementario a región clonada del P35S	ATCTCCAACCTGACGTAAGGGA		Para verificación de presencia y dirección del inserto en líneas transgénicas P35S:GUS
INTRO AKK	Cebador complementario a región clonada del plásmido pAKK 1431		GCAAACACCTGCTGAAACCTTT	Para verificación de presencia y dirección del inserto en líneas transgénicas PmiR164a:GUS y P35S:GUS
GUS	Amplifican región del transgén <i>uidA</i>	GATAGCGCGTGACAAAAACC	GGGATCCAGGCCTTTGTTGCCTCCCTGCTG	Para verificación de presencia de gen <i>uidA</i> en todas las líneas transgénicas
AT3G18780	Actina-2	AACATTGTGCTCAGTGGTGG	TCATCATACTCGGCCTTGG	Control interno

**Tabla F2. Lista de cebadores utilizados para análisis por PCR y qPCR de mRNAs del Capítulo 2 de esta Tesis.**

Identificador AGI	Descripción	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Notas
AT1G27450	APT1	TCCCAGAATCGCTAAGATTGCC	CCTTCCCTTAAGCTCTG	Confirmación de tratamiento con GA3
AT5G25610	RD22	GTGGCTAAGAAGAAGCACCGATGC	CTCTAATTTTATTATAGGTTTTTGCAAAC	Confirmación de tratamiento con ABA
S70188	SAUR-AC1	TTGAGGAGTTTCTGGGTGC	CATGGTATTGTTAAGCCGCC	Confirmación de tratamiento con IAA
AT3G15170	CUC1	TCTGCCGTTCTGCAATTG	ATGAAAGCTCGCATCGGTATG	
AT5G53950	CUC2	ATGAAAGCTCGCATCGGTATG	TAGCACCAACACAACCGTCACA	
AT2G47585	Pre-miR164a	CCCTCATGTGCTTGGAAATG	GCAAATGAGACGGATTTTCGTG	
AT5G60390	EF1-alpha Elongation factor 1-alpha	ATTGGTAACGGTTACGCC	TCTCCTTACCAGAACGCCTGTC	Gen de referencia para qRT-PCR

**Tabla F3. Lista de oligonucleótidos utilizados en el Capítulo 3 de esta Tesis.**

Identificador	Descripción	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Notas
	RT-157		GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACGTGC	Cebador tipo lazo y tallo (" <i>stem-loop</i> ") utilizados para sintetizar cDNA de miRs maduros. Diseñado en base a [347]
	RT-164		GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACTGCA	Cebador tipo lazo y tallo (" <i>stem-loop</i> ") utilizados para sintetizar cDNA de miRs maduros. Diseñado en base a [347]
	RT-166		GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACGGGG	Cebador tipo lazo y tallo (" <i>stem-loop</i> ") utilizados para sintetizar cDNA de miRs maduros. Diseñado en base a [347]
	RT-167		GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACTAGATC	Cebador tipo lazo y tallo (" <i>stem-loop</i> ") utilizados para sintetizar cDNA de miRs maduros. Diseñado en base a [347]
	RT-171		GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACGATA	Cebador tipo lazo y tallo (" <i>stem-loop</i> ") utilizados para sintetizar cDNA de miRs maduros. Diseñado en base a [347]
	miR156	CGCGTGACAGAAGAGAGT		Cebador utilizado para análisis de qPCR de

				miRNAs maduros
	miR164	CTTCGTGCACGTGCCCTGCTT		Cebador utilizado para análisis de qPCR de miRNAs maduros
	miR165	TCGCGTCGGACCAGGCTTCAT		Cebador utilizado para análisis de qPCR de miRNAs maduros
	miR167	TCGCGTGAAGTGCCAGCAT		Cebador utilizado para análisis de qPCR de miRNAs maduros
	miR171	TCGCGTGATTGAGCCGCGCC		Cebador utilizado para análisis de qPCR de miRNAs maduros
	Cebador Universal Reverse		GTGCAGGGTCCGAGGT	Cebador para qPCR de miRs, complementario a parte interna de la estructura de lazo y tallo de los cebadores para cDNA miRs. En base a [347]
	5' RACE Cebador externo	CGACTGGAGCACGAGGACTGA		Complementario a parte de la secuencia del adaptador de 5' RLM-RACE
	5' RACE Cebador anidado	GGACTGACATGGACTGAAGGAGTA		Complementario a parte de la secuencia del adaptador de 5' RLM-RACE
	5' RACE Similar a SPL2 Cebador externo		ATTCGGGGCCTGTGCAGTT	Complementario a parte de la secuencia de gen de tabaco predicho blanco de miR156
	5' RACE Similar a SPL2 Cebador anidado		GCACACCTGTGGAATTGCC	Complementario a parte de la secuencia de gen de

				tabaco predicho blanco de miR156
	5' RACE Similar a ATHB-8 Cebador externo		AACACTCCGGCACACTCCATGC	Complement ario a parte de la secuencia de gen de tabaco predicho blanco de miR166
	5' RACE Similar a ATHB-8 Cebador anidado		CGGCAGTCGCGAAACCAAGA	Complement ario a parte de la secuencia de gen de tabaco predicho blanco de miR166
	5' RACE Similar a SCL6 Cebador externo		GGAGGGTGAGGCCAATGCAGTTA	Complement ario a parte de la secuencia de gen de tabaco predicho blanco de miR171
	5' RACE Similar a SCL6 Cebador anidado		GCAAAGTGTGCAACTGGTGAGATCTC	Complement ario a parte de la secuencia de gen de tabaco predicho blanco de miR171
SGN-U435399	BLAST: identical to squamosa promoter binding protein-like 2 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	GCAGTCATTATTGCCAGGGATCC	TGAAACAGTCTCAGGCTCGGATG	qPCR del mRNA encontrado como blanco de miR156 en tabaco por RLM- RACE
SGN-U439906	BLAST: similar to HD-zip transcription factor (athb- 8)	CCACTTGACATCTCAGCATCCGC	CCGTGCAACCATGAGAAATAGCA	qPCR del mRNA encontrado como blanco de miR166 en tabaco por RLM- RACE
SGN-U428805	BLAST : scarecrow- like transcription factor 6 (SCL6)	TACAACACTACAGCAGCAGCAGCAGC	CTCCTTGCAATAAAAAGCAGCCC	qPCR del mRNA encontrado como blanco de miR166 en tabaco por RLM- RACE
	Pre-miR166a	GTTGAGGAGAATGTCGTCTGG	GTTGAGGGGAATGAAGCCT	
SGN-U439040	TD1-chPrec Precursor de treonina	CCGCCGGCTAAATCTCCACATC	CAATGGGGGAGCTTTTAGCCGT	Para qPCR de gen de vía

	deaminasa 1 de cloroplasto			biosintética de aminoácidos
SGN-U444353	AAATransf3 Transferasa de aminoácidos de cadena ramificada.	TGGTGTCCGTGGACGAATTG3	CTTAAGCTCGACAATCCAACCC	Para qPCR de gen de vía biosintética de aminoácidos
SGN-U440331	AtKARI ketol-acid reducto isomerasa	CGGCGGCTACGGTCACTTCTTT	CGGCTTAAGCGATGGGGACAAA	Para qPCR de gen de vía biosintética de aminoácidos
SGN-U430910	Asn2 asparagina sintasa 2	AACTCTCAGCCAAGCGTTCCC	TGCCAACCGTTGATGAGCAAGA	Para qPCR de gen de vía biosintética de aminoácidos
SGN-U422294	GHmetT glicina hidroximetil-transferasa	GGTTGGATCTGCAAAATGGGG	TCCACCGTGGGGAAGATCAAGG	Para qPCR de gen de vía biosintética de aminoácidos
SGN-U446573	EF-1 $\alpha$ Elongation factor 1-alpha	GATTGGTGGTATTGGTACTGTC	AGCTTCGTGGTGCATCTC	qRT-PCR, para selección de gen de referencia.
SGN-U431117	Actin	ACGCCAGTGCCGTACAACA	ATCGCGGACAATTTCCCGTTC	qRT-PCR, para selección de gen de referencia.
GB:X58253	Ubi3	GCCGACTACAACATCCAGAAGG	TGCAACACAGCAAGCTTAACC	qRT-PCR, para selección de gen de referencia.
	TMV-CP	CCCACGACTGCCGAAACGTTAG	TGCAGGACCAGAGGTCCAAACC	

**Tabla F4. Lista de cebadores utilizados para análisis de qPCR de mRNAs del Capítulo 4 de esta Tesis.**

Identificador AGI	Descripción	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Notas
AT5G39610	ORE1; ANAC092/ATNAC2/ATNAC6 (Arabidopsis NAC domain containing protein 92)	GTGTTTTCCAAAAACGTGCCGATG	TGCTTCGGTTTCTTGGTCGGAGA	
AT4G19810	Glycosyl hydrolase family 18 protein	GTGCGACGGAGATGACCAACTTCGG	GATCAAACAGAGCGGCTGGTGACC	
AT2G02990	RNS1 (RIBONUCLEASE 1); endoribonuclease	CTCCGAGATTCTTTGATG	GAGATGGTTAATGGGTGAA	
AT1G19610	PDF1.4 defensin-like protein 19	ATGGCGGTGGAAGGAAGAATTTGCG	AACTGAGCGTGACAAGCCCCGTGTG	
AT2G35980	YLS9 late embryogenesis abundant hydroxyproline-rich glycoprotein	CATCAGTCCCACCACCAGCTCCAA	CGAGGTCGGACGATGAGCCAGAAGA	
AT5G64120	peroxidase 71	ATTGTCCGAAACGCCGTGAATGCTG	GCTTCGAGCTGCGTTTTGGCGTTG	
AT2G32680	RLP23 receptor like protein 23	TTTACAGGTTTCCAAGGTTCCGCG	CGCAAACATGGAGGAATGGGACCAG	
AT4G27280	EF-hand, calcium binding motif-containing protein	TGGCGTCACCAAAGTCAACCACAAG	CGCACCGTCGCAGTCAAAATCACC	
AT3G29035	ORS1; NAC3 NAC domain-containing protein 3	CTTTTCAACTTGTAGTGGC	ACTAGTATAAGAGCTTGGTTGC	

AT3G56400	WRKY70 putative WRKY transcription factor 70	CACCAACGCAGAACTCCCA	TTCTCCGTGGACGAACCATG	
AT1G12520	CCS copper chaperone for SOD1	GATCTCACAAACGGAGCAGCCAGCA	TTCTAGCAATCACTGCGGCGGTCAA	
AT1G08830	CSD1 Superoxide dismutase [Cu-Zn]	CCAAAGAGAGACGAAGCA	GCCTTTGTGATCTCAGGA	
AT2G28190	CSD2 Superoxide dismutase [Cu-Zn]	GCTCCAGAAGATGAGTGCCGTCA	CCACCCTTCCGAGGTCATCCTT	
AT5G18100	CSD3 copper/zinc superoxide dismutase 3	GGCGATAACAACGTCGAGGCTGTC	GCCAGCATGACGCTTCTCCTCGTTC	
AT3G22890	APS1 ATP sulfurylase 1	TGGGCAAGTCCACTCGGAGGTT	CGACGGGGTTACCATCGGAATT	
AT5G37020	ARF8 auxin response factor 8	AGATGTTTGCTATCGAAGGGTTGTTG	CCATGGGTCATCACCAAGGAGAAG	
AT2G33770	PHO2 putative ubiquitin-conjugating enzyme E2 24	TTTGAACCTGTCTCTGTTT	GTAAGACTCAGATAATGCCA	
AT5G45890	SAG12 senescence-associated protein 12	GCGTTTTTCAGCGGTTGCGGCTATT	TCAGTTGTCAAGCCGCCAGTCGCT	
AT3G15030	TCP4 transcription factor	TTGGGAGCAGCAGTCGTCGGAA	CCAAGCACGGATCATGGGACTG	
AT3G62980	TIR1 protein TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1	GCCTCTCTATCTGGCCTCTTGAC	AGGGCAGCTCTCTGGTCTCGAGTCC	Fuente: [232]
AT3G45140	LOX2 lipoxygenase 2	AACAGGCGACCTAGTGATGG	GCTCATTGGCCCAAGATGC	Confirmación de tratamiento con MeJA
AT2G14610	PR1 pathogenesis-related protein 1	ACAACCTAAGAGGCAACTGCAG	CCTTCTCGCTAACCCACAT	Confirmación de tratamiento con SA
AT5G60390	EF1-alpha Elongation factor 1-alpha	ATTGGTAACGGTTACGCCCC	TCTCCTTACCAGAACGCCTGTC	qRT-PCR, para selección de gen de referencia. Fuente: [292]
AT3G62250	UBQ5 ubiquitin-40S ribosomal protein S27a-3	CGGACCAGCAGCGATTGATT	ACGGAGGACGAGATGAAGCG	qRT-PCR, para selección de gen de referencia.
AT3G04120	GAPC1 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	ATGGCTGACAAGAAGATTAGG	TAGTGATGAAGGGTCTGTTG	qRT-PCR, para selección de gen de referencia.
AT5G44340	TUB4 tubulin beta-4 chain	CTGTTCCGTACCCTCAAGC	AGGGAAACGAAGACAGCAAG	qRT-PCR, para selección de gen de referencia.
	Cuantificación de TuMV	GAAGCCATACCAAACGACGAGCG	GCAACTTTATCCGCTCCATCCA	Complementariedad a secuencia conservada entre helicasa de TuMV JPN1 y UK1.

**Tabla F5. Lista de cebadores tipo lazo y tallo (“*stem-loop*”) utilizados para sintetizar cDNA de miRs maduros seleccionados del Capítulo 4 de esta Tesis.**

Identificador AGI	Descripción	Reverse Primer (5'-3')	Notas
AT2G47585	miR164a/b	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTGCACG	Diseñado en base a [347]
AT4G05105	miR397a	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCATC	Diseñado en base a [347]
AT2G03445	miR398a	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAGG	Diseñado en base a [347]
AT2G47015	miR408	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGCCA	Diseñado en base a [347]

**Tabla F6. Lista de cebadores utilizados para análisis de qPCR de miRNAs maduros del Capítulo 4 de esta Tesis.**

Identificador AGI	Descripción	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Notas
AT2G47585	miR164a/b	TCGCGTGGAGAAGCAGGGCA		
AT4G05105	miR397a	TCGCGTCATTGAGTGACGCGT		
AT2G03445	miR398a	TCGCGTGTGTTCTCAGGTCAC		
AT2G47015	miR408	TCGCGATGCACTGCCTCTCC		
	Cebador Universal Reverse		GTGCAGGGTCCGAGGT	Cebador complementario a parte interna de la estructura de lazo y tallo de los cebadores para cDNA miRs. En base a [347]

## APÉNDICE G. COCIENTES DE EXPRESIÓN Y P-VALORES DE TRANSCRIPTOS SELECTOS DE ARABIDOPSIS ANTE INFECCIÓN CON JPN1 O UK1.

Gen	Identificador AGI	DPI <sup>a</sup>	Tratamiento <sup>b</sup>	Log2 cambio relativo <sup>c</sup>	Cambio relativo lineal	p-valor <sup>d</sup>	q-valor (corrección FDR) <sup>e</sup>	Prueba <sup>f</sup>	Nivel de significancia <sup>g</sup>
PDF1.4	AT1G19610	4	UK1	2.39	5.23	0.002	0.00781	Signif.	**
ORE1	AT5G39610	4	UK1	2.81	7	0.0039	0.01484	Signif.	**
CSD3	AT5G18100	4	UK1	0.46	1.38	0.0051	0.01719	Signif.	**
EF-hand calcium	AT4G27280	4	UK1	1.49	2.8	0.0058	0.01914	Signif.	**
TCP4	AT3G15030	4	JPN1	-0.42	0.75	0.0066	0.02031	Signif.	**
PDF1.4	AT1G19610	4	JPN1	1.36	2.57	0.0078	0.02109	Signif.	**
CSD3	AT5G18100	4	JPN1	0.31	1.24	0.0098	0.02266	Signif.	**
EF-hand calcium	AT4G27280	4	JPN1	1.24	2.37	0.0113	0.02305	Signif.	*
Peroxidasa 71	AT5G64120	4	UK1	1.43	2.69	0.0115	0.02344	Signif.	*
TIR1	AT3G62980	4	JPN1	0.42	1.34	0.0133	0.02422	Signif.	*
miR397	AT4G05105	4	JPN1	-0.43	0.74	0.0157	0.02539	Signif.	*
TIR1	AT3G62980	4	UK1	0.57	1.48	0.0189	0.02617	Signif.	*
ARF8	AT5G37020	4	JPN1	-0.40	0.76	0.0215	0.02734	Signif.	*
ORE1	AT5G39610	4	JPN1	0.89	1.85	0.0235	0.02852	Signif.	*
LOX2	AT3G45140	4	UK1	0.51	1.42	0.0267	0.02969	Signif.	*
RLP23	AT2G32680	4	UK1	1.91	3.85	0.0269	0.03008	Signif.	*
WRKY70	AT3G56400	4	UK1	1.17	2.25	0.0395	0.03086	No signif	*
CCS1	AT1G12520	4	UK1	0.45	1.37	0.0389	0.03242	No signif	
miR164	AT2G47585	4	JPN1	-0.40	0.76	0.0463	0.03281	No signif	

<b>miR164</b>	AT2G47585	4	UK1	0.29	1.22	0.0514	0.03320	No signif
<b>Glicosil hidrolasa</b>	AT4G19810	4	UK1	0.43	1.35	0.0764	0.03594	No signif
<b>ARF8</b>	AT5G37020	4	UK1	-0.18	0.88	0.0939	0.03672	No signif
<b>CSD1</b>	AT1G08830	4	UK1	0.52	1.43	0.0988	0.03750	No signif
<b>miR397</b>	AT4G05105	4	UK1	0.18	1.13	0.1002	0.03828	No signif
<b>LOX2</b>	AT3G45140	4	JPN1	0.24	1.18	0.111	0.03906	No signif
<b>miR398</b>	AT2G03445	4	JPN1	-0.18	0.88	0.1763	0.04023	No signif
<b>miR398</b>	AT2G03445	4	UK1	0.25	1.19	0.1816	0.04063	No signif
<b>CSD2</b>	AT2G28190	4	JPN1	-0.10	0.93	0.2373	0.04219	No signif
<b>Glicosil hidrolasa</b>	AT4G19810	4	JPN1	0.10	1.07	0.3097	0.04375	No signif
<b>CCS1</b>	AT1G12520	4	JPN1	0.07	1.05	0.3472	0.04414	No signif
<b>CSD1</b>	AT1G08830	4	JPN1	0.07	1.05	0.3492	0.04453	No signif
<b>RLP23</b>	AT2G32680	4	JPN1	-0.45	0.73	0.3551	0.04492	No signif
<b>TCP4</b>	AT3G15030	4	UK1	-0.04	0.97	0.3609	0.04531	No signif
<b>Peroxidasa 71</b>	AT5G64120	4	JPN1	0.08	1.06	0.3935	0.04609	No signif
<b>CSD2</b>	AT2G28190	4	UK1	0.04	1.03	0.4224	0.04648	No signif
<b>WRKY70</b>	AT3G56400	4	JPN1	0.07	1.05	0.4335	0.04727	No signif
<b>YLS9</b>	AT2G35980	4	UK1	∞	∞	∞		
<b>APS1</b>	AT3G22890	4	JPN1	N/A	N/A	N/A		
<b>APS1</b>	AT3G22890	4	UK1	N/A	N/A	N/A		
<b>PHO2</b>	AT2G33770	4	JPN1	N/A	N/A	N/A		
<b>PHO2</b>	AT2G33770	4	UK1	N/A	N/A	N/A		
<b>miR408</b>	AT2G47015	4	JPN1	N/D	N/D	N/D		
<b>miR408</b>	AT2G47015	4	UK1	N/D	N/D	N/D		

<b>ORS1</b>	AT3G29035	4	JPN1	N/D	N/D	N/D			
<b>ORS1</b>	AT3G29035	4	UK1	N/D	N/D	N/D			
<b>RNS1</b>	AT2G02990	4	JPN1	N/D	N/D	N/D			
<b>RNS1</b>	AT2G02990	4	UK1	N/D	N/D	N/D			
<b>SAG12</b>	AT5G45890	4	JPN1	N/D	N/D	N/D			
<b>SAG12</b>	AT5G45890	4	UK1	N/D	N/D	N/D			
<b>YLS9</b>	AT2G35980	4	JPN1	N/D	N/D	N/D			
<b>TCP4</b>	AT3G15030	10	JPN1	-0.97	0.51	0.0005	0.0016	Signif.	***
<b>CSD1</b>	AT1G08830	10	JPN1	2.02	4.06	0.0007	0.0020	Signif.	***
<b>CCS1</b>	AT1G12520	10	JPN1	1.36	2.56	0.001	0.0035	Signif.	**
<b>miR408</b>	AT2G47015	10	UK1	2.08	4.22	0.0013	0.0043	Signif.	**
<b>miR398</b>	AT2G03445	10	UK1	2.54	5.8	0.0018	0.0070	Signif.	**
<b>Peroxidasa 71</b>	AT5G64120	10	UK1	1.33	2.52	0.0022	0.0090	Signif.	**
<b>YLS9</b>	AT2G35980	10	UK1	2.69	6.47	0.0023	0.0094	Signif.	**
<b>ORS1</b>	AT3G29035	10	UK1	2.38	5.2	0.0032	0.0125	Signif.	**
<b>CSD2</b>	AT2G28190	10	JPN1	1.12	2.17	0.0032	0.0133	Signif.	**
<b>CCS1</b>	AT1G12520	10	UK1	1.64	3.13	0.0033	0.0137	Signif.	**
<b>RNS1</b>	AT2G02990	10	UK1	1.83	3.65	0.0038	0.0145	Signif.	**
<b>PDF1.4</b>	AT1G19610	10	JPN1	1.04	2.05	0.004	0.0152	Signif.	**
<b>RLP23</b>	AT2G32680	10	UK1	2.24	4.74	0.0049	0.0168	Signif.	**
<b>WRKY70</b>	AT3G56400	10	UK1	0.80	1.74	0.0052	0.0176	Signif.	**
<b>CSD1</b>	AT1G08830	10	UK1	2.72	6.59	0.0056	0.0184	Signif.	**
<b>ORE1</b>	AT5G39610	10	UK1	1.60	3.03	0.0064	0.0199	Signif.	**
<b>PDF1.4</b>	AT1G19610	10	UK1	2.83	7.11	0.0064	0.0195	Signif.	**

<b>miR408</b>	AT2G47015	10	JPN1	1.05	2.07	0.008	0.0215	Signif.	**
<b>TIR1</b>	AT3G62980	10	UK1	-0.97	0.51	0.0093	0.0223	Signif.	**
<b>LOX2</b>	AT3G45140	10	JPN1	-0.76	0.59	0.015	0.0246	Signif.	*
<b>miR398</b>	AT2G03445	10	JPN1	0.70	1.62	0.0155	0.0250	Signif.	*
<b>ARF8</b>	AT5G37020	10	UK1	-0.34	0.79	0.0194	0.0266	Signif.	*
<b>miR397</b>	AT4G05105	10	JPN1	-0.56	0.68	0.0232	0.0281	Signif.	*
<b>EF-hand calcium</b>	AT4G27280	10	UK1	0.87	1.83	0.0357	0.0313	No signif	
<b>TIR1</b>	AT3G62980	10	JPN1	-0.56	0.68	0.0374	0.0320	No signif	
<b>YLS9</b>	AT2G35980	10	JPN1	0.39	1.31	0.0374	0.0316	No signif	
<b>ORS1</b>	AT3G29035	10	JPN1	0.88	1.84	0.0516	0.0336	No signif	
<b>ORE1</b>	AT5G39610	10	JPN1	-0.97	0.51	0.055	0.0340	No signif	
<b>RNS1</b>	AT2G02990	10	JPN1	0.56	1.47	0.059	0.0348	No signif	
<b>TCP4</b>	AT3G15030	10	UK1	-0.22	0.86	0.0619	0.0355	No signif	
<b>CSD2</b>	AT2G28190	10	UK1	0.59	1.51	0.0796	0.0363	No signif	
<b>WRKY70</b>	AT3G56400	10	JPN1	-0.38	0.77	0.0949	0.0371	No signif	
<b>LOX2</b>	AT3G45140	10	UK1	-0.36	0.78	0.0997	0.0379	No signif	
<b>Glicosil hidrolasa</b>	AT4G19810	10	UK1	0.65	1.57	0.1161	0.0395	No signif	
<b>Glicosil hidrolasa</b>	AT4G19810	10	JPN1	0.34	1.27	0.1361	0.0398	No signif	
<b>CSD3</b>	AT5G18100	10	JPN1	-0.14	0.91	0.2311	0.0418	No signif	
<b>RLP23</b>	AT2G32680	10	JPN1	0.34	1.27	0.2525	0.0426	No signif	
<b>miR397</b>	AT4G05105	10	UK1	-0.09	0.94	0.2648	0.0430	No signif	
<b>miR164</b>	AT2G47585	10	JPN1	-0.10	0.93	0.2683	0.0434	No signif	
<b>CSD3</b>	AT5G18100	10	UK1	-0.09	0.94	0.3678	0.0457	No signif	
<b>ARF8</b>	AT5G37020	10	JPN1	-0.03	0.98	0.4355	0.0477	No signif	

<b>Peroxidasa 71</b>	AT5G64120	10	JPN1	0.01	1.01	0.4533	0.0484	No signif	
<b>miR164</b>	AT2G47585	10	UK1	-0.01	0.99	0.4575	0.0488	No signif	
<b>EF-hand calcium</b>	AT4G27280	10	JPN1	0.00	1	0.4975	0.0500	No signif	
<b>APS1</b>	AT3G22890	10	JPN1	N/A	N/A	N/A			
<b>APS1</b>	AT3G22890	10	UK1	N/A	N/A	N/A			
<b>PHO2</b>	AT2G33770	10	JPN1	N/A	N/A	N/A			
<b>PHO2</b>	AT2G33770	10	UK1	N/A	N/A	N/A			
<b>SAG12</b>	AT5G45890	10	JPN1	N/D	N/D	N/D			
<b>SAG12</b>	AT5G45890	10	UK1	N/D	N/D	N/D			
<b>CSD1</b>	AT1G08830	16	JPN1	2.59	6.02	0.0002	0.00039	Signif.	***
<b>CSD1</b>	AT1G08830	16	UK1	2.44	5.42	0.0002	0.00078	Signif.	***
<b>CCS1</b>	AT1G12520	16	JPN1	1.95	3.97	0.0004	0.00117	Signif.	***
<b>CSD2</b>	AT2G28190	16	JPN1	1.85	3.71	0.0007	0.00234	Signif.	***
<b>PDF1.4</b>	AT1G19610	16	UK1	3.44	10.14	0.0009	0.00273	Signif.	***
<b>CSD3</b>	AT5G18100	16	UK1	-1.47	0.36	0.0009	0.00313	Signif.	***
<b>Peroxidasa 71</b>	AT5G64120	16	UK1	4.34	20.26	0.0012	0.00391	Signif.	**
<b>CCS1</b>	AT1G12520	16	UK1	1.72	3.4	0.0013	0.00508	Signif.	**
<b>CSD2</b>	AT2G28190	16	UK1	1.78	3.54	0.0013	0.00469	Signif.	**
<b>EF-hand calcium</b>	AT4G27280	16	JPN1	1.77	3.51	0.0016	0.00547	Signif.	**
<b>miR398</b>	AT2G03445	16	JPN1	1.64	3.12	0.0016	0.00586	Signif.	**
<b>ORE1</b>	AT5G39610	16	JPN1	1.59	3.01	0.0016	0.00625	Signif.	**
<b>PHO2</b>	AT2G33770	16	UK1	-1.40	0.38	0.0016	0.00664	Signif.	**
<b>miR164</b>	AT2G47585	16	UK1	-1.18	0.44	0.0019	0.00742	Signif.	**
<b>ORE1</b>	AT5G39610	16	UK1	1.62	3.07	0.0021	0.00820	Signif.	**

<b>ORS1</b>	AT3G29035	16	UK1	-1.94	0.26	0.0021	0.00859	Signif.	**
<b>RLP23</b>	AT2G32680	16	JPN1	1.93	3.9	0.0023	0.00977	Signif.	**
<b>ORS1</b>	AT3G29035	16	JPN1	-1.00	0.5	0.0024	0.01016	Signif.	**
<b>CSD3</b>	AT5G18100	16	JPN1	-1.25	0.42	0.0025	0.01055	Signif.	**
<b>EF-hand calcium</b>	AT4G27280	16	UK1	2.09	4.25	0.003	0.01133	Signif.	**
<b>WRKY70</b>	AT3G56400	16	JPN1	2.15	4.43	0.003	0.01094	Signif.	**
<b>WRKY70</b>	AT3G56400	16	UK1	2.10	4.28	0.0031	0.01211	Signif.	**
<b>YLS9</b>	AT2G35980	16	UK1	2.27	4.83	0.0031	0.01172	Signif.	**
<b>Glicosil hidrolasa</b>	AT4G19810	16	UK1	2.02	4.06	0.0032	0.01289	Signif.	**
<b>RNS1</b>	AT2G02990	16	JPN1	4.11	17.3	0.0035	0.01406	Signif.	**
<b>YLS9</b>	AT2G35980	16	JPN1	1.38	2.6	0.0041	0.01563	Signif.	**
<b>RNS1</b>	AT2G02990	16	UK1	2.79	6.92	0.0042	0.01602	Signif.	**
<b>miR398</b>	AT2G03445	16	UK1	1.56	2.94	0.0043	0.01641	Signif.	**
<b>LOX2</b>	AT3G45140	16	UK1	1.15	2.22	0.0053	0.01797	Signif.	**
<b>miR408</b>	AT2G47015	16	UK1	-0.79	0.58	0.00560	0.01875	Signif.	**
<b>TCP4</b>	AT3G15030	16	JPN1	-0.89	0.54	0.0073	0.02070	Signif.	**
<b>PHO2</b>	AT2G33770	16	JPN1	-0.60	0.66	0.0081	0.02188	Signif.	**
<b>ARF8</b>	AT5G37020	16	JPN1	0.70	1.62	0.0132	0.02383	Signif.	*
<b>miR397</b>	AT4G05105	16	UK1	-0.67	0.63	0.0175	0.02578	Signif.	*
<b>TCP4</b>	AT3G15030	16	UK1	-0.62	0.65	0.0214	0.02695	Signif.	*
<b>RLP23</b>	AT2G32680	16	UK1	1.21	2.31	0.022	0.02773	Signif.	*
<b>Glicosil hidrolasa</b>	AT4G19810	16	JPN1	1.45	2.73	0.0264	0.02891	Signif.	*
<b>ARF8</b>	AT5G37020	16	UK1	0.40	1.32	0.0265	0.02930	Signif.	*
<b>miR164</b>	AT2G47585	16	JPN1	-0.62	0.65	0.0291	0.03047	Signif.	*

<b>miR397</b>	AT4G05105	16	JPN1	-0.58	0.67	0.056	0.03438	No signif
<b>miR408</b>	AT2G47015	16	JPN1	-0.42	0.75	0.06050	0.03516	No signif
<b>PDF1.4</b>	AT1G19610	16	JPN1	0.76	1.69	0.104	0.03867	No signif
<b>APS1</b>	AT3G22890	16	UK1	0.21	1.16	0.1901	0.04102	No signif
<b>LOX2</b>	AT3G45140	16	JPN1	-0.32	0.8	0.205	0.04141	No signif
<b>TIR1</b>	AT3G62980	16	UK1	0.03	1.02	0.4246	0.04688	No signif
<b>APS1</b>	AT3G22890	16	JPN1	0.04	1.03	0.4477	0.04805	No signif
<b>Peroxidasa 71</b>	AT5G64120	16	JPN1	0.03	1.02	0.4819	0.04922	No signif
<b>TIR1</b>	AT3G62980	16	JPN1	0.00	1	0.495	0.04961	No signif
<b>SAG12</b>	AT5G45890	16	JPN1	∞	∞	∞		
<b>SAG12</b>	AT5G45890	16	UK1	∞	∞	∞		

<sup>a</sup> DPI = días post inoculación.

<sup>b</sup> En todos los casos, las comparaciones son entre JPN1/mock o UK1/mock.

<sup>c</sup> Los valores de cambio relativo se calcularon como se describe en Materiales y Métodos. N/D = No se detecta amplificación en muestras infectadas ni mock-inoculadas. N/A = no analizado. ∞ = sólo se detecta amplificación en muestras infectadas con virus.

<sup>d</sup> p-valores se calcularon como se describe en Materiales y Métodos.

<sup>e</sup> q-valores se calcularon usando el método de frecuencia de falso descubrimiento (*False Discovery Rate, FDR*, de Benjamini y Hochberg 1995, [405]).

<sup>f</sup> En caso de que  $p\text{-value} < q\text{-value}$  la comparación fue considerada estadísticamente diferente. Las comparaciones con  $p \leq 0.05$  y cambio en cociente de acumulación  $\geq 2$  también fueron consideradas estadísticamente significativas y marcadas con \*.

<sup>g</sup> La significancia fue establecida como \* =  $0.01 \leq p \leq 0.05$ ; \*\* =  $0.001 \leq p \leq 0.01$ ;

\*\*\* =  $p \leq 0.001$ .

## APÉNDICE H. COCIENTES DE EXPRESIÓN Y P-VALORES DE TRANSCRIPTOS SELECTOS DE ARABIDOPSIS ANTE TRATAMIENTO CON SA O MeJA.

Gen	Identificador AGI	HPI <sup>a</sup>	Tratamiento <sup>b</sup>	Log2 cambio relativo <sup>c</sup>	Cambio relativo lineal	p-valor <sup>d</sup>	Signif. <sup>e</sup>
Glicosil hidrolasa	AT4G19810	4	MeJA	-1.29	0.41	0.0007	***
EF-hand calcium	AT4G27280	4	SA	3.37	9.63	0.0011	**
Peroxidasa 71	AT5G64120	4	SA	1.82	3.62	0.0013	**
WRKY70	AT3G56400	4	SA	3.62	11.46	0.0013	**
YLS9	AT2G35980	4	SA	4.35	20.46	0.0015	**
ORE1	AT5G39610	4	SA	1.86	3.73	0.0017	**
Glicosil hidrolasa	AT4G19810	4	SA	0.97	1.96	0.0029	**
RLP23	AT2G32680	4	SA	1.93	3.91	0.0055	**
RLP23	AT2G32680	4	MeJA	-1.56	0.34	0.0055	**
WRKY70	AT3G56400	4	MeJA	0.46	1.38	0.0057	**
Peroxidasa 71	AT5G64120	4	MeJA	-0.92	0.53	0.0059	**
EF-hand calcium	AT4G27280	4	MeJA	0.29	1.22	0.0568	No signif
ORE1	AT5G39610	4	MeJA	-0.45	0.73	0.115	No signif
RNS1	AT2G02990	4	SA	-0.79	0.58	0.1702	No signif
PDF1.4	AT1G19610	4	SA	0.19	1.14	0.1857	No signif
YLS9	AT2G35980	4	MeJA	-0.20	0.87	0.2609	No signif
ORS1	AT3G29035	4	MeJA	-0.17	0.89	0.2634	No signif
miR164	AT2G47585	4	SA	0.06	1.04	0.3604	No signif
PDF1.4	AT1G19610	4	MeJA	-0.04	0.97	0.3844	No signif
RNS1	AT2G02990	4	MeJA	0.12	1.09	0.3906	No signif

<b>ORS1</b>	AT3G29035	4	SA	-0.03	0.98	0.4553	<b>No signif</b>
<b>miR164</b>	AT2G47585	4	MeJA	0.00	1	0.4903	<b>No signif</b>
<b>ORE1</b>	AT5G39610	24	MeJA	-1.84	0.28	0.0013	<b>**</b>
<b>ORE1</b>	AT5G39610	24	SA	1.11	2.16	0.0038	<b>**</b>
<b>ORS1</b>	AT3G29035	24	MeJA	-0.36	0.78	0.1831	<b>No signif</b>
<b>ORS1</b>	AT3G29035	24	SA	-0.15	0.9	0.3671	<b>No signif</b>

<sup>a</sup> HPI = horas post-inducción.

<sup>b</sup> En todos los casos, las comparaciones son entre SA/mock o MeJA/mock.

<sup>c</sup> Los valores de cambio relativo se calcularon como se describe en Materiales y Métodos.

<sup>d</sup> p-valores se calcularon como se describe en Materiales y Métodos. Debido a la gran significancia estadística de la comparación menos significativa ( $p = 0.0059$  para la Peroxidasa 71 ante MeJA a 4 HPI) y el relativamente bajo número de comparaciones ( $n = 29$ ), no se realizaron correcciones por FDR.

<sup>e</sup> La significancia fue establecida como \* =  $0.01 \leq p \leq 0.05$ ; \*\* =  $0.001 \leq p \leq 0.01$ ;

\*\*\* =  $p \leq 0.001$ .

## REFERENCIAS

1. FAO, WFP, and IFAD, The State of Food Insecurity in the World 2012. Economic growth is necessary but not sufficient to accelerate reduction of hunger and malnutrition. 2012, FAO: Rome.
2. Terreno, F., Una respuesta regional a la (in)seguridad alimentaria, in RIA Revista de Investigaciones Agropecuarias. 2012, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria: Buenos Aires, Argentina. p. 114-131.
3. DFID, The Politics of Poverty: Elites, Citizens and States. Findings from ten years of DFID-funded research on Governance and Fragile States 2001–2010. 2010, DFID: London, UK.
4. FAO (2012) Experts eye commodities speculation, food price swings.
5. Strange, R.N. and P.R. Scott, Plant disease: a threat to global food security. *Annu Rev Phytopathol*, 2005. **43**: p. 83-116.
6. Loebenstein, G., Plant Virus Diseases: Economic Aspects, in Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology B.W.J. Mahy and M.H.V. van Regenmortel, Editors. 2010, Elsevier Academic Press: San Diego, CA, USA.
7. Hull, R., Matthews' Plant Virology. . Fourth edition ed. 2002, San Diego, CA.
8. Agrios, G.N., Plant Pathology. Fifth ed. 2005, San Diego, CA, USA: Elsevier Academic Press.
9. Lenardón, S.L., et al., Recent outbreak of "Mal de Río Cuarto virus" on corn in Argentina. *Plant Disease*, 1998. **82**(4).
10. Lenardón, S.L., et al., Comportamiento de híbridos comerciales de maíz frente al virus del mal de Río Cuarto en el área endémica 2006/2007., in Informe de Actualización Técnica de Maíz. 2007, EEA INTA Marcos Juárez: Argentina.
11. Yuan, D., et al., The potential impact of plant biotechnology on the Millennium Development Goals. *Plant Cell Rep*, 2011. **30**(3): p. 249-65.
12. Laursen, L., How green biotech turned white and blue. *Nat Biotechnol*, 2010. **28**(5): p. 393-5.
13. Suttle, C.A., Viruses in the sea. *Nature*, 2005. **437**(7057): p. 356-61.
14. Suttle, C.A., Marine viruses--major players in the global ecosystem. *Nat Rev Microbiol*, 2007. **5**(10): p. 801-12.
15. Van Regenmortel, M.H., et al., Virus species polemics: 14 senior virologists oppose a proposed change to the ICTV definition of virus species. *Arch Virol*, 2012.
16. Fauquet, C.M., Taxonomy, classification and nomenclature of viruses., in Encyclopedia of Viruses, A. Granoff and R.G. Webster, Editors. 1999, Academic Press: New York. p. 1730-1756.
17. Hulo, C., et al., ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(Database issue): p. D576-82.
18. Van Regenmortel, M.H., Virus species, a much overlooked but essential concept in virus classification. *Intervirology*, 1990. **31**(5): p. 241-54.
19. Van Regenmortel, M.H., et al., Guidelines to the demarcation of virus species. *Arch Virol*, 1997. **142**(7): p. 1505-18.
20. Van Regenmortel, M.H.V., et al., Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of viruses. 2000, San Diego: Academic Press.
21. Gibbs, A.J. and M.J. Gibbs, A broader definition of 'the virus species'. *Arch Virol*, 2006. **151**(7): p. 1419-22.
22. Milne, R.G., Species concept should not be universally applied to virus taxonomy--but what to do instead? *Intervirology*, 1988. **29**(5): p. 254-9.
23. Shukla, D.D. and C.W. Ward, Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the potyvirus group. *Journal of General Virology*, 1988. **69**: p. 2703-2710.
24. Taiz, L. and E. Zeiger, Plant Physiology. Fourth ed. 2006, Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates, Inc.
25. Wang, J.L., et al., Carbon Sink-to-Source Transition Is Coordinated with Establishment of Cell-Specific Gene Expression in a C4 Plant. *Plant Cell*, 1993. **5**(3): p. 289-296.
26. Samuel, G., The Movement of Tobacco Mosaic Virus Within the Plant. *Annals of Applied Biology*, 1934. **21**(:): p. 90-111.
27. Scholthof, K.B., et al., Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*, 2011. **12**(9): p. 938-54.
28. Fernández Valiela, M.V., Los virus patógenos de las plantas y su control. Fourth ed. Vol. 1. 1995, Buenos Aires, Argentina: Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. 701.

29. Wang, H., L.F. Huang, and J.I. Cooper, Analyses on mutation patterns, detection of population bottlenecks, and suggestion of deleterious-compensatory evolution among members of the genus Potyvirus. *Arch Virol*, 2006. **151**(8): p. 1625-33.
30. Chung, B.Y., et al., An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(15): p. 5897-902.
31. Cooper, J.I. and A.T. Jones, Responses of Plants to Viruses: Proposals for the Use of Terms. *Phytopathology*, 1983. **73**(2): p. 127-128.
32. Jones, J.D. and J.L. Dangl, The plant immune system. *Nature*, 2006. **444**(7117): p. 323-9.
33. Staskawicz, B.J., et al., Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, 1995. **268**(5211): p. 661-7.
34. Glazebrook, J., Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, 2005. **43**: p. 205-27.
35. Jia, Y., et al., Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J*, 2000. **19**(15): p. 4004-14.
36. Scofield, S.R., et al., Molecular Basis of Gene-for-Gene Specificity in Bacterial Speck Disease of Tomato. *Science*, 1996. **274**(5295): p. 2063-5.
37. Chou, S., et al., Hyaloperonospora arabidopsidis ATR1 effector is a repeat protein with distributed recognition surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(32): p. 13323-8.
38. Mackey, D., et al., RIN4 interacts with Pseudomonas syringae type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in Arabidopsis. *Cell*, 2002. **108**(6): p. 743-54.
39. Wittmann, S., et al., Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of Arabidopsis thaliana using the yeast two-hybrid system. *Virology*, 1997. **234**(1): p. 84-92.
40. Moury, B., et al., Mutations in potato virus Y genome-linked protein determine virulence toward recessive resistances in Capsicum annuum and Lycopersicon hirsutum. *Mol Plant Microbe Interact*, 2004. **17**(3): p. 322-9.
41. Piron, F., et al., An induced mutation in tomato eIF4E leads to immunity to two potyviruses. *PLoS One*, 2010. **5**(6): p. e11313.
42. Mazier, M., et al., Knock-down of both eIF4E1 and eIF4E2 genes confers broad-spectrum resistance against potyviruses in tomato. *PLoS One*, 2011. **6**(12): p. e29595.
43. Loebenstein, G., Local lesions and induced resistance. *Adv Virus Res*, 2009. **75**: p. 73-117.
44. Bergstrom, G.C., M.C. Johnson, and J. Kuc, Effects of local infection of cucumber by Colletotrichum lagenarium, Pseudomonas lachrymans, or tobacco necrosis virus on systemic resistance to cucumber mosaic virus. *Phytopathology*, 1982. **72**: p. 922-926.
45. Marathe, R., et al., The tobacco mosaic virus resistance gene, N. *Mol Plant Pathol*, 2002. **3**(3): p. 167-72.
46. Moffett, P., Mechanisms of recognition in dominant R gene mediated resistance. *Adv Virus Res*, 2009. **75**: p. 1-33.
47. Carr, J.P., M.G. Lewsey, and P. Palukaitis, Signaling in induced resistance. *Adv Virus Res*, 2010. **76**: p. 57-121.
48. Chisholm, S.T., et al., Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 2006. **124**(4): p. 803-14.
49. Maleck, K., et al., The transcriptome of Arabidopsis thaliana during systemic acquired resistance. *Nat Genet*, 2000. **26**(4): p. 403-10.
50. Reignault, P. and D. Walters, Topical application of inducers for disease control, in *Induced Resistance for Plant Defence: A Sustainable Approach to Crop Protection*, D. Walters, A. Newton, and G. Lyon, Editors. 2007, Blackwell Publishing Ltd: Oxford. p. 179-200.
51. Doares, S.H., et al., Salicylic Acid Inhibits Synthesis of Proteinase Inhibitors in Tomato Leaves Induced by Systemin and Jasmonic Acid. *Plant Physiol*, 1995. **108**(4): p. 1741-1746.
52. Schenk, P.M., et al., Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(21): p. 11655-60.
53. Mur, L.A., et al., The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol*, 2006. **140**(1): p. 249-62.
54. Koornneef, A. and C.M. Pieterse, Cross talk in defense signaling. *Plant Physiol*, 2008. **146**(3): p. 839-44.
55. Miljkovic, D., et al., Signalling network construction for modelling plant defence response. *PLoS One*, 2012. **7**(12): p. e51822.

56. Dangl, J.L., R.A. Dietrich, and M.H. Richberg, Death Don't Have No Mercy: Cell Death Programs in Plant-Microbe Interactions. *Plant Cell*, 1996. **8**(10): p. 1793-1807.
57. Hammond-Kosack, K.E. and J.D. Jones, Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, 1996. **8**(10): p. 1773-91.
58. Murphy, A.M., et al., Salicylic acid-induced resistance to viruses and other pathogens: a parting of the ways? *Trends Plant Sci*, 1999. **4**(4): p. 155-160.
59. van Loon, L.C. and E.A. van Strien, The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1999. **55**: p. 85-97.
60. van Loon, L.C., M. Rep, and C.M. Pieterse, Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol*, 2006. **44**: p. 135-62.
61. Malamy, J., et al., Salicylic Acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, 1990. **250**(4983): p. 1002-4.
62. Pennazio, S. and P. Roggero, Systemic Acquired Resistance Induced in Tobacco Plants by Localized Virus Infection Does Not Operate Against Challenging Viruses That Infect Systemically. *Journal of Phytopathology*, 1988. **121**(3): p. 255-266.
63. Chivasa, S., et al., Salicylic Acid Interferes with Tobacco Mosaic Virus Replication via a Novel Salicylhydroxamic Acid-Sensitive Mechanism. *Plant Cell*, 1997. **9**(4): p. 547-557.
64. Pennazio, S., P. Roggero, and I.A. Gentile, Effects of salicylate on virus-infected tobacco plants. *Journal of Phytopathology*, 1985. **114**(3): p. 203-213.
65. Delaney, T.P., et al., A central role of salicylic Acid in plant disease resistance. *Science*, 1994. **266**(5188): p. 1247-50.
66. Kachroo, P., et al., Resistance to turnip crinkle virus in Arabidopsis is regulated by two host genes and is salicylic acid dependent but NPR1, ethylene, and jasmonate independent. *Plant Cell*, 2000. **12**(5): p. 677-90.
67. Nawrath, C. and J.P. Mettraux, Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell*, 1999. **11**(8): p. 1393-404.
68. Gaffney, T., et al., Requirement of salicylic Acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, 1993. **261**(5122): p. 754-6.
69. Huang, Z., et al., Salicylic acid-dependent expression of host genes in compatible Arabidopsis-virus interactions. *Plant Physiol*, 2005. **137**(3): p. 1147-59.
70. Whitham, S.A., et al., Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible Arabidopsis thaliana plants. *Plant J*, 2003. **33**(2): p. 271-83.
71. Chen, Z., H. Silva, and D.F. Klessig, Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, 1993. **262**(5141): p. 1883-6.
72. Durner, J. and D.F. Klessig, Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(24): p. 11312-6.
73. Sagi, M. and R. Fluhr, Superoxide production by plant homologues of the gp91(phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol*, 2001. **126**(3): p. 1281-90.
74. Montillet, J.L., et al., Fatty acid hydroperoxides and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiol*, 2005. **138**(3): p. 1516-26.
75. Lynch, D.V. and J.E. Thompson, Lipoxygenase-mediated production of superoxide anion in senescing plant tissue. *FEBS Letters*, 1984. **173**(1): p. 251-254.
76. La Camera, S., et al., Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunol Rev*, 2004. **198**: p. 267-84.
77. Grant, J.J. and G.J. Loake, Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol*, 2000. **124**(1): p. 21-9.
78. Wasternack, C. and E. Kombrink, Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *ACS Chem Biol*, 2010. **5**(1): p. 63-77.
79. Kenton, P., et al., (-)-Jasmonic Acid Accumulation in Tobacco Hypersensitive Response Lesions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1999. **12**(1): p. 74-78.
80. Staswick, P.E., G.Y. Yuen, and C.C. Lehman, Jasmonate signaling mutants of Arabidopsis are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant J*, 1998. **15**(6): p. 747-54.
81. Vijayan, P., et al., A role for jasmonate in pathogen defense of Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(12): p. 7209-14.

82. Hind, S.R., et al., The COP9 signalosome controls jasmonic acid synthesis and plant responses to herbivory and pathogens. *Plant J*, 2011. **65**(3): p. 480-91.
83. Ryu, C.M., et al., Plant growth-promoting rhizobacteria systemically protect *Arabidopsis thaliana* against Cucumber mosaic virus by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid-dependent signaling pathway. *Plant J*, 2004. **39**(3): p. 381-92.
84. Love, A.J., et al., Components of *Arabidopsis* defense- and ethylene-signaling pathways regulate susceptibility to Cauliflower mosaic virus by restricting long-distance movement. *Mol Plant Microbe Interact*, 2007. **20**(6): p. 659-70.
85. de Laat, A.M.M. and L.C. van Loon, The relationship between stimulated ethylene production and symptom expression in virus-infected tobacco leaves. *Physiological Plant Pathology*, 1983. **22**(2): p. 261-273.
86. Vernooij, B., et al., Salicylic Acid Is Not the Translocated Signal Responsible for Inducing Systemic Acquired Resistance but Is Required in Signal Transduction. *Plant Cell*, 1994. **6**(7): p. 959-965.
87. Park, S.W., et al., Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*, 2007. **318**(5847): p. 113-6.
88. Vlot, A.C., D.A. Dempsey, and D.F. Klessig, Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol*, 2009. **47**: p. 177-206.
89. Verberne, M.C., et al., Signaling of systemic acquired resistance in tobacco depends on ethylene perception. *Plant J*, 2003. **35**(1): p. 27-32.
90. Maldonado, A.M., et al., A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, 2002. **419**(6905): p. 399-403.
91. Truman, W., et al., *Arabidopsis* systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(3): p. 1075-80.
92. Chaturvedi, R., et al., Plastid omega3-fatty acid desaturase-dependent accumulation of a systemic acquired resistance inducing activity in petiole exudates of *Arabidopsis thaliana* is independent of jasmonic acid. *Plant J*, 2008. **54**(1): p. 106-17.
93. Liu, P.P., et al., Interconnection between methyl salicylate and lipid-based long-distance signaling during the development of systemic acquired resistance in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Physiol*, 2011. **155**(4): p. 1762-8.
94. Grosskinsky, D.K., et al., Compartment-specific antioxidative defense in *Arabidopsis* against virulent and avirulent *Pseudomonas syringae*. *Phytopathology*, 2012. **102**(7): p. 662-73.
95. Singh, D.P., et al., Activation of multiple antiviral defence mechanisms by salicylic acid. *Mol Plant Pathol*, 2004. **5**(1): p. 57-63.
96. Bolwell, G.P., et al., The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J Exp Bot*, 2002. **53**(372): p. 1367-76.
97. Bindschedler, L.V., et al., Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *Plant J*, 2006. **47**(6): p. 851-63.
98. Torres, M.A., ROS in biotic interactions. *Physiol Plant*, 2010. **138**(4): p. 414-29.
99. Allan, A.C., et al., An early tobacco mosaic virus-induced oxidative burst in tobacco indicates extracellular perception of the virus coat protein. *Plant Physiol*, 2001. **126**(1): p. 97-108.
100. Clarke, S.F., et al., Changes in the activities of antioxidant enzymes in response to virus infection and hormone treatment. *Physiol Plant*, 2002. **114**(2): p. 157-164.
101. Love, A.J., et al., 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*, 2005. **139**(2): p. 935-48.
102. Napoli, C., C. Lemieux, and R. Jorgensen, Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, 1990. **2**(4): p. 279-289.
103. van der Krol, A.R., et al., Flavonoid genes in *petunia*: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*, 1990. **2**(4): p. 291-9.
104. Lewsey, M.G., P. Palukaitis, and J.P. Carr, Plant-virus interactions: defence and counter-defence, in *Molecular Aspects of Plant Disease Resistance*, J. Parker, Editor. 2009, Blackwell Publishing Ltd.: Oxford, UK.
105. Abel, P.P., et al., Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, 1986. **232**(4751): p. 738-43.
106. Lindbo, J.A. and W.G. Dougherty, Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology*, 1992. **189**(2): p. 725-33.

107. Lindbo, J.A. and W.G. Dougherty, Pathogen-derived resistance to a potyvirus: immune and resistant phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. *Mol Plant Microbe Interact*, 1992. **5**(2): p. 144-53.
108. Waterhouse, P.M., M.W. Graham, and M.B. Wang, Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(23): p. 13959-64.
109. Szittyá, G., et al., Short defective interfering RNAs of tombusviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus. *Plant Cell*, 2002. **14**(2): p. 359-72.
110. Molnar, A., et al., Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *J Virol*, 2005. **79**(12): p. 7812-8.
111. Donaire, L., et al., Deep-sequencing of plant viral small RNAs reveals effective and widespread targeting of viral genomes. *Virology*, 2009. **392**(2): p. 203-14.
112. Szittyá, G., et al., Structural and functional analysis of viral siRNAs. *PLoS Pathog*, 2010. **6**(4): p. e1000838.
113. Ho, T., et al., A simplified method for cloning of short interfering RNAs from Brassica juncea infected with Turnip mosaic potyvirus and Turnip crinkle carmovirus. *J Virol Methods*, 2006. **136**(1-2): p. 217-23.
114. Hu, Q., et al., Specific impact of tobamovirus infection on the Arabidopsis small RNA profile. *PLoS One*, 2011. **6**(5): p. e19549.
115. Nagy, P.D. and J. Pogany, Global Genomics and Proteomics Approaches to Identify Host Factors as Targets to Induce Resistance Against Tomato Bushy Stunt Virus, in *Advances in Virus Research*, J.P. Carr and G. Loebenstein, Editors. 2010, Elsevier Academic Press: San Diego, CA, USA.
116. Panavas, T., et al., The role of the p33:p33/p92 interaction domain in RNA replication and intracellular localization of p33 and p92 proteins of Cucumber necrosis tombusvirus. *Virology*, 2005. **338**(1): p. 81-95.
117. Csorba, T., V. Pantaleo, and J. Burgyán, RNA Silencing: An Antiviral Mechanism, in *Advances in Virus Research* G. Loebenstein and J.P. Carr, Editors. 2009, Elsevier Academic Press: San Diego, CA, USA.
118. Garcia-Ruiz, H., et al., Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection. *Plant Cell*, 2010. **22**(2): p. 481-96.
119. Donaire, L., et al., Structural and genetic requirements for the biogenesis of tobacco rattle virus-derived small interfering RNAs. *J Virol*, 2008. **82**(11): p. 5167-77.
120. Alvarado, V. and H.B. Scholthof, Plant responses against invasive nucleic acids: RNA silencing and its suppression by plant viral pathogens. *Semin Cell Dev Biol*, 2009. **20**(9): p. 1032-40.
121. Blevins, T., et al., Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(21): p. 6233-46.
122. Deleris, A., et al., Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science*, 2006. **313**(5783): p. 68-71.
123. Wang, X.B., et al., The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative argonautes in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, 2011. **23**(4): p. 1625-38.
124. Yang, Z., et al., HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(2): p. 667-75.
125. Zvereva, A.S. and M.M. Pooggin, Silencing and innate immunity in plant defense against viral and non-viral pathogens. *Viruses*, 2012. **4**(11): p. 2578-97.
126. Baumberger, N. and D.C. Baulcombe, Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(33): p. 11928-33.
127. Ruiz-Ferrer, V. and O. Voinnet, Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annu Rev Plant Biol*, 2009. **60**: p. 485-510.
128. Ding, S.W. and O. Voinnet, Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, 2007. **130**(3): p. 413-26.
129. Willmann, M.R., et al., The Functions of RNA-Dependent RNA Polymerases in Arabidopsis. *Arabidopsis Book*, 2011. **9**: p. e0146.
130. Vaistij, F.E., L. Jones, and D.C. Baulcombe, Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell*, 2002. **14**(4): p. 857-67.

131. Shimura, H., et al., A viral satellite RNA induces yellow symptoms on tobacco by targeting a gene involved in chlorophyll biosynthesis using the RNA silencing machinery. *PLoS Pathog*, 2011. **7**(5): p. e1002021.
132. Himber, C., et al., Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J*, 2003. **22**(17): p. 4523-33.
133. Dunoyer, P., et al., Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. *Science*, 2010. **328**(5980): p. 912-6.
134. Alamillo, J.M., P. Saenz, and J.A. Garcia, Salicylic acid-mediated and RNA-silencing defense mechanisms cooperate in the restriction of systemic spread of plum pox virus in tobacco. *Plant J*, 2006. **48**(2): p. 217-27.
135. Mukhtar, M.S., et al., Independently evolved virulence effectors converge onto hubs in a plant immune system network. *Science*, 2011. **333**(6042): p. 596-601.
136. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993. **75**(5): p. 843-54.
137. Axtell, M.J., Classification and Comparison of Small RNAs from Plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2013.
138. Molnar, A., et al., miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature*, 2007. **447**(7148): p. 1126-9.
139. Stern-Ginossar, N., et al., Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science*, 2007. **317**(5836): p. 376-81.
140. Voinnet, O., Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, 2009. **136**(4): p. 669-87.
141. Nozawa, M., S. Miura, and M. Nei, Origins and evolution of microRNA genes in plant species. *Genome Biol Evol*, 2012. **4**(3): p. 230-9.
142. Garcia, D., A miRacle in plant development: role of microRNAs in cell differentiation and patterning. *Semin Cell Dev Biol*, 2008. **19**(6): p. 586-95.
143. Axtell, M.J. and J.L. Bowman, Evolution of plant microRNAs and their targets. *Trends Plant Sci*, 2008. **13**(7): p. 343-9.
144. Sieber, P., et al., Redundancy and specialization among plant microRNAs: role of the MIR164 family in developmental robustness. *Development*, 2007. **134**(6): p. 1051-60.
145. Baker, C.C., et al., The early extra petals1 mutant uncovers a role for microRNA miR164c in regulating petal number in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2005. **15**(4): p. 303-15.
146. Nikovics, K., et al., The balance between the MIR164A and CUC2 genes controls leaf margin serration in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2006. **18**(11): p. 2929-45.
147. Zhang, B., et al., Conservation and divergence of plant microRNA genes. *Plant J*, 2006. **46**(2): p. 243-59.
148. Ma, Z., C. Coruh, and M.J. Axtell, *Arabidopsis lyrata* small RNAs: transient MIRNA and small interfering RNA loci within the *Arabidopsis* genus. *Plant Cell*, 2010. **22**(4): p. 1090-103.
149. Fahlgren, N., et al., MicroRNA gene evolution in *Arabidopsis lyrata* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 2010. **22**(4): p. 1074-89.
150. Jones-Rhoades, M.W., Conservation and divergence in plant microRNAs. *Plant Mol Biol*, 2012. **80**(1): p. 3-16.
151. Xie, Z., et al., Expression of *Arabidopsis* MIRNA genes. *Plant Physiol*, 2005. **138**(4): p. 2145-54.
152. Kim, S., et al., Two cap-binding proteins CBP20 and CBP80 are involved in processing primary microRNAs. *Plant Cell Physiol*, 2008. **49**(11): p. 1634-44.
153. Kurihara, Y. and Y. Watanabe, *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(34): p. 12753-8.
154. Yu, B., et al., The FHA domain proteins DAWDLE in *Arabidopsis* and SNIP1 in humans act in small RNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(29): p. 10073-8.
155. Fang, Y. and D.L. Spector, Identification of nuclear dicing bodies containing proteins for microRNA biogenesis in living *Arabidopsis* plants. *Curr Biol*, 2007. **17**(9): p. 818-23.
156. Reinhart, B.J., et al., MicroRNAs in plants. *Genes Dev*, 2002. **16**(13): p. 1616-26.
157. Park, W., et al., CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*, 2002. **12**(17): p. 1484-95.
158. Bologna, N.G., et al., A loop-to-base processing mechanism underlies the biogenesis of plant microRNAs miR319 and miR159. *EMBO J*, 2009. **28**(23): p. 3646-56.
159. Dong, Z., M.H. Han, and N. Fedoroff, The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(29): p. 9970-5.

160. Machida, S., H.Y. Chen, and Y. Adam Yuan, Molecular insights into miRNA processing by *Arabidopsis thaliana* SERRATE. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(17): p. 7828-36.
161. Eamens, A.L., et al., DRB2 is required for microRNA biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 2012. **7**(4): p. e35933.
162. Yu, B., et al., Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*, 2005. **307**(5711): p. 932-5.
163. Xie, Z., K. Khanna, and S. Ruan, Expression of microRNAs and its regulation in plants. *Semin Cell Dev Biol*, 2010. **21**(8): p. 790-7.
164. Jones-Rhoades, M.W., D.P. Bartel, and B. Bartel, MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2006. **57**: p. 19-53.
165. Meng, Y., et al., High-throughput degradome sequencing can be used to gain insights into microRNA precursor metabolism. *J Exp Bot*, 2010. **61**(14): p. 3833-7.
166. Lu, C., et al., Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. *Science*, 2005. **309**(5740): p. 1567-9.
167. Fahlgren, N., et al., High-throughput sequencing of *Arabidopsis* microRNAs: evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *PLoS One*, 2007. **2**(2): p. e219.
168. Sunkar, R., Y.F. Li, and G. Jagadeeswaran, Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends Plant Sci*, 2012. **17**(4): p. 196-203.
169. Meng, Y., et al., Expression-based functional investigation of the organ-specific microRNAs in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 2012. **7**(11): p. e50870.
170. Valoczi, A., et al., Spatio-temporal accumulation of microRNAs is highly coordinated in developing plant tissues. *Plant J*, 2006. **47**(1): p. 140-51.
171. Nogueira, F.T., et al., Regulation of small RNA accumulation in the maize shoot apex. *PLoS Genet*, 2009. **5**(1): p. e1000320.
172. Kim, J.H., et al., Trifurcate feed-forward regulation of age-dependent cell death involving miR164 in *Arabidopsis*. *Science*, 2009. **323**(5917): p. 1053-7.
173. Jung, H.J. and H. Kang, Expression and functional analyses of microRNA417 in *Arabidopsis thaliana* under stress conditions. *Plant Physiol Biochem*, 2007. **45**(10-11): p. 805-11.
174. Sire, C., et al., Diurnal oscillation in the accumulation of *Arabidopsis* microRNAs, miR167, miR168, miR171 and miR398. *FEBS Lett*, 2009. **583**(6): p. 1039-44.
175. Meng, Y., et al., The regulatory activities of plant microRNAs: a more dynamic perspective. *Plant Physiol*, 2011. **157**(4): p. 1583-95.
176. Megraw, M., et al., MicroRNA promoter element discovery in *Arabidopsis*. *RNA*, 2006. **12**(9): p. 1612-9.
177. Megraw, M. and A.G. Hatzigeorgiou, MicroRNA Promoter Analysis, in *Plant MicroRNAs, Methods in Molecular Biology*, B.C. Meyers and P.J. Green, Editors. 2009, Humana Press: Hatfield, Hertfordshire, UK.
178. Poethig, R.S., Small RNAs and developmental timing in plants. *Curr Opin Genet Dev*, 2009. **19**(4): p. 374-8.
179. Xie, Z., K.D. Kasschau, and J.C. Carrington, Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in *Arabidopsis* by microRNA-guided mRNA degradation. *Curr Biol*, 2003. **13**(9): p. 784-9.
180. Meng, Y., et al., Target mimics: an embedded layer of microRNA-involved gene regulatory networks in plants. *BMC Genomics*, 2012. **13**: p. 197.
181. Yu, B., et al., siRNAs compete with miRNAs for methylation by HEN1 in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(17): p. 5844-50.
182. Khan, A.A., et al., Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs. *Nat Biotechnol*, 2009. **27**(6): p. 549-55.
183. Zhang, X., et al., *Arabidopsis* Argonaute 2 regulates innate immunity via miRNA393(\*)-mediated silencing of a Golgi-localized SNARE gene, MEMB12. *Mol Cell*, 2011. **42**(3): p. 356-66.
184. Meng, Y., et al., Construction of microRNA- and microRNA\*-mediated regulatory networks in plants. *RNA Biol*, 2011. **8**(6): p. 1124-48.
185. Franco-Zorrilla, J.M., et al., Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat Genet*, 2007. **39**(8): p. 1033-7.
186. Todesco, M., et al., A collection of target mimics for comprehensive analysis of microRNA function in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet*, 2010. **6**(7): p. e1001031.
187. Banks, I.R., et al., RNA decoys: an emerging component of plant regulatory networks? *Plant Signal Behav*, 2012. **7**(9): p. 1188-93.
188. Rhoades, M.W., et al., Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, 2002. **110**(4): p. 513-20.

189. Kasschau, K.D., et al., P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev Cell*, 2003. **4**(2): p. 205-17.
190. Aukerman, M.J. and H. Sakai, Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell*, 2003. **15**(11): p. 2730-41.
191. Brodersen, P., et al., Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, 2008. **320**(5880): p. 1185-90.
192. Carbonell, A., et al., Functional analysis of three Arabidopsis ARGONAUTES using slicer-defective mutants. *Plant Cell*, 2012. **24**(9): p. 3613-29.
193. Williams, L., et al., A database analysis method identifies an endogenous trans-acting short-interfering RNA that targets the Arabidopsis ARF2, ARF3, and ARF4 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(27): p. 9703-8.
194. Vazquez, F., et al., Endogenous trans-acting siRNAs regulate the accumulation of Arabidopsis mRNAs. *Mol Cell*, 2004. **16**(1): p. 69-79.
195. Axtell, M.J., et al., A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 2006. **127**(3): p. 565-77.
196. Allen, E., et al., microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 2005. **121**(2): p. 207-21.
197. Schwab, R., et al., Endogenous TasiRNAs mediate non-cell autonomous effects on gene regulation in Arabidopsis thaliana. *PLoS One*, 2009. **4**(6): p. e5980.
198. Jones-Rhoades, M.W. and D.P. Bartel, Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell*, 2004. **14**(6): p. 787-99.
199. Chen, M., et al., Functional characterization of plant small RNAs based on next-generation sequencing data. *Comput Biol Chem*, 2010. **34**(5-6): p. 308-12.
200. Palatnik, J.F., et al., Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, 2003. **425**(6955): p. 257-63.
201. Rubio-Somoza, I. and D. Weigel, MicroRNA networks and developmental plasticity in plants. *Trends Plant Sci*, 2011. **16**(5): p. 258-64.
202. Wu, G. and R.S. Poethig, Temporal regulation of shoot development in Arabidopsis thaliana by miR156 and its target SPL3. *Development*, 2006. **133**(18): p. 3539-47.
203. Chen, X., A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science*, 2004. **303**(5666): p. 2022-5.
204. Wu, G., et al., The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in Arabidopsis. *Cell*, 2009. **138**(4): p. 750-9.
205. Poethig, R.S., The past, present, and future of vegetative phase change. *Plant Physiol*, 2010. **154**(2): p. 541-4.
206. Lim, P.O., H.J. Kim, and H.G. Nam, Leaf senescence. *Annu Rev Plant Biol*, 2007. **58**: p. 115-36.
207. Schommer, C., et al., Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLoS Biol*, 2008. **6**(9): p. e230.
208. Ellis, C.M., et al., AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in Arabidopsis thaliana. *Development*, 2005. **132**(20): p. 4563-74.
209. Lim, P.O., et al., Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. *J Exp Bot*, 2010. **61**(5): p. 1419-30.
210. Laufs, P., et al., MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems. *Development*, 2004. **131**(17): p. 4311-22.
211. Koyama, T., et al., TCP transcription factors regulate the activities of ASYMMETRIC LEAVES1 and miR164, as well as the auxin response, during differentiation of leaves in Arabidopsis. *Plant Cell*, 2010. **22**(11): p. 3574-88.
212. Rodriguez, R.E., et al., Control of cell proliferation in Arabidopsis thaliana by microRNA miR396. *Development*, 2010. **137**(1): p. 103-12.
213. Nogueira, F.T., et al., Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis. *Genes Dev*, 2007. **21**(7): p. 750-5.
214. Pagan, I., C. Alonso-Blanco, and F. Garcia-Arenal, The relationship of within-host multiplication and virulence in a plant-virus system. *PLoS One*, 2007. **2**(8): p. e786.
215. Boyes, D.C., et al., Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell*, 2001. **13**(7): p. 1499-510.
216. Liu, H.H., et al., Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in Arabidopsis thaliana. *RNA*, 2008. **14**(5): p. 836-43.

217. Li, W.X., et al., The Arabidopsis NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *Plant Cell*, 2008. **20**(8): p. 2238-51.
218. Vidal, E.A., et al., Nitrate-responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(9): p. 4477-82.
219. Liang, G., H. He, and D. Yu, Identification of nitrogen starvation-responsive microRNAs in Arabidopsis thaliana. *PLoS One*, 2012. **7**(11): p. e48951.
220. Pant, B.D., et al., MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant J*, 2008. **53**(5): p. 731-8.
221. Liang, G., F. Yang, and D. Yu, MicroRNA395 mediates regulation of sulfate accumulation and allocation in Arabidopsis thaliana. *Plant J*, 2010. **62**(6): p. 1046-57.
222. Kruszka, K., et al., Role of microRNAs and other sRNAs of plants in their changing environments. *J Plant Physiol*, 2012. **169**(16): p. 1664-72.
223. Sunkar, R., A. Kapoor, and J.K. Zhu, 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*, 2006. **18**(8): p. 2051-65.
224. Chu, C.C., et al., A copper chaperone for superoxide dismutase that confers three types of copper/zinc superoxide dismutase activity in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 2005. **139**(1): p. 425-36.
225. Beauclair, L., A. Yu, and N. Bouche, microRNA-directed cleavage and translational repression of the copper chaperone for superoxide dismutase mRNA in Arabidopsis. *Plant J*, 2010. **62**(3): p. 454-62.
226. Huang, C.H., et al., Copper chaperone-dependent and -independent activation of three copper-zinc superoxide dismutase homologs localized in different cellular compartments in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 2012. **158**(2): p. 737-46.
227. Yamasaki, H., et al., Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in Arabidopsis. *J Biol Chem*, 2007. **282**(22): p. 16369-78.
228. Abdel-Ghany, S.E. and M. Pilon, MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in Arabidopsis. *J Biol Chem*, 2008. **283**(23): p. 15932-45.
229. Jagadeeswaran, G., A. Saini, and R. Sunkar, Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in Arabidopsis. *Planta*, 2009. **229**(4): p. 1009-14.
230. Khraiwesh, B., J.K. Zhu, and J. Zhu, Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1819**(2): p. 137-48.
231. Navarro, L., et al., A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, 2006. **312**(5772): p. 436-9.
232. Navarro, L., et al., Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science*, 2008. **321**(5891): p. 964-7.
233. Burgyan, J. and Z. Havelda, Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci*, 2011. **16**(5): p. 265-72.
234. Vargason, J.M., et al., Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell*, 2003. **115**(7): p. 799-811.
235. Lakatos, L., et al., Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J*, 2006. **25**(12): p. 2768-80.
236. Chapman, E.J., et al., Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev*, 2004. **18**(10): p. 1179-86.
237. Mlotshwa, S., et al., Ectopic DICER-LIKE1 expression in P1/HC-Pro Arabidopsis rescues phenotypic anomalies but not defects in microRNA and silencing pathways. *Plant Cell*, 2005. **17**(11): p. 2873-85.
238. Endres, M.W., et al., Two plant viral suppressors of silencing require the ethylene-inducible host transcription factor RAV2 to block RNA silencing. *PLoS Pathog*, 2010. **6**(1): p. e1000729.
239. Schott, G., et al., Differential effects of viral silencing suppressors on siRNA and miRNA loading support the existence of two distinct cellular pools of ARGONAUTE1. *EMBO J*, 2012. **31**(11): p. 2553-65.
240. Varallyay, E. and Z. Havelda, Unrelated viral suppressors of RNA silencing mediate the control of ARGONAUTE1 level. *Mol Plant Pathol*, 2013.
241. Varallyay, E., et al., Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *EMBO J*, 2010. **29**(20): p. 3507-19.
242. Lewsey, M.G., et al., Disruption of two defensive signaling pathways by a viral RNA silencing suppressor. *Mol Plant Microbe Interact*, 2010. **23**(7): p. 835-45.

243. Ascencio-Ibanez, J.T., et al., Global analysis of Arabidopsis gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiol*, 2008. **148**(1): p. 436-54.
244. Gan, S. and R.M. Amasino, Making Sense of Senescence (Molecular Genetic Regulation and Manipulation of Leaf Senescence). *Plant Physiol*, 1997. **113**(2): p. 313-319.
245. Lim, P.O., H.R. Woo, and H.G. Nam, Molecular genetics of leaf senescence in Arabidopsis. *Trends Plant Sci*, 2003. **8**(6): p. 272-8.
246. Hopkins, M., et al., Regulation and execution of molecular disassembly and catabolism during senescence. *New Phytol*, 2007. **175**(2): p. 201-14.
247. Guo, Y. and S. Gan, Leaf senescence: signals, execution, and regulation. *Curr Top Dev Biol*, 2005. **71**: p. 83-112.
248. Rolny, N., et al., Is the electrolyte leakage assay an unequivocal test of membrane deterioration during leaf senescence? *Plant Physiol Biochem*, 2011. **49**(10): p. 1220-7.
249. Buchanan-Wollaston, V., The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental Botany*, 1997. **48**(2): p. 181-199.
250. Hortensteiner, S. and U. Feller, Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *J Exp Bot*, 2002. **53**(370): p. 927-37.
251. Hensel, L.L., et al., Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in Arabidopsis. *Plant Cell*, 1993. **5**(5): p. 553-64.
252. Riefler, M., et al., Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell*, 2006. **18**(1): p. 40-54.
253. Butt, A., et al., Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein gene in Arabidopsis in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. *Plant J*, 1998. **16**(2): p. 209-21.
254. Weaver, L.M., et al., A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol Biol*, 1998. **37**(3): p. 455-69.
255. Trivellini, A., et al., Carbon-Deprivation-Driven Transcriptome Reprogramming in Detached Developmentally-Arresting Arabidopsis Inflorescences. *Plant Physiol*, 2012.
256. Quirino, B.F., et al., Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci*, 2000. **5**(7): p. 278-82.
257. Pic, E., et al., Leaf senescence induced by mild water deficit follows the same sequence of macroscopic, biochemical, and molecular events as monocarpic senescence in pea. *Plant Physiol*, 2002. **128**(1): p. 236-46.
258. Miller, J.D., R.N. Artca, and E.J. Pell, Senescence-associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 1999. **120**(4): p. 1015-24.
259. Navabpour, S., et al., Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *J Exp Bot*, 2003. **54**(391): p. 2285-92.
260. Xiong, Y., A.L. Contento, and D.C. Bassham, AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in Arabidopsis thaliana. *Plant J*, 2005. **42**(4): p. 535-46.
261. Wu, A., et al., JUNGBRUNNEN1, a reactive oxygen species-responsive NAC transcription factor, regulates longevity in Arabidopsis. *Plant Cell*, 2012. **24**(2): p. 482-506.
262. Munne-Bosch, S. and L. Alegre, Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts. *Planta*, 2002. **214**(4): p. 608-15.
263. Balazadeh, S., et al., ORS1, an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-responsive NAC transcription factor, controls senescence in Arabidopsis thaliana. *Mol Plant*, 2011. **4**(2): p. 346-60.
264. Balazadeh, S., A. Wu, and B. Mueller-Roeber, Salt-triggered expression of the ANAC092-dependent senescence regulon in Arabidopsis thaliana. *Plant Signal Behav*, 2010. **5**(6): p. 733-5.
265. Misyura, M., J. Colasanti, and S.J. Rothstein, Physiological and genetic analysis of Arabidopsis thaliana anthocyanin biosynthesis mutants under chronic adverse environmental conditions. *J Exp Bot*, 2013. **64**(1): p. 229-40.
266. Hortensteiner, S. and B. Krautler, Chlorophyll breakdown in higher plants. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1807**(8): p. 977-88.
267. Breeze, E., et al., High-resolution temporal profiling of transcripts during Arabidopsis leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation. *Plant Cell*, 2011. **23**(3): p. 873-94.

268. Meier, S., et al., A transcriptional analysis of carotenoid, chlorophyll and plastidial isoprenoid biosynthesis genes during development and osmotic stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Syst Biol*, 2011. **5**: p. 77.
269. Archetti, M., et al., Unravelling the evolution of autumn colours: an interdisciplinary approach. *Trends Ecol Evol*, 2009. **24**(3): p. 166-73.
270. Peng, M., et al., Adaptation of *Arabidopsis* to nitrogen limitation involves induction of anthocyanin synthesis which is controlled by the NLA gene. *J Exp Bot*, 2008. **59**(11): p. 2933-44.
271. Gould, K.S., D.A. Dudle, and H.S. Neufeld, Why some stems are red: cauline anthocyanins shield photosystem II against high light stress. *J Exp Bot*, 2010. **61**(10): p. 2707-17.
272. Feild, T.S., D.W. Lee, and N.M. Holbrook, Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood. *Plant Physiol*, 2001. **127**(2): p. 566-74.
273. Hoch, W.A., E.L. Singaas, and B.H. McCown, Resorption protection. Anthocyanins facilitate nutrient recovery in autumn by shielding leaves from potentially damaging light levels. *Plant Physiol*, 2003. **133**(3): p. 1296-305.
274. Gould, K.S., Nature's Swiss Army Knife: The Diverse Protective Roles of Anthocyanins in Leaves. *J Biomed Biotechnol*, 2004. **2004**(5): p. 314-320.
275. Nagata, T., et al., Levels of active oxygen species are controlled by ascorbic acid and anthocyanin in *Arabidopsis*. *J Agric Food Chem*, 2003. **51**(10): p. 2992-9.
276. Peng, M., et al., A mutation in NLA, which encodes a RING-type ubiquitin ligase, disrupts the adaptability of *Arabidopsis* to nitrogen limitation. *Plant J*, 2007. **50**(2): p. 320-37.
277. Kant, S., M. Peng, and S.J. Rothstein, Genetic regulation by NLA and microRNA827 for maintaining nitrate-dependent phosphate homeostasis in *Arabidopsis*. *PLoS Genet*, 2011. **7**(3): p. e1002021.
278. Balazadeh, S., D.M. Riano-Pachon, and B. Mueller-Roeber, Transcription factors regulating leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol (Stuttg)*, 2008. **10 Suppl 1**: p. 63-75.
279. Buchanan-Wollaston, V., et al., Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2005. **42**(4): p. 567-85.
280. Balazadeh, S., et al., A gene regulatory network controlled by the NAC transcription factor ANAC092/AtNAC2/ORE1 during salt-promoted senescence. *Plant J*, 2010. **62**(2): p. 250-64.
281. Miao, Y., et al., Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 2004. **55**(6): p. 853-67.
282. Ulker, B., M. Shahid Mukhtar, and I.E. Somssich, The WRKY70 transcription factor of *Arabidopsis* influences both the plant senescence and defense signaling pathways. *Planta*, 2007. **226**(1): p. 125-37.
283. Besseau, S., J. Li, and E.T. Palva, WRKY54 and WRKY70 co-operate as negative regulators of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 2012. **63**(7): p. 2667-79.
284. Li, J., et al., WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *Plant J*, 2006. **46**(3): p. 477-91.
285. Li, J., G. Brader, and E.T. Palva, The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell*, 2004. **16**(2): p. 319-31.
286. Li, Z., et al., Gene network analysis and functional studies of senescence-associated genes reveal novel regulators of *Arabidopsis* leaf senescence. *J Integr Plant Biol*, 2012. **54**(8): p. 526-39.
287. Dunoyer, P., et al., Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell*, 2004. **16**(5): p. 1235-50.
288. Bazzini, A.A., et al., Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(29): p. 12157-62.
289. He, X.F., et al., Characterization of conserved and novel microRNAs and their targets, including a TuMV-induced TIR-NBS-LRR class R gene-derived novel miRNA in Brassica. *FEBS Lett*, 2008. **582**(16): p. 2445-52.
290. Palukaitis, P., S.C. Groen, and J.P. Carr, The Rumsfeld paradox: some of the things we know that we don't know about plant virus infection. *Curr Opin Plant Biol*, 2013.
291. Tagami, Y., et al., Specific enrichment of miRNAs in *Arabidopsis thaliana* infected with Tobacco mosaic virus. *DNA Res*, 2007. **14**(5): p. 227-33.
292. Bazzini, A.A., et al., Virus infection elevates transcriptional activity of miR164a promoter in plants. *BMC Plant Biol*, 2009. **9**: p. 152.

293. Lescot, M., et al., PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**(1): p. 325-7.
294. Aguilar, I., et al., Nucleotide sequence of Chinese rape mosaic virus (oilseed rape mosaic virus), a crucifer tobamovirus infectious on *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 1996. **30**(1): p. 191-7.
295. Lartey, R.T., T.C. Voss, and U. Melcher, Tobamovirus evolution: gene overlaps, recombination, and taxonomic implications. *Mol Biol Evol*, 1996. **13**(10): p. 1327-38.
296. Fior, S., A. Vianelli, and P.D. Gerola, A novel method for fluorimetric continuous measurement of  $\beta$ -glucuronidase (GUS) activity using 4-methyl-umbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide (MUG) as substrate. *Plant Sci*, 2009. **176**(1): p. 130-135.
297. Fior, S. and P.D. Gerola, Impact of ubiquitous inhibitors on the GUS gene reporter system: evidence from the model plants *Arabidopsis*, tobacco and rice and correction methods for quantitative assays of transgenic and endogenous GUS. *Plant Methods*, 2009. **5**: p. 19.
298. Bari, R. and J.D. Jones, Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol*, 2009. **69**(4): p. 473-88.
299. Mallory, A.C., et al., MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Curr Biol*, 2004. **14**(12): p. 1035-46.
300. Raman, S., et al., Interplay of miR164, CUP-SHAPED COTYLEDON genes and LATERAL SUPPRESSOR controls axillary meristem formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2008. **55**(1): p. 65-76.
301. Lunello, P., et al., A developmentally linked, dramatic, and transient loss of virus from roots of *Arabidopsis thaliana* plants infected by either of two RNA viruses. *Mol Plant Microbe Interact*, 2007. **20**(12): p. 1589-95.
302. Guo, H.S., et al., MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for *Arabidopsis* lateral root development. *Plant Cell*, 2005. **17**(5): p. 1376-86.
303. Padmanabhan, M.S., et al., Interaction of the tobacco mosaic virus replicase protein with the Aux/IAA protein PAP1/IAA26 is associated with disease development. *J Virol*, 2005. **79**(4): p. 2549-58.
304. Padmanabhan, M.S., et al., Tobacco mosaic virus replicase-auxin/indole acetic acid protein interactions: reprogramming the auxin response pathway to enhance virus infection. *J Virol*, 2008. **82**(5): p. 2477-85.
305. Maule, A., V. Leh, and C. Lederer, The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. *Curr Opin Plant Biol*, 2002. **5**(4): p. 279-84.
306. Hillung, J., J.M. Cuevas, and S.F. Elena, Transcript Profiling of Different *Arabidopsis thaliana* Ecotypes in Response to Tobacco etch potyvirus Infection. *Front Microbiol*, 2012. **3**: p. 229.
307. Whitham, S.A., C. Yang, and M.M. Goodin, Global impact: elucidating plant responses to viral infection. *Mol Plant Microbe Interact*, 2006. **19**(11): p. 1207-15.
308. Golem, S. and J.N. Culver, Tobacco mosaic virus induced alterations in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2003. **16**(8): p. 681-8.
309. Csorba, T., et al., The p122 subunit of Tobacco Mosaic Virus replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA- and microRNA-mediated pathways. *J Virol*, 2007. **81**(21): p. 11768-80.
310. Cillo, F., et al., Differential effects of mild and severe Cucumber mosaic virus strains in the perturbation of MicroRNA-regulated gene expression in tomato map to the 3' sequence of RNA 2. *Mol Plant Microbe Interact*, 2009. **22**(10): p. 1239-49.
311. Vogler, H., et al., Modification of small RNAs associated with suppression of RNA silencing by tobamovirus replicase protein. *J Virol*, 2007. **81**(19): p. 10379-88.
312. Clough, S.J. and A.F. Bent, Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 1998. **16**(6): p. 735-43.
313. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.
314. Jefferson, R.A., T.A. Kavanagh, and M.W. Bevan, GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 1987. **6**(13): p. 3901-7.
315. Moffatt, B.A., et al., The adenine phosphoribosyltransferase-encoding gene of *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 1994. **143**(2): p. 211-6.

316. Yamaguchi-Shinozaki, K. and K. Shinozaki, Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. *Mol Gen Genet*, 1993. **236**(2-3): p. 331-40.
317. Gil, P., et al., Characterization of the auxin-inducible SAUR-AC1 gene for use as a molecular genetic tool in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 1994. **104**(2): p. 777-84.
318. Pfaffl, M.W., G.W. Horgan, and L. Dempfle, Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**(9): p. e36.
319. Culver, J.N. and M.S. Padmanabhan, Virus-induced disease: altering host physiology one interaction at a time. *Annu Rev Phytopathol*, 2007. **45**: p. 221-43.
320. Bazzini, A.A., et al., Metabolic and miRNA profiling of TMV infected plants reveals biphasic temporal changes. *PLoS One*, 2011. **6**(12): p. e28466.
321. Asurmendi, S., et al., Coat protein regulates formation of replication complexes during tobacco mosaic virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(5): p. 1415-20.
322. Reichel, C. and R.N. Beachy, Tobacco mosaic virus infection induces severe morphological changes of the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(19): p. 11169-74.
323. Conti, G., et al., Transgenic expression of Tobacco mosaic virus capsid and movement proteins modulate plant basal defense and biotic stress responses in *Nicotiana tabacum*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2012. **25**(10): p. 1370-84.
324. Griffiths-Jones, S., et al., miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.*, 2008. **36**(D): p. 154-158.
325. Draghici, S., Data analysis tools for DNA microarrays. CRC Mathematical Biology and Medicine Series, ed. C.a. Hall. 2003, Boca Raton, Florida: Taylor and Francis group.
326. Frazier, T.P., et al., Identification and characterization of microRNAs and their target genes in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Planta*, 2010. **232**(6): p. 1289-308.
327. Yang, C., et al., Spatial analysis of *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to Turnip mosaic virus infection. *Mol Plant Microbe Interact*, 2007. **20**(4): p. 358-70.
328. Choi, Y.H., et al., NMR metabolomics to revisit the tobacco mosaic virus infection in *Nicotiana tabacum* leaves. *J Nat Prod*, 2006. **69**(5): p. 742-8.
329. Padmanabhan, M.S. and S.P. Dinesh-Kumar, All hands on deck-the role of chloroplasts, endoplasmic reticulum, and the nucleus in driving plant innate immunity. *Mol Plant Microbe Interact*, 2010. **23**(11): p. 1368-80.
330. Browse, J., Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annu Rev Plant Biol*, 2009. **60**: p. 183-205.
331. Fait, A., et al., Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends Plant Sci*, 2008. **13**(1): p. 14-9.
332. Wang, S.D., et al., The roles of ascorbic acid and glutathione in symptom alleviation to SA-deficient plants infected with RNA viruses. *Planta*, 2011. **234**(1): p. 171-81.
333. Olsen, K.M., et al., Differential expression of four *Arabidopsis* PAL genes; PAL1 and PAL2 have functional specialization in abiotic environmental-triggered flavonoid synthesis. *J Plant Physiol*, 2008. **165**(14): p. 1491-9.
334. Lovdal, T., et al., Synergetic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic compounds and gene expression in leaves of tomato. *Phytochemistry*, 2010. **71**(5-6): p. 605-13.
335. Kehr, J., Systemic regulation of mineral homeostasis by micro RNAs. *Front Plant Sci*, 2013. **4**: p. 145.
336. Yamasaki, H., et al., SQUAMOSA Promoter Binding Protein-Like7 Is a Central Regulator for Copper Homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2009. **21**(1): p. 347-61.
337. Nersissian, A.M., et al., Uclacyanins, stellacyanins, and plantacyanins are distinct subfamilies of phytocyanins: plant-specific mononuclear blue copper proteins. *Protein Sci*, 1998. **7**(9): p. 1915-29.
338. Fedorova, M., et al., Genome-wide identification of nodule-specific transcripts in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiol*, 2002. **130**(2): p. 519-37.
339. Dong, J., S.T. Kim, and E.M. Lord, Plantacyanin plays a role in reproduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2005. **138**(2): p. 778-89.
340. Maher, E.A., et al., Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(16): p. 7802-6.

341. Ausubel, F.M., et al., Short Protocols in Molecular Biology : A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology 4th ed, ed. F.M. Ausubel, R. Brent, and D.D. Moore. 1999: John Wiley & Sons.
342. Sambrook, J. and D.W. Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2001, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
343. Bertani, G., Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1951. **62**(3): p. 293-300.
344. Junker, B.H., C. Klukas, and F. Schreiber, VANTED: a system for advanced data analysis and visualization in the context of biological networks. *BMC Bioinformatics*, 2006. **7**: p. 109.
345. Saeed, A.I., et al., TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques*, 2003. **34**(2): p. 374-8.
346. Llave, C., et al., Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science*, 2002. **297**(5589): p. 2053-6.
347. Chen, C., et al., Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(20): p. e179.
348. Ryals, J.A., et al., Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell*, 1996. **8**(10): p. 1809-1819.
349. Tsuda, K., et al., Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses. *Plant J*, 2008. **53**(5): p. 763-75.
350. Vernooij, B., et al., Salicylic acid as a signal molecule in plant-pathogen interactions. *Curr Opin Cell Biol*, 1994. **6**(2): p. 275-9.
351. Sharma, Y.K. and K.R. Davis, The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Radic Biol Med*, 1997. **23**(3): p. 480-8.
352. Delaney, T.P., et al., A Central Role of Salicylic Acid in Plant Disease Resistance. *Science*, 1994. **266**(5188): p. 1247-1250.
353. Martin Martin, A., et al., Resistances to turnip mosaic potyvirus in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact*, 1999. **12**(11): p. 1016-21.
354. Pagan, I., C. Alonso-Blanco, and F. Garcia-Arenal, Host responses in life-history traits and tolerance to virus infection in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Pathog*, 2008. **4**(8): p. e1000124.
355. Lalic, J., et al., Adaptation of tobacco etch potyvirus to a susceptible ecotype of *Arabidopsis thaliana* capacitates it for systemic infection of resistant ecotypes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2010. **365**(1548): p. 1997-2007.
356. Hakmaoui, A., et al., Analysis of the antioxidant response of *Nicotiana benthamiana* to infection with two strains of Pepper mild mottle virus. *J Exp Bot*, 2012. **63**(15): p. 5487-96.
357. Hanssen, I.M., et al., Differential tomato transcriptomic responses induced by pepino mosaic virus isolates with differential aggressiveness. *Plant Physiol*, 2011. **156**(1): p. 301-18.
358. Sanchez, F., et al., Infectivity of turnip mosaic potyvirus cDNA clones and transcripts on the systemic host *Arabidopsis thaliana* and local lesion hosts. *Virus Res*, 1998. **55**(2): p. 207-19.
359. Nguyen, H.D., et al., Turnip Mosaic Potyvirus Probably First Spread to Eurasian Brassica Crops from Wild Orchids about 1000 Years Ago. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e55336.
360. Manacorda, C.A., et al., Salicylic acid determines differential senescence produced by two Turnip mosaic virus strains involving reactive oxygen species and early transcriptomic changes. *Mol Plant Microbe Interact*, 2013.
361. Sanchez, F., et al., Strains of Turnip mosaic potyvirus as defined by the molecular analysis of the coat protein gene of the virus. *Virus Res*, 2003. **94**(1): p. 33-43.
362. Kim, H.J., et al., Salt in irrigation water affects the nutritional and visual properties of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J Agric Food Chem*, 2008. **56**(10): p. 3772-6.
363. Kim, S.H., et al., Down-regulation of beta-carotene hydroxylase increases beta-carotene and total carotenoids enhancing salt stress tolerance in transgenic cultured cells of sweetpotato. *Phytochemistry*, 2012. **74**: p. 69-78.
364. Richards, F.J., Phyllotaxis: Its Quantitative Expression and Relation to Growth in the Apex. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 1951. **235**(629): p. 509-564.
365. Tourino, A., et al., High expression of foreign proteins from a biosafe viral vector derived from Turnip mosaic virus. 2008.
366. Kogovsek, P., et al., Aggressive and mild Potato virus Y isolates trigger different specific responses in susceptible potato plants. *Plant Pathology*, 2010. **59**(6): p. 1121-1132.
367. Rouet, M.A., et al., Characterization of active oxygen-producing proteins in response to hypo-osmolarity in tobacco and *Arabidopsis* cell suspensions: identification of a cell wall peroxidase. *J Exp Bot*, 2006. **57**(6): p. 1323-32.

368. Fujii, H., et al., A miRNA involved in phosphate-starvation response in Arabidopsis. *Curr Biol*, 2005. **15**(22): p. 2038-43.
369. Burkhead, J.L., et al., Copper homeostasis. *New Phytol*, 2009. **182**(4): p. 799-816.
370. Zhang, W., et al., Bacteria-responsive microRNAs regulate plant innate immunity by modulating plant hormone networks. *Plant Mol Biol*, 2011. **75**(1-2): p. 93-105.
371. Cipollini, D., et al., Salicylic acid inhibits jasmonic acid-induced resistance of Arabidopsis thaliana to Spodoptera exigua. *Mol Ecol*, 2004. **13**(6): p. 1643-53.
372. Cipollini, D.F., Does competition magnify the fitness costs of induced responses in Arabidopsis thaliana? A manipulative approach. *Oecologia*, 2002. **131**: p. 514-520.
373. Uknes, S., et al., Acquired resistance in Arabidopsis. *Plant Cell*, 1992. **4**(6): p. 645-56.
374. Bell, E. and J.E. Mullet, Characterization of an Arabidopsis lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiol*, 1993. **103**(4): p. 1133-7.
375. Bariola, P.A., et al., The Arabidopsis ribonuclease gene RNS1 is tightly controlled in response to phosphate limitation. *Plant J*, 1994. **6**(5): p. 673-85.
376. Yuan, S. and H.H. Lin, Role of salicylic acid in plant abiotic stress. *Z Naturforsch C*, 2008. **63**(5-6): p. 313-20.
377. Lynch, D.V. and J.E. Thompson, Lipoxygenase-mediated production of superoxide anion in senescing plant tissue. *FEBS Letters*, 1984. **173**(1): p. 251-254.
378. Bell, E., R.A. Creelman, and J.E. Mullet, A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(19): p. 8675-9.
379. Asada, K., Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol*, 2006. **141**(2): p. 391-6.
380. Bhattacharjee, S., The Language of Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. *Journal of Botany*, 2012. **2012**: p. 1-22.
381. Kuzniak, E. and M. Sklodowska, Fungal pathogen-induced changes in the antioxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants. *Planta*, 2005. **222**(1): p. 192-200.
382. Del Rio, L.A., Peroxisomes as a cellular source of reactive nitrogen species signal molecules. *Arch Biochem Biophys*, 2011. **506**(1): p. 1-11.
383. Hsieh, L.C., et al., Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in Arabidopsis by deep sequencing. *Plant Physiol*, 2009. **151**(4): p. 2120-32.
384. Himelblau, E. and R.M. Amasino, Nutrients mobilized from leaves of Arabidopsis thaliana during leaf senescence. *Journal of Plant Physiology*, 2001. **158**(10): p. 1317-1323.
385. Chen, W., et al., Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell*, 2002. **14**(3): p. 559-74.
386. Guo, Y. and S.S. Gan, Convergence and divergence in gene expression profiles induced by leaf senescence and 27 senescence-promoting hormonal, pathological and environmental stress treatments. *Plant Cell Environ*, 2012. **35**(3): p. 644-55.
387. van der Graaff, E., et al., Transcription analysis of arabidopsis membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiol*, 2006. **141**(2): p. 776-92.
388. Gan, S., Hormonal regulation of senescence, in *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action*, P.J. Davies, Editor. 2005, Kluwer Academic: Netherlands. p. 561-581.
389. Noh, Y.S. and R.M. Amasino, Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of SAG12. *Plant Mol Biol*, 1999. **41**(2): p. 181-94.
390. Balazadeh, S., et al., Natural developmental variations in leaf and plant senescence in Arabidopsis thaliana. *Plant Biol (Stuttg)*, 2008. **10 Suppl 1**: p. 136-47.
391. Kawano, T., et al., Salicylic Acid Induces Extracellular Superoxide Generation Followed by an Increase in Cytosolic Calcium Ion in Tobacco Suspension Culture: the Earliest Events in Salicylic Acid Signal Transduction. *Plant Cell Physiology*, 1998. **39**(7): p. 721-730.
392. Kawano, T. and S. Muto, Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture. *J Exp Bot*, 2000. **51**(345): p. 685-93.
393. Kawano, T., Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell Rep*, 2003. **21**(9): p. 829-37.
394. Kadono, T., et al., Increased anion channel activity is an unavoidable event in ozone-induced programmed cell death. *PLoS One*, 2010. **5**(10): p. e13373.
395. Kawano, T., T. Hiramatsu, and F. Bouteau, Signaling Role of Salicylic Acid in Abiotic Stress Responses in Plants *Plant Growth and Development*. Vol. Salicylic Acid. 2013: Springer.

396. Baebler, S., et al., Dynamics of responses in compatible potato-Potato virus Y interaction are modulated by salicylic acid. *PLoS One*, 2011. **6**(12): p. e29009.
397. Krecic-Stres, H., et al., Systemic Potato virus Y NTN infection and levels of salicylic and gentisic acids in different potato genotypes. *Plant Pathology*, 2005. **54**(4): p. 441– 447.
398. Jay, F., et al., Misregulation of AUXIN RESPONSE FACTOR 8 underlies the developmental abnormalities caused by three distinct viral silencing suppressors in *Arabidopsis*. *PLoS Pathog*, 2011. **7**(5): p. e1002035.
399. Love, A.J., et al., Cauliflower mosaic virus protein P6 inhibits signaling responses to salicylic acid and regulates innate immunity. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e47535.
400. Helenius, E., et al., Optimization of Gene Delivery into *Arabidopsis*, Tobacco and Birch Using the *Helios™ Gene Gun System*, University of Helsinki: Helsinki.
401. Rabino, I. and A.L. Mancinelli, Light, temperature, and anthocyanin production. *Plant Physiol*, 1986. **81**(3): p. 922-4.
402. Thordal-Christensen, H., et al., Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal*, 1997. **11**(6): p. 1187-1194.
403. Wohlgemuth, H., et al., Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant, Cell and Environment*, 2002. **717-726**(25).
404. Ramakers, C., et al., Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett*, 2003. **339**(1): p. 62-6.
405. Benjamini, Y. and Y. Hochberg, Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 1995. **57**(1): p. 289-300.