

Tesis Doctoral

Estudio del rol de la proteína de cápside del virus TMV-Cg en la modulación de la expresión génica y en la alteración de factores endógenos del hospedante *Arabidopsis thaliana*

Rodríguez, María Cecilia

2015-12-03

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Rodríguez, María Cecilia. (2015-12-03). Estudio del rol de la proteína de cápside del virus TMV-Cg en la modulación de la expresión génica y en la alteración de factores endógenos del hospedante *Arabidopsis thaliana*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Rodríguez, María Cecilia. "Estudio del rol de la proteína de cápside del virus TMV-Cg en la modulación de la expresión génica y en la alteración de factores endógenos del hospedante *Arabidopsis thaliana*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-12-03.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Estudio del rol de la proteína de cápside del virus TMV-Cg en la
modulación de la expresión génica y en la alteración de factores
endógenos del hospedante *Arabidopsis thaliana***

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

Lic. María Cecilia Rodríguez

Director de tesis: Dr. Sebastián Asurmendi

Consejero de Estudios: Dr. H. E. Hopp

Lugar de trabajo: Instituto de Biotecnología, INTA Castelar

TÍTULO

Estudio del rol de la proteína de cápside del virus TMV-Cg en la modulación de la expresión génica y en la alteración de factores endógenos del hospedante *Arabidopsis thaliana*

RESUMEN

Las enfermedades producidas por patógenos virales generan cuantiosas pérdidas en la producción de cultivos de importancia agropecuaria. El impacto de los virus en la alteración de la expresión génica explica, en parte, las reducciones en el rendimiento de estos cultivos. Por este motivo, entender los mecanismos por los cuales los virus modulan la expresión de genes del hospedante es de vital importancia para proponer estrategias antivirales efectivas o perfeccionar las que se están utilizando en la actualidad.

En este estudio, se empleó una línea transgénica de *Arabidopsis thaliana* que expresa la proteína de cápside del virus TMV-Cg (CgCP) con el objetivo de estudiar el efecto de esta proteína en las alteraciones de la expresión génica y su concomitante impacto sobre los mecanismos de defensa. Inicialmente, se analizó el efecto de la CgCP sobre la expresión de genes implicados en vías de defensa, observándose que la CgCP modula negativamente la expresión de genes que participan de la vía de defensa mediada por ácido salicílico (SA, por sus siglas en inglés) y que, además, tienen un rol reportado frente a defensa antiviral. A continuación, se procedió a analizar el impacto global de la CgCP sobre el transcriptoma de *A. thaliana* por medio de un microarreglo realizado en plantas que expresan la CgCP. Los resultados indicaron que la CgCP altera la expresión de genes que están implicados en una amplia variedad de procesos. El uso de herramientas bio-informáticas permitió determinar que la CgCP regula negativamente la expresión de una red de genes que presentan en sus regiones promotoras motivos de respuesta a los factores de transcripción W-BOX y al factor *Non-Expressor of PR 1 (NPR1)*, un factor central en la vía del SA. Paralelamente, se observó que durante la infección con el virus TMV-Cg los genes dependientes de la vía de SA son incrementados a tiempos tempranos de infección, mientras que su expresión disminuye a tiempos tardíos.

Por otra parte, se observó que la expresión de la CgCP en plantas de *A. thaliana* produce un retraso en el crecimiento. En base a estas observaciones, se procedió a estudiar la capacidad de la CgCP de alterar la estabilidad de las proteínas DELLA, las cuales están implicadas en la regulación de vías de desarrollo, como también en la supresión de la vía de defensa mediada por SA. Se observó que la proteína CgCP altera la estabilidad de la proteína RGA, una de las cinco proteínas DELLAs codificadas por el genoma de *A. thaliana*. Por otra parte, ensayos realizados con el virus TMV-Cg mostraron que el virus altera la estabilidad de otra proteína DELLA, la proteína GAI. Además, plantas mutantes para cuatro de los cinco genes que codifican proteínas DELLAs acumularon menores niveles del virus TMV-Cg que las plantas salvajes.

En conclusión, los resultados de esta tesis muestran que la CgCP altera la expresión de un amplio conjunto de genes de *A. thaliana*. En particular, esta proteína modula negativamente un grupo de genes de defensa, dependientes de la vía de SA, a través de la estabilización de las proteínas DELLA. Estos resultados sugieren que la CgCP alteraría la estabilidad de las proteínas DELLAs como un mecanismo para modular negativamente las respuestas de defensa antivirales.

Palabras claves: Virus TMV-Cg, proteína de cápside, proteínas DELLAs, defensa innata, ácido salicílico.

TITLE

Study on the role of TMV-Cg capsid protein in the modulation of gene expression profile
and host factors in *Arabidopsis thaliana*

ABSTRACT

Phytopathogenic viruses produce significant losses on economically important crops species. Those losses are mostly dependent on the alterations of gene expression during viral infections. Consequently, the study of the virus-induced alterations in the gene expression profile is important for the development of strategies to reduce the losses caused by plant virus.

In this study we used transgenic *Arabidopsis* plants that express the capsid protein of TMV-Cg (CgCP) with the aim of studying alterations in gene expression and defense mechanisms. First, we studied a subset of genes involved in antiviral defense pathways that are regulated by salicylic acid (SA), and found that CgCP negatively modulates the SA mediated defense pathways. Then, we studied the global impact of CgCP expression in the *A. thaliana*'s transcriptome. The results indicate that the CgCP alters the expression of genes that are involved in a wide range of processes. By means of the use of bioinformatic tools, we found CgCP negatively regulates a gene network dependent on *Non-Expressor of PR 1(NPR1)*, which is a central player in the SA mediated response. In parallel, we observed that the expression of this set of genes is also altered during TMV-Cg virus infection. The expression is up-regulated at early time post infection and down-regulated at late time of TMV-Cg infection.

Also, we observed that the CgCP expression reduces plant growth of *A. thaliana*. Based on these data, we proceeded to study the alterations of DELLA proteins by CgCP, which are involved in the regulation of development and defense pathways. We found that the CgCP alters the stability of RGA, which is one of the five DELLA proteins codified by *A. thaliana*. Furthermore, the stability of DELLAs proteins was altered during the TMV-Cg infection. Moreover, it was observed that DELLA proteins negatively modulated the defense transcript profiles during TMV-Cg infection. As a result, TMV-Cg accumulation was significantly lower in the quadruple-DELLA mutant *Arabidopsis* plants than in wild type plants.

Taken together, in this study we demonstrated that CgCP alters the expression of genes involved in a wide range of processes, particularly, negatively regulates the salicylic acid-mediated defense pathway by stabilizing the DELLA proteins. These results suggest that CgCP alters the stability of DELLAs as a mechanism of negative modulation of antiviral defense responses.

Keywords: TMV-Cg virus, capsid protein, DELLAs proteins, innate defense, salicylic acid.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS

TMV-Cg Coat Protein stabilizes DELLA proteins and in turn negatively modulates salicylic acid-mediated defense pathway during *Arabidopsis thaliana* viral infection

Maria Cecilia Rodriguez, Gabriela Conti, Diego Zavallo, Carlos Augusto Manacorda, and Sebastian Asurmendi. (2014) *BMC Plant Biology* 2014, **14**:210 doi:10.1186/s12870-014-0210-x.

Otras publicaciones realizadas durante el período de mi beca doctoral:

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

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

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.

ÍNDICE

TÍTULO	II
RESUMEN	II
TITLE	III
ABSTRACT	III
ABREVIATURAS	IX
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 El impacto de las enfermedades virales en la agricultura	1
1.1.1 Las pérdidas ocasionadas por las infecciones virales	1
1.1.2 Estrategias empleadas en el control de las virosis	2
1.2 Características de las enfermedades virales en plantas	3
1.2.1 Interacciones compatibles e incompatibles	4
1.2.2 Características generales del ciclo de infección viral en hospedantes susceptibles	4
1.2.3 El desarrollo de las interacciones de tipo compatible	6
1.2.4 El desarrollo de síntomas durante las interacciones de tipo compatible	7
1.3 Clasificación de los virus.....	7
1.3.1 El género Tobamovirus	8
1.4 El rol multifuncional de las proteínas de cápside de los Tobamovirus durante el desarrollo de la infección viral	11
1.5 El rol de la proteína de cápside en la resistencia mediada por cápside.....	12
1.6 Los mecanismos de defensa	13
1.6.1 Mecanismos de reconocimiento de patógenos: “el modelo zig-zag”	13
1.6.2 La inmunidad desencadenada por PAMPs: el reconocimiento de PAMPs por proteínas PRR extracelulares	14
1.6.3 La inmunidad desencadenada por efectores: el reconocimiento de los efectores por proteínas intracelulares codificadas por genes R	15
1.6.4 Mecanismos de reconocimiento de patógenos virales	16
1.6.5 Las estrategias de infección de los patógenos y los mecanismos de defensa inducidos.....	17
1.7 El rol de las fitohormonas y las especies reactivas de oxígeno (ROS) en los mecanismos defensa contra patógenos.....	19
1.7.1 El rol del SA en la defensa antiviral.....	20
1.7.2 El rol del JA en defensa antiviral	21
1.7.3 El rol del etileno en la defensa antiviral.....	22
1.7.4 El rol de las ROS en la respuesta frente a patógenos virales	24
1.7.5 La interacción de especies reactivas de oxígenos y otras señales involucradas en.....	27
defensa	27
1.7.6 La resistencia sistémica adquirida (SAR).....	28

1.8 El rol del silenciamiento génico en la defensa frente a patógenos virales.....	29
1.8.1 Amplificación de la señal de silenciamiento génico	30
1.9 El rol del ácido giberelico (GA) en respuesta de estrés y modulación de vías hormonales	31
1.9.1 La vía de señalización mediada por GA.....	31
1.9.2 El rol de las proteínas DELLAs en la vía de GA	32
1.9.3 El rol de las giberelinas en la regulación del desarrollo durante condiciones de estrés	33
1.9.4 El rol de las proteínas DELLAs en la modulación de las vías de SA y JA	34
1.10 La modulación de la respuesta de defensa durante las interacciones hospedante-patógeno.....	36
1.10.1 El rol de la vía de ubiquitinación en defensa y su alteración por patógenos virales	36
1.10.2 Los factores de transcripción de la familia WRKY y su rol durante las infecciones virales.....	38
1.10.3 El rol del SA y su modulación por proteínas virales.....	39
1.11 Objetivo General.....	40
1.11.1 Objetivos específicos	40
1.12 HIPÓTESIS	41
1.13 Estructura de la Tesis	41
 CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	 43
2.1 Material Vegetal empleado.....	43
2.2 Desarrollo de la línea pRGA::GFP-RGA x CP#72 por medio de cruzamientos	43
2.3 Protocolos generales de Biología Molecular.....	44
2.3.1 Extracción de ARN y confección de ADNc para RT-qPCR.....	44
2.3.2 Diseño de oligonucleótidos	44
2.3.3. Selección de genes de referencia para su utilización como control interno	44
2.3.4 Realización de RT-qPCR, obtención y análisis de datos de expresión	44
2.3.5 Extracción de ADN genómico por medio del protocolo de DELLA PORTA.....	45
2.3.6 Preparación de células de Agrobacterium electrocompetentes	45
2.3.7 Electroporación de Agrobacterium.....	46
2.4 Análisis bioinformáticos	46
2.4.1 Clasificación funcional de los genes expresados diferencialmente en las plantas de la línea CP#72 inducida versus la línea CP#72 no inducida.....	46
2.4.2. Empleo del programa ATTED para la generación de redes de co-expresión.....	46
2.4.3 Empleo de herramientas bio-informáticas para la búsqueda motivos regulatorios en un set de genes-co expresados	47
2.5 Análisis de microscopia	48
2.5.1 Visualización de la proteína GFP-RGA por microscopia de fluorescencia.....	48
2.5.2 Visualización de YFP-GAI por medio de microscopia de fluorescencia	48
2.5.3 Análisis cuantitativo de la acumulación de GFP y YFP	49
2.6 Experimentos de expresión transientes realizados en <i>N. benthamiana</i>	49
2.7 Análisis del desarrollo de <i>A.thaliana</i>	49
2.8 Metodología empleada para los ensayos de infecciones virales	50
2.8.1 Infección de <i>A. thaliana</i> con el virus TMV-Cg.....	50
2.8.2 Cuantificación del título del virus TMV-Cg por medio de la técnica de RT-qPCR	50
2.8.3 Infección de <i>A. thaliana</i> con el virus TuMV.....	51

2.8.4 Cuantificación del virus TuMV por medio de ELISA	51
2.9 Tratamiento con hormonas e inductor	52
2.9.1 Tratamiento con SA	52
2.9.2 Tratamiento con GA ₃	52
2.9.3 Inducción de la expresión de la cápside del virus TMV-Cg en plantas transgénicas	52
2.10 Determinación de ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA)	53
CAPÍTULO 3:ANÁLISIS DEL ROL DE LA PROTEÍNA DE CÁPSIDE DEL VIRUS TMV-CG SOBRE LA MODULACIÓN DE VÍAS DE DEFENSA.....	54
Introducción	54
Resultados	55
3.1 Estudio de la cinética de acumulación de la proteína CgCP en plantas transgénicas que expresan la CgCP bajo un promotor inducible	55
3.2 Cuantificación relativa de genes implicados en la respuesta a SA en plantas que expresan la CP de TMV-Cg de manera inducible y de manera constitutiva	57
3.3 Análisis del rol de la CP sobre la vía de señalización mediada por SA	59
3.4 Determinación del ácido salicílico (SA) y del ácido jasmónico (JA) en plantas que expresan la CgCP	60
3.5 Infección de plantas que expresan la CP del TMV-Cg con el virus TuMV	62
Discusión	63
Conclusiones.....	66
CAPÍTULO 4: CARACTERIZACIÓN GLOBAL DEL EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE LA CGCP SOBRE LA MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL HOSPEDANTE A. THALIANA... 67	
Introducción	67
Resultados	68
4.1 Análisis biológico de los datos obtenidos por medio de un perfil de expresión realizado en una línea transgénica de <i>Arabidopsis thaliana</i> que expresa CP de TMV-Cg bajo un promotor inducible....	68
4.2 Análisis de los niveles de expresión de los genes candidatos mediante RT-qPCR en una línea transgénica de <i>Arabidopsis thaliana</i> que expresa CP de TMV-Cg bajo un promotor inducible	74
4.3 Empleo de herramientas bioinformáticas para la caracterización de genes implicados en vías de defensa cuya expresión disminuye por efecto de la CgCP	79
4.4 Estudio de la expresión de genes que contienen en sus secuencias promotoras a los motivos TL1ATSAR y W-BOXNPR1 en la línea transgénica de <i>Arabidopsis thaliana</i> que expresa CP de TMV-Cg bajo un promotor inducible	89
4.5 La infección con el virus TMV-Cg altera la expresión de un grupo de genes co-expresados que tienen en sus secuencias promotoras los motivos TL1ATSAR y W-BOXNPR1	91
Discusión	92
4.1 La expresión de la proteína de cápside del virus TMV-Cg modula la expresión de genes involucrados en una amplia variedad de procesos	93
4.2 La expresión de la CgCP modula negativamente la expresión de genes involucrados en vías de defensa que presentan en sus promotores los motivos W-BOX y TL1ATSAR	95
4.3 La proteína CgCP altera la expresión de genes que están involucrados en vías de defensa frente a patógenos bacterianos y fúngicos	97
4.4 La infección con el virus TMV-Cg altera la expresión de un grupo de genes co-expresados que tienen en sus secuencias promotoras los motivos TL1ATSAR y W-BOX	98

Conclusiones.....	99
CAPÍTULO 5: LA CGCP ESTABILIZA A LAS PROTEÍNAS DELLAS, OCASIONANDO LA MODULACIÓN NEGATIVA DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA	101
Introducción	101
Resultados	102
5.1 Análisis por medio del programa Genevestigator de los genes alterados por la proteína CgCP ...	102
5.2 La proteína CgCP incrementa la expresión de los genes blancos de las proteínas DELLAs	104
5.2 Las proteínas DELLAs modulan la expresión de genes involucrados en vías de defensa alterados por la proteína de cápside	106
5.4 La expresión de la CgCP atrasa el crecimiento y el tiempo de transición floral	107
5.5 La proteína CgCp estabiliza a las proteínas DELLAs en plantas transgénicas que expresan la CgCP bajo un promotor inducible.....	111
5.6 La infección con TMV-Cg estabiliza a las proteínas DELLA en el hospedante <i>N. benthamiana</i>	114
5.7 Las proteínas DELLAs modulan la expresión de genes durante la infección con el virus TMV-Cg .	117
5.8 La estabilización de las proteínas DELLAs atenúa la respuesta de defensa frente al virus TMV-Cg	120
Discusión	121
5.1 La expresión de la proteína CgCP altera el desarrollo de <i>A. thaliana</i>	121
5.2 La proteína CgCp estabiliza a las proteínas DELLAs	122
5.3 El rol de las proteínas DELLAs en la modulación de la defensa antiviral	123
5.4 El rol de las proteínas DELLAs durante la infección con el virus TMV-Cg.....	125
Conclusiones.....	127
CAPÍTULO 6: DISCUSIÓN GENERAL.....	128
APÉNDICE A: SELECCIÓN DE GENES DE REFERENCIA PARA ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE RT-QPCR	131
APÉNDICE B: PUESTA A PUNTO Y ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE RT-QPCR: INFORMACIÓN MÍNIMA REQUERIDA PARA LA PUBLICACIÓN DE EXPERIMENTOS DE RT-QPCR (MIQE)	132
APÉNDICE C: LISTA DE OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS.....	135
Primers usados en el Capítulo 3	135
Primers usados en el Capítulo 4	135
Primers usados en el Capítulo 5	136
APÉNDICE D: LISTA DE GENES CO-EXPRESADOS OBTENIDA POR MEDIO DEL PROGRAMA ATTED-II	138
REFERENCIAS.....	140

ABREVIATURAS

ADN: ácido deoxiribonucleico.

AOX : oxidasa alternativa

ARN: ácido ribonucleico.

CaMV: Virus del mosaico del coliflor (del inglés *Cauliflower mosaic virus*)

CMV: Virus del mosaico del pepino (del inglés *Cucumber mosaic virus*)

CgCP: proteína de cápside viral del virus TMV-Cg.

CP: proteína de cápside viral, “coat protein”.

CP#71: línea transgénica que expresa la CgCP bajo el promotor 35S

CP#72: línea transgénica que expresa la CgCP bajo un promotor inducible

CTV: *Citrus tristeza closterovirus*

DELLAs: proteínas represoras de la vía de GA que contienen un motivo DELLA.

DNAc: ácido desoxirribonucleico copia.

dpi.: días post inoculación

dpa.: días post agroinfiltración.

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

ES: error standart

ETI: Inmunidad desencadenada por efector (del inglés *effector triggered immunity*)

ET: etileno

ETS: Susceptibilidad desencadenada por un efector (del inglés, *effector triggered susceptibility*)

Fig.: Figura.

flg22: péptido de 22 aminoácido de la región N terminal de la flagelina

GA: ácido giberélico (por *gibberellic acid*)

GAI : *insensible a giberélica* (por *Gibberellin-insensitive*)

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

GID1: receptor de GA (por GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1)

HR: respuesta hipersensible (por *hypersensitive response*)

JA: ácido jasmónico (por *jasmonic acid*)

kDa: kilo Dalton.

mARN: ARN mensajero

miARN o miR: micro RNA (*microRNA*).

MOF: methoxyfenozide

MP: proteína de movimiento viral.

nm: nanómetros

NPR1: *Non-expressor of PRI*

nt: nucleótidos.

N.b. : *Nicotiana benthamiana*

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

ORMV: *Oilseed rape mosaic virus*.

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés *pathogen-associated molecular patterns*)

pb: pares de bases.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PIP: ácido piperónico

PLRV: *Potato leaf rolled virus*

PM: peso molecular.

PPV: Plum Pox virus

PR: proteínas relacionadas a la patogénesis (por *pathogen-related proteins*)

PRSV: *Papaya ringspot virus*

PTI: Inmunidad desencadenada por PAMPs (*PAMP triggered immunity*)

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

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

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

RDR: RNA polimerasa celular dependientes de ácido ribonucleico.

RDV: Virus del enanismo del arroz (del inglés *Rice dwarf virus*)

RGA: *Repressor of gal-3*, proteína de la familia DELLA

ROS: especies reactivas de oxígeno (del inglés *reactive oxygen species*)

RT-qPCR : PCR cuantitativa en tiempo real

SA: ácido salicílico (por *salicylic acid*)

SAR: Resistencia sistémica adquirida (por *systemic acquired resistance*)

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

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

TMV: *Tobacco mosaic virus*.

TMV-Cg: *Crucifer infecting Tobacco Mosaic Virus*

ToMV: *Tomato mosaic tobamovirus*

viARNs: siARNs de origen viral.

VSRs: supresores de silenciamiento de ARN de origen viral.

μm: micrómetro

μM: micromolar

WT: plantas salvajes (por *wild type*)

YFP: proteína amarilla fluorescente (*Yellow Fluorescent Protein*)

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 El impacto de las enfermedades virales en la agricultura

1.1.1 Las pérdidas ocasionadas por las infecciones virales

Las enfermedades virales disminuyen la calidad y el rendimiento de cultivos de importancia económica. Se estima que las pérdidas anuales de cultivos a escala mundial producidas por el efecto de patógenos y malezas equivalen a U\$D 220.000 millones (Agrios, 2005). Las pérdidas atribuibles a virus se calculan en un 10-15% de las totales (Loebenstein et al, 2010), 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 nuestro país, los virus afectan a diversos cultivos de interés agronómico, entre los cuales se encuentran la papa, el maíz y los cítricos.

Los virus que mayormente atacan a los cultivares de papa son: el virus Y (PVY, de *Potato virus Y*), el virus X (PVX, de *Potato virus X*) y el virus del enrollamiento de la hoja de la papa (PLRV, de *Potato leaf rolled virus*). Estos virus son propagados por medio de tubérculos-semilla infectados, mediante el uso de herramientas contaminadas o por vectores como insectos, nemátodos y hongos. El manejo del cultivo de papa, basado en una propagación agámica, lleva a una gran acumulación de patógenos, en particular de virus. Una de las estrategias empleadas para controlar las enfermedades virales es el uso de semilla de papa certificada con un bajo contenido de virus (Scholthof et al., 2011), sin embargo esta estrategia tiene como contrapartida el incremento de los costos de producción.

El virus del Mal del Rio Cuarto es un virus transmitido por insectos que afecta especialmente al cultivo de maíz y en menor medida al cultivo de trigo. Produce síntomas severos como enanismo y ocasiona la disminución en la producción de granos. Este virus fue caracterizado a fines de la década del sesenta (Nome et al., 1981), coincidentemente con la introducción de nuevas variedades de maíz provenientes de Estados Unidos. Desde su aparición, en el centro sur de Córdoba, este virus ha

ocasionado grandes pérdidas en sucesivas campañas. En los últimos años, las pérdidas producidas por este virus se han reducido por medio del empleo de cultivares tolerantes y por medio de la modificación del tiempo de siembra para atenuar la incidencia de la enfermedad.

El virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza closterovirus* , CTV) es otro de los virus que afecta a casi todas especies del género *Citrus* entre ellas el limón ,un cultivo de gran importancia económica para el país. Los síntomas inducidos por el CTV son diversos, encontrándose árboles asintomáticos portadores del virus y otros con diversas sintomatologías (Rocha Peña et al, 1998). Los síntomas que provocan mayor impacto económico son el declinamiento rápido y la muerte de los naranjos y la acanaladura en la madera de los naranjos y limoneros ácidos. No existe una estrategia de control aplicable para todas las variedades, pero en líneas generales se recomienda el empleo de material de propagación certificado y el uso de pies tolerantes o resistentes al CTV.

1.1.2 Estrategias empleadas en el control de las virosis

En general, las estrategias de manejo para controlar las enfermedades virales consisten en el empleo de medidas preventivas que incluyen el uso de semillas u órganos vegetativos certificados libres de virus, la eliminación de los posibles reservorios de virus y la modificación de prácticas de siembra y cosecha. Si el virus tiene un vector de transmisión conocido, el control o exclusión del vector es sumamente importante. Por ejemplo, insectos y hongos vectores pueden controlarse con insecticidas y fungicidas, respectivamente. Alternativamente, las enfermedades virales pueden controlarse por medio del uso de variedades tolerantes o resistentes a virus (Gergerich and Dolja, 2006).

En los últimos años se ha empleado la técnica de transgénesis para el desarrollo de cultivares resistentes a virus. En particular, esta tecnología ha sido empleada para controlar el virus Papaya Ringspot virus (PRSV), el cual produjo pérdidas importantes en la producción de papaya entre los años 1992 y el año 1998. A partir del año 1998, con el empleo de cultivares resistentes a PRSV, se disminuyó considerablemente el impacto de este virus (Gonsalves et al., 2004). Por otra parte, esta técnica también ha sido útil para el control del virus Plum Pox Virus (PPV). Este virus produce una enfermedad

denominada Sharka la cual genera pérdidas devastadoras en la producción de durazneros y a otros cultivos de carozo (Scholthof et al., 2011). La gran importancia de la enfermedad producida por este virus motivó el desarrollo de una variedad de duraznos resistentes que fue evaluada a campo durante diez años y que ha demostrado ser exitosa en el control de este virus (Polák et al., 2012).

Otro método de control, que ha sido ensayado bajo condiciones de crecimiento monitoreadas, consiste en la aplicación de compuestos químicos que generan tolerancia frente a ciertos patógenos. La aplicación de ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA) ha sido una estrategia eficiente para controlar la incidencia de varios patógenos virales, entre ellos el virus del mosaico del pepino (CMV), el virus del mosaico del tabaco (TMV), y el virus del arrugamiento del nabo (TCV) en distintas especies. Por medio de esta estrategia se obtuvo una disminución de entre un 80 a un 90 % en la acumulación viral (Shang et al, 2010). Sin embargo, este método de control aún no ha sido ensayado en condiciones de campo.

Tanto el perfeccionamiento de las técnicas de control empleadas en la actualidad, como el desarrollo de nuevos métodos para el control de enfermedades virales requiere entender los mecanismos involucrados en la relación hospedante-patógeno y en la producción de síntomas. Esto último es de vital importancia ya que el desarrollo de síntomas afecta tanto al rendimiento como a la calidad de la cosecha (Hull, 2002). En particular, el estudio y caracterización de los componentes implicados en la interacción hospedante-patógeno ha cobrado una gran importancia en los últimos años debido a la necesidad de incrementar la productividad de los cultivos para satisfacer la mayor demanda de alimentos. Por otra parte, existe un interés creciente en disminuir el empleo de agroquímicos. En conclusión, los conocimientos que permitan el desarrollo de variedades resistentes a patógenos por medio de tecnologías que eviten o reduzcan la aplicación de agroquímicos serán de gran importancia para poder responder a las demandas de la población en los próximos años.

1.2 Características de las enfermedades virales en plantas

1.2.1 Interacciones compatibles e incompatibles

Como se mencionara previamente, las enfermedades producidas por virus generan grandes pérdidas en la producción de cultivos de importancia económica. Estas pérdidas en el rendimiento de la producción son consecuencia de las alteraciones metabólicas y fisiológicas inducidas por los virus vegetales. Sin embargo, no todas las interacciones planta-virus conllevan al desarrollo de enfermedades en las plantas (Gergerich and Dolja, 2006) dado que los virus poseen un rango limitado de hospedantes (Gergerich and Dolja, 2006; Scholthof et al, 2011). El genotipo del hospedante determina principalmente la susceptibilidad o resistencia de los cultivares vegetales frente a los virus. Por ejemplo, el genotipo del hospedante puede determinar que la planta carezca de factores requeridos para la reproducción del virus y su dispersión en el hospedante y por ende el hospedante resulta inmune a la infección viral. Por otra parte, el hospedante puede portar genes de resistencia (genes R) en su genoma, los cuales codifican para proteínas capaces de reconocer proteínas virales específicas y generar una activación rápida de genes de defensa, llevando a una resistencia local y adquirida (SAR) y produciendo a menudo la muerte celular programada en un sitio cercano al sitio de infección (Jones and Dangl, 2006). Este tipo de interacciones se denomina, en la literatura, interacciones de tipo incompatible. Por el contrario, las interacciones de tipo compatible se producen en ausencia de una respuesta capaz de evitar la dispersión sistémica de los virus. Si bien las pérdidas económicas asociadas a enfermedades virales son ocasionadas por las interacciones de tipo compatible, las respuestas de defensa involucradas durante estas interacciones se encuentran poco caracterizadas en la literatura (Huang et al., 2005)(Love et al., 2005).

1.2.2 Características generales del ciclo de infección viral en hospedantes susceptibles

El inicio de las infecciones virales comienza con el ingreso de los virus a las células vegetales, para lo cual los mismos deben traspasar la cutícula de las células e ingresar al citoplasma celular. Este ingreso suele ser facilitado por medio del daño mecánico inducido a la planta o por insectos vectores. Posteriormente, se produce el desensamblado del virión y la traducción/replicación del genoma viral en los tejidos

inoculados. Los virus codifican para proteínas virales de movimiento (MP) que, por medio de la alteración de los plasmodesmos, permiten el movimiento entre células. A través de los plasmodesmos, los complejos de transporte viral se desplazan hacia nuevos tejidos (Ver Figura 1.1), permitiendo que el virus se disperse en promedio 1 mm por día (8-10 células).

Además, los virus son transportados hacia los tejidos sistémicos a través del floema (transporte de larga distancia). Durante el transporte de larga distancia se produce la translocación del virus desde las células del mesófilo hacia los elementos cribosos, pasando por las células del parénquima vascular y las células acompañantes. Los elementos cribosos están conectados a las células acompañantes por medio de plasmodesmos especializados denominados poro de unidades plasmodesmáticas. Estos poros poseen un tamaño de exclusión mayor que el de los plasmodesmos, lo que permite que el ingreso de las macromoléculas hacia los elementos cribosos ocurra por simple difusión. Sin embargo, se especula que las partículas virales no atravesarían estos poros por simple difusión, sino de manera regulada (Hipper et al., 2013). Una vez que las partículas virales ingresan a los elementos cribosos son transportadas hacia los tejidos sistémicos siguiendo la ruta de los fotoasimilados (Ver Figura 1.1) (Hipper et al., 2013). Esto determina un patrón general para la dispersión de los virus, en el cual las raíces, tubérculos y hojas superiores jóvenes son los primeros tejidos en ser invadidos. El arribo a los tejidos sistémicos tarda entre 2 y 5 días para la mayoría de los virus.

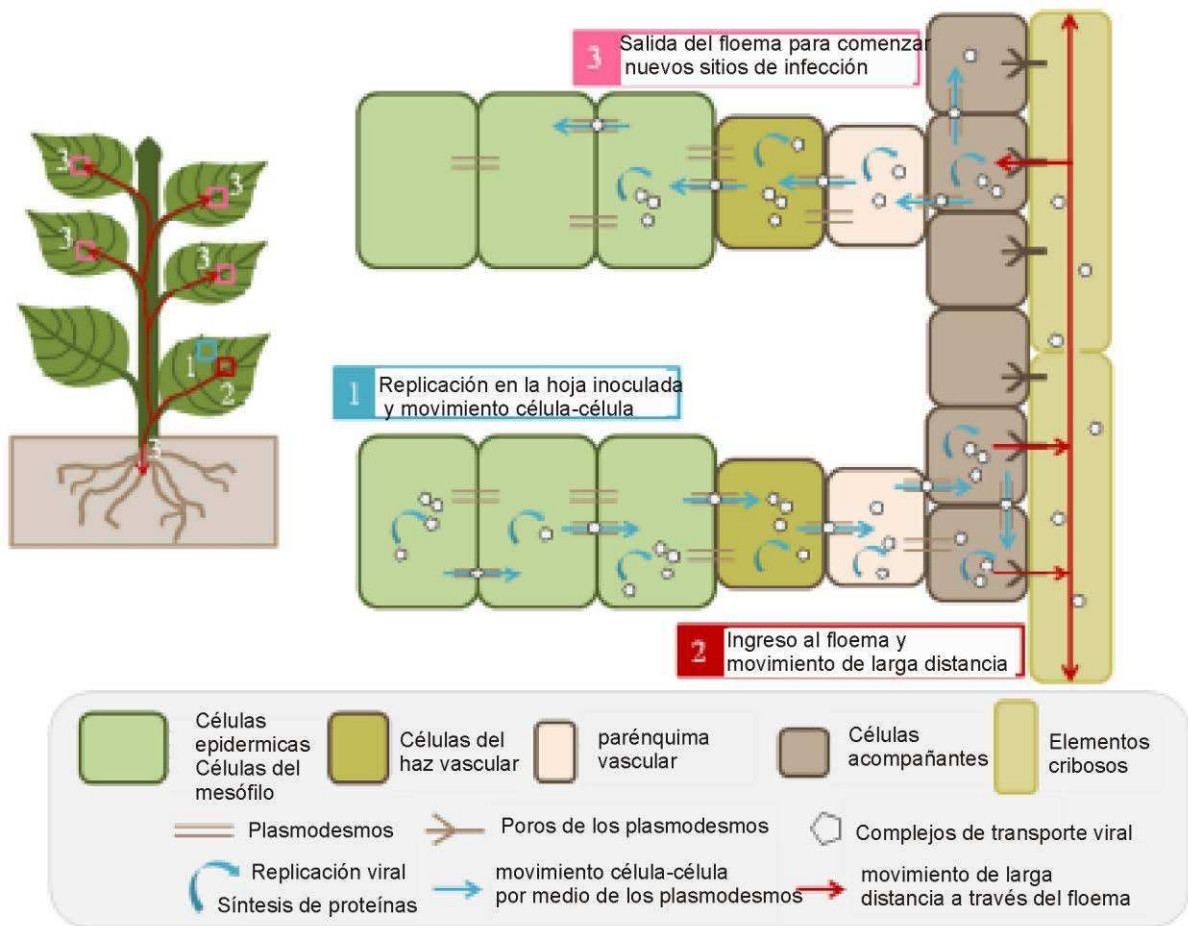


Figura 1.1: Representación general del transporte viral célula a célula y de larga distancia en los tejidos vegetales.

Esquema del transporte viral hacia los tejidos sistémicos, movimiento entre células por medio de los plasmodesmos (1), movimiento de larga distancia(2), comienzo de un nuevo ciclo de replicación (3). Tomado de Hipper et al, 2013.

1.2.3 El desarrollo de las interacciones de tipo compatible

Durante el transcurso de las interacciones de tipo compatible la expresión génica del hospedante se altera en gran medida. El empleo de técnicas que permiten obtener grandes cantidades de información por experimento, como por ejemplo el uso de microarreglos, han permitido caracterizar los procesos celulares que son afectados durante las infecciones virales. Un estudio realizado por Postnikova y Nemchinov (2012) en el cual se analizó la información provista por diversos estudios de microarreglos, mostró que existe una gran diversidad de genes alterados durante las infecciones virales

en hospedantes susceptibles. Entre los genes inducidos se encuentran sobre-representados genes de respuesta a estrés abiótico, genes de respuesta a sustancias orgánicas e inorgánicas, genes involucrados en el metabolismo del nitrógeno, y genes involucrados en el transporte de proteínas. Estos últimos genes serían esenciales para facilitar el movimiento intracelular de los virus (Postnikova and Nemchinov, 2012).

1.2.4 El desarrollo de síntomas durante las interacciones de tipo compatible

Los primeros trabajos que caracterizaron la producción de los síntomas ocasionados por patógenos virales asociaban dichos síntomas a la competencia por los recursos del hospedante (Hull, 2002). Sin embargo, en los últimos años se han caracterizado numerosos ejemplos que muestran que la sola presencia de proteínas virales es capaz de producir alteraciones fenotípicas importantes (Conti et al., 2012)(Pallas and García, 2011). Por ejemplo, se ha observado que la proteína P2 del virus del enanismo del arroz (*Rice dwarf virus*, RDV) interactúa con una enzima implicada en la biosíntesis de giberelinas, lo que ocasiona una menor acumulación de los niveles de una de las giberelinas (GA) bioactivas, denominada GA1. Como consecuencia de los menores niveles de GA1, las plantas de arroz muestran síntomas de enanismo. En otro caso, se observó que la expresión del gen P6 del Virus del mosaico del coliflor (CaMV) en *Arabidopsis thaliana*, producía alteraciones fenotípicas similares a los síntomas de la infección, como por ejemplo retraso de la transición floral y clorosis leves (Cecchini et al., 1997) (Zijlstra et al., 1996). El rol de las proteínas virales en la formación de síntomas también fue caracterizado previamente por nuestro grupo de investigación. La expresión simultánea de las proteínas de cápside (CP) y la proteína de movimiento (MP) en plantas de tabaco presentaron alteraciones morfológicas en hojas y flores, algunas de las cuales se asemejan a las producidas durante la infección viral. Estas alteraciones morfológicas fueron atribuidas, en parte, a cambios en la acumulación de ciertos miRNAs involucrados en procesos de desarrollo (Bazzini et al., 2007).

1.3 Clasificación de los virus

La clasificación de los virus se basa en: 1) la naturaleza del ácido nucleico que compone el genoma del virus (ADN o ARN), 2) el tipo de genoma (cadena simple o doble; polaridad positiva o negativa), 3) el número de moléculas que conforman el genoma (fragmentado o no fragmentado) 4) la morfología de las partículas virales (en forma de bastón, filamentosas, etc) 5) el mecanismo de transmisión (mecánica, por semillas, por polen o mediada por un organismo vector) y 6) el efecto citopático que produce (inclusiones, asociación con cloroplastos, núcleos, etc) entre otras características.

1.3.1 El género Tobamovirus

El virus TMV-Cg (por *Crucifer infecting Tobacco Mosaic Virus*) pertenece al género *Tobamovirus*, de la familia *Virgaviridae* (ICTV *International Comitee on Virus Taxonomy*, 2011. <http://ictvonline.org>). El miembro tipo de este género es el *Virus del mosaico del tabaco* (TMV). Los Tobamovirus son capaces de infectar a la mayoría de las Solanáceas (papa, tomate, tabaco), y en particular la variante TMV-Cg es capaz de infectar a la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Yamanaka et al., 1998). La infección en plantas de tabaco con el virus TMV produce un mosaico característico en la hojas (Figura 1.2 A) y un menor crecimiento de las plantas. Por su parte, las plantas de *Arabidopsis* infectadas con el virus TMV-Cg no muestran el síntoma típico de mosaico, pero sí evidencian un menor desarrollo del tamaño de la roseta (Figura 1.2 B).

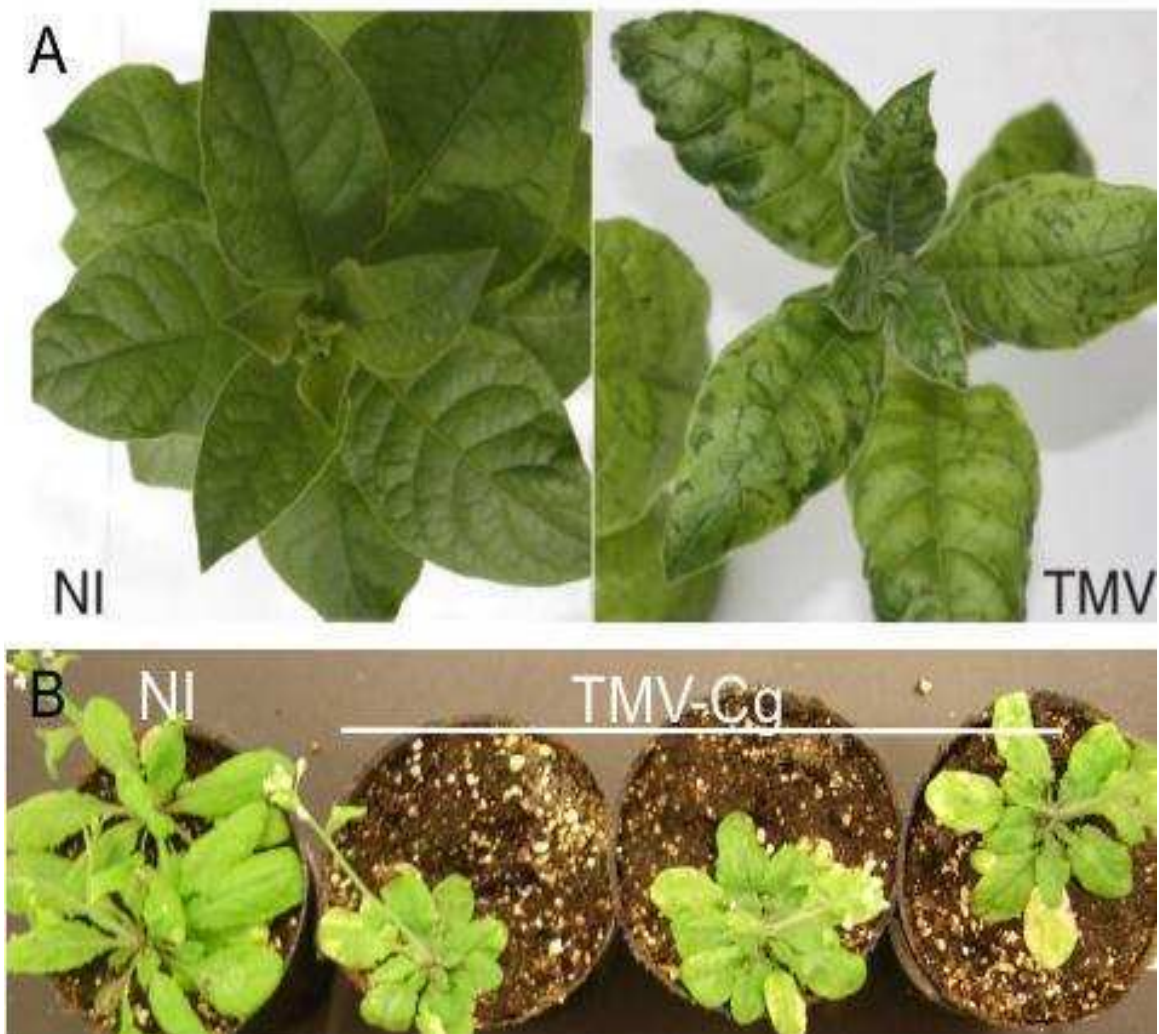


Figura 1.2: A) Síntomas de la enfermedad del mosaico del tabaco en *Nicotiana tabacum*. NI corresponde a plantas de tabaco no inoculadas y TMV refiere a las plantas infectadas que desarrollan los síntomas de la infección. B) Síntomas producidos por el virus TMV-Cg en *Arabidopsis thaliana*. NI corresponde a plantas no inoculadas y TMV-Cg refiere a las plantas infectadas que desarrollan los síntomas de la infección.

Los Tobamovirus poseen un genoma de ARN de cadena simple, positiva, no fragmentado. Los viriones forman partículas rígidas, alargadas, de 300 nm x 12 nm de diámetro (Fig. 1.3 A y 1.3B). El genoma del TMV codifica para un total de 4 proteínas: dos de ellas (126 kDa y 183 kDa) forman la replicasa viral, y las otras dos son la proteína de movimiento (MP) (30 kDa) y la de la cápside (CP) (17,5 kDa). Las proteínas de 126 y 183 kDa son traducidas a partir del ARN genómico, mientras que las proteínas CP y MP son traducidas a partir de ARN sub-genómicos (Ver Fig. 1.3C) (Fauquet et al., 2005).

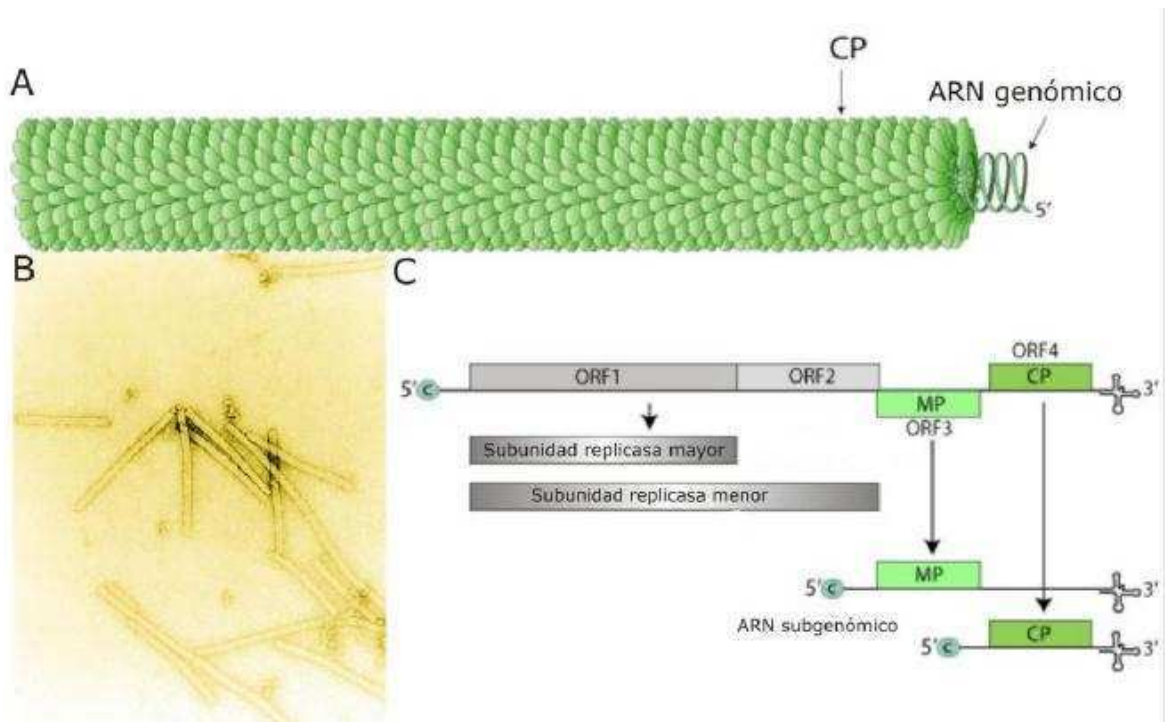


Figura 1. 3. (A) Reconstrucción tridimensional del virión a partir de la CP cristalizada. (B) Viriones de TMV observados al microscopio electrónico. (C) Esquema de la estructura del genoma del TMV. Se muestran los ORFs que codifican para las subunidades mayor y menor de la replicasa y los ARN subgenómicos que codifican para la MP y CP.

Los tobamovirus se transmiten fácilmente por inoculación mecánica. No se conocen insectos vectores y solo eventualmente se pueden llegar a transmitir por semilla (Scholthof, 2000). El ciclo viral comienza con la entrada del virus a la célula vegetal y el posterior desensamblado del virión en el citoplasma. A partir del ARN genómico se traducen las proteínas que componen la replicasa viral que se encarga de sintetizar la hebra complementaria (negativa) del genoma viral, esta hebra negativa sirve como molde para la transcripción de los ARNs sub-genómicos. Su posterior traducción genera en primer lugar a la MP y luego a la CP (Ver Figura 1. 4). Finalmente, el virus puede trasladarse desde la célula de ingreso a la célula contigua y así sucesivamente hasta alcanzar el sistema vascular y generar una infección sistémica. Este proceso suele demorar entre 2 a 3 días en el hospedante *Arabidopsis thaliana* infectado con el virus TMV-Cg.

2001), se propuso que la CP actuaría en el movimiento de larga distancia por medio de su rol en la formación de los mismos. Sin embargo, trabajos posteriores mostraron que el ensamblado de los viriones no era un requisito necesario para el movimiento sistémico de los Tobamovirus. Esto fue demostrado por medio de ensayos realizados con una quimera del virus TMV al cual se le reemplazó la secuencia codificante de la cápside por una secuencia perteneciente al ORF 3 de un Umbravirus (Taliensky et al., 2003). Los Umbravirus se diferencian de la mayoría de los virus en que no codifican para una proteína de cápside convencional, en cambio poseen una proteína codificada que protege al ARN y permite el movimiento a larga distancia por medio de la formación de ribonucleoproteínas. Al reemplazar la secuencia que codifica para la proteína de cápside del virus TMV por el ORF3 de un Umbravirus se observó la formación de partículas filamentosas de ribonucleoproteínas, aunque estas partículas carecían de la uniformidad de los viriones. Interesantemente, estas ribonucleoproteínas fueron halladas principalmente en las células del floema, lo que demuestra que la formación del virión típico no es estrictamente necesaria para el movimiento a larga distancia de los Tobamovirus (Taliensky et al., 2003).

Asimismo, otros ensayos realizados con Tobamovirus muestran que la formación de viriones no es indispensable para el movimiento a larga distancia. Por ejemplo, un Tobamovirus quimérico que codifica para la replicasa y proteína de movimiento del TMV y la proteína de cápside de un Tobamovirus relacionado, el *Odontoglossum ringspot virus*, es capaz de replicar eficientemente, formar viriones y moverse dentro de la hoja inoculada, pero no puede moverse de manera sistémica (Mark E. Hilf and William O. Dawson, 1993). Se han propuesto varias hipótesis para explicar este resultado, entre ellas se ha sugerido que la proteína de cápside del TMV podría actuar suprimiendo vías de defensa y que dicha supresión de las defensas sería necesaria para que el virus pueda moverse hacia los tejidos sistémicos (Callaway et al., 2001).

1.5 El rol de la proteína de cápside en la resistencia mediada por cápside

La obtención de plantas transgénicas que expresaban genes virales fue una de las primeras estrategias empleadas para conferir resistencia frente a las enfermedades producidas por virus. Inicialmente, la proteína de cápside del TMV fue expresada en

tabaco con el objetivo de obtener plantas resistentes (Beachy, 1999) y luego esta estrategia se extendió a otros cultivos para conferir resistencia frente a diversos virus: el Virus del mosaico de la alfalfa (Loesch-Fries et al., 1987), el Virus del mosaico del pepino (Cuozzo et al., 1988), el PVX (Hemenway et al., 1988), entre otros virus. Si bien el término “resistencia mediada por cápside” (CP-MR, por su sigla en inglés) fue empleado para describir el fenómeno por el cual la expresión de la CP otorgaba resistencia antiviral, estudios posteriores demostraron que las bases moleculares de la CP-MR no eran las mismas en todos los casos (Baulcombe, 1996). En particular, trabajos realizados con el virus TMV mostraron que la CP-MR era superada cuando las plantas se infectaban con ARN viral desnudo, lo que indica que la CP del TMV interfiere en un paso inicial del ciclo viral. Ésta, y otras evidencias, llevaron a proponer que la CP del TMV inhibe la desencapsidación del genoma viral cuando el virus ingresa a la célula (Beachy, 1999).

1.6 Los mecanismos de defensa

Las plantas están continuamente expuestas a diversos patógenos, entre ellos virus, bacterias, hongos y nemátodos. A diferencia de los animales, las plantas carecen de células de defensa móviles, en cambio cada célula vegetal es capaz de reconocer a los patógenos y producir señales sistémicas que generan la activación de mecanismos de defensa en los tejidos sistémicos (Jones and Dangl, 2006).

1.6.1 Mecanismos de reconocimiento de patógenos: “el modelo zig-zag”

Las células vegetales son capaces de reconocer, a través de receptores transmembrana, estructuras típicas de los patógenos como la flagelina, la quitina, lipoproteínas y lipopolisácaridos (Göhre and Robatzek, 2008), comúnmente denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Tras el reconocimiento de PAMPs por parte de los receptores de reconocimiento de patrón (PRRs por su sigla en inglés), se produce la activación de diversos eventos de señalización. Estos eventos suelen ser representados en un modelo denominado “Zig-Zag”. El primer evento de este modelo, “el zig”, corresponde a la percepción de PAMPs por medio de los PRRs, lo que inicia una primera respuesta de defensa denominada “inmunidad desencadenada por PAMPs” (PTI por sus

siglas en inglés). A su vez, los patógenos codifican para proteínas de virulencia que bloquean la señalización desencadenada por los PAMPs. Este segundo evento (el “zag”) es denominado susceptibilidad desencadenada por efectores (ETS por su sigla en inglés). En respuesta a la ETS, las plantas han evolucionado para reconocer a estos efectores por medio de proteínas codificadas por genes R, lo que genera una inmunidad desencadenada por efectores (ETI), produciendo el segundo “zig” del modelo. Los efectores reconocidos por estos genes R también suelen ser denominados factores de avirulencia (Avr) (Ver Figura1.5).

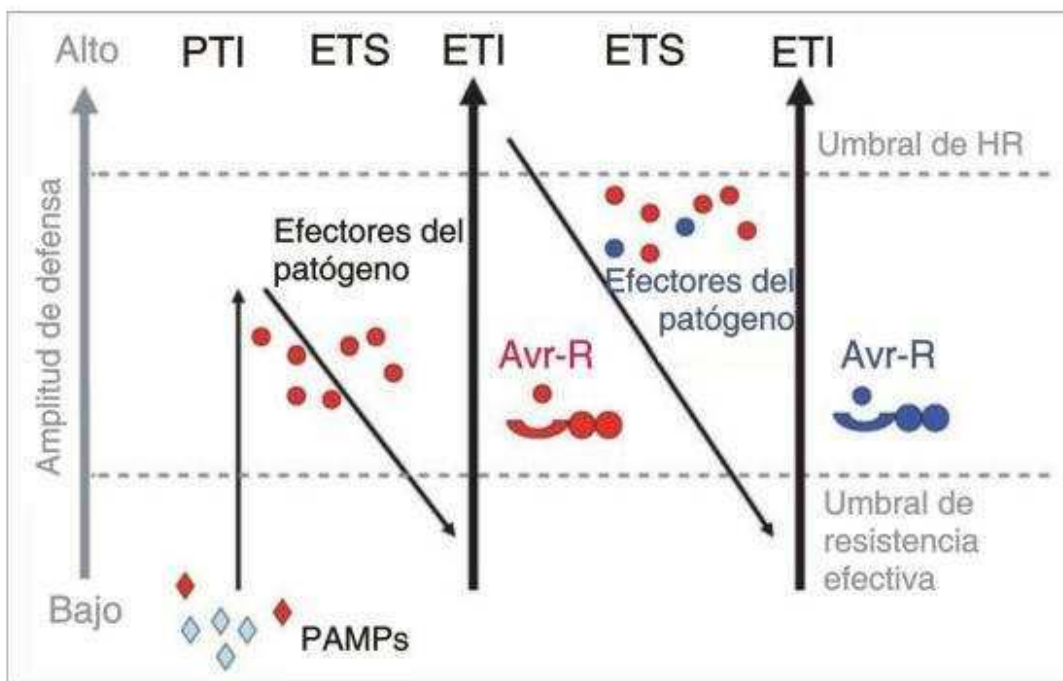


Figura 1.5. Esquema en zig-zag, representativo de la amplitud de defensa, donde la resistencia/susceptibilidad es proporcional a $[PTI - ETS + ETI]$. En la primera etapa, la planta detecta la presencia de PAMPs y activa PTI. A su vez, en la segunda etapa, el patógeno genera efectores que interfieren con PTI, dando lugar a ETS. Seguidamente, los efectores son reconocidos por proteínas de tipo NB-LRR activando ETI, una versión amplificada de PTI que generalmente supera el umbral de respuesta hipersensible (HR). Aquellos patógenos que adquirieron nuevos efectores son capaces de suprimir ETI nuevamente y las plantas que contengan nuevas proteínas NB-LRR capaces de reconocerlos serán seleccionadas, provocando nuevamente ETI. Adaptado de Jones y Dangl (2006).

1.6.2 La inmunidad desencadenada por PAMPs: el reconocimiento de PAMPs por proteínas PRR extracelulares

Inicialmente, el rol de las proteínas PRRs fue caracterizado en estudios realizados en sistemas animales (Lemaitre et al., 1996). Estas proteínas pertenecen a la familia de receptores transmembrana tipo Toll (TLR, por su sigla en inglés). Las proteínas TLR contienen un dominio extracelular LRR (dominio rico en repeticiones de leucinas, *Leucine-rich repeat*) y un dominio intracelular denominado TIR por “*toll-interleukin (IL)-1 receptor*”. Mientras que en plantas los PAMPs son principalmente reconocidos por proteínas de tipo transmembrana llamadas RLKs (*receptor-like kinases*), las cuales contienen un dominio LRR extracelular y un dominio quinasa intracelular. Uno de los receptores más estudiados, el FLS2, es el encargado de reconocer a la flagelina presente en las bacterias (Gómez-Gómez Boller, 2000). Tras el reconocimiento de la flagelina, se produce la activación de una cascada de proteínas kinasas (MEKK1, MKK4/MKK5 y MAPK3/MAPK6), lo que genera la translocación de factores de transcripción al núcleo y la activación de la respuesta de defensa de la planta (Pitzschke et al, 2009).

1.6.3 La inmunidad desencadenada por efectores: el reconocimiento de los efectores por proteínas intracelulares codificadas por genes R

A diferencia de la activación de proteína PRRs, los genes de resistencia codifican para proteínas que se activan frente a patógenos específicos, dando lugar a mecanismos de defensa inducida. Esta respuesta de defensa puede estar determinada por un único gen de resistencia capaz de reconocer al patógeno, o bien por múltiples genes de resistencia (Maule et al., 2007). Luego del reconocimiento del patógeno se produce la activación de las proteínas de resistencia y se genera una respuesta mediada por la hormona salicílico y por especies reactivas de oxígeno tanto en el sitio de infección, como en tejidos sistémicos (Jones and Dangl, 2006). A nivel local, estas respuestas suelen desencadenar la muerte celular de las células que rodean al sitio de ingreso del patógeno, produciendo una “respuesta hipersensible” (HR) (Palukaitis and Carr, 2008). A su vez, la activación de las proteínas de resistencia producen alteraciones en la expresión génica de los tejidos sistémicos, dichas alteraciones están mediadas por factores de transcripción pertenecientes a las familia WRKY y TGA (Jones and Dangl, 2006).

1.6.4 Mecanismos de reconocimiento de patógenos virales

En los últimos años el modelo “zig-zag” ha sido extendido al estudio de la interacción entre plantas y patógenos virales (Zvereva and Pooggin, 2012). En el caso de los patógenos virales, se ha sugerido que el desencadenante de la respuesta primaria de defensa serían las estructuras de ARN de doble cadena que se originan durante el ciclo de replicación viral o bien por la presencia de estructuras secundarias del genoma de los virus de ARN. El reconocimiento del ARN de doble cadena (ARNdc) activa el mecanismo de silenciamiento. A su vez, los virus pueden codificar proteínas que suprimen esta primera barrera de defensa denominado VSRs (supresores de silenciamiento de ARN de origen viral). Además, los virus también pueden ser reconocidos por proteínas de resistencia que activan respuestas similares a las activadas frente a patógenos microbianos (Ver Figura 1.6).

Hasta la fecha no se han caracterizado ninguna proteína típica de patógenos virales que pueda ser considerada un PAMPs. Sin embargo, se ha descrito que los patógenos virales y los no virales inducen respuestas de defensa similares (Zvereva and Pooggin, 2012). Entre los mecanismos comunes activados por virus y patógenos microbianos se encuentra el incremento en la producción de las especies reactivas de oxígenos (ROS, por *reactive oxygen species*). Por ejemplo, el tratamiento de células de tabaco (provenientes de hospedantes susceptibles) con la proteína de cápside del virus TMV produce la generación de ROS (Allan et al., 2001). Por otra parte, también se ha observado la inducción de ROS y de óxido nítrico en hospedantes susceptibles infectados con los virus ToMV y CaMV (Love et al., 2005) (Fu et al., 2010). Por otro lado, se ha observado que las proteínas virales no sólo son capaces de suprimir la respuesta de silenciamiento, sino que también interfieren con la activación de vías de defensa mediada por el ácido salicílico, el cual tiene un rol clave en la activación de ETI (Love et al., 2012) ; (Zhou et al., 2014).

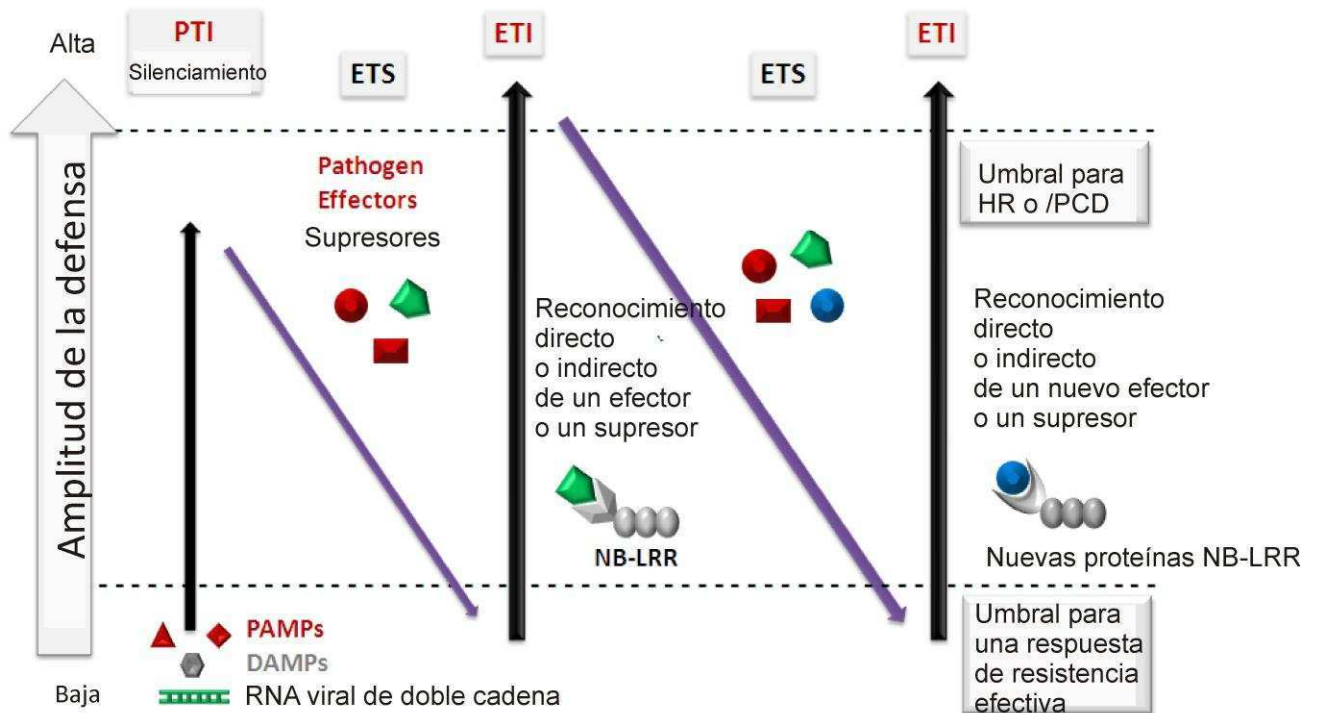


Figura 1.6. Modelo de zig-zag adaptado al estudio de la inmunidad antiviral. En la primera fase, las plantas detectan PAMPs o patrones moleculares indicadores de peligro endógenos modificados (DAMPs) o ARN de doble cadena viral. La respuesta es, respectivamente, PTI o silenciamiento, obteniéndose resistencia. 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 (Zvereva and Pooggin, 2012).

1.6.5 Las estrategias de infección de los patógenos y los mecanismos de defensa inducidos

Los fitopatógenos poseen distintas estrategias de infección, dichas estrategias suelen ser clasificadas según el daño generado a los tejidos vegetales en biotróficas, hemibiotróficas o necrotróficas (Spoel et al., 2007). En general los patógenos biotrófos colonizan el apoplasto y se multiplican dentro de los tejidos del hospedante por varios días antes de dañar a los tejidos. Este período de infección es requerido para tomar nutrientes de las células vegetales. El reconocimiento de los patógenos biotróficos por medio de genes de resistencia es seguido de un incremento local de la producción de las ROS, se produce entonces un “estallido oxidativo” que culmina, en algunos casos, en la muerte celular

programada (HR, respuesta hipersensible) en la zona de invasión. Este tipo de reacción que involucra muerte celular es característico de muchas interacciones donde la infección no llega a desarrollarse (interacciones incompatibles). Una vez activadas las respuestas de defensa locales se desencadenan respuestas sistémicas, denominada respuesta sistémica adquirida (SAR), que se caracteriza por ser duradera y de amplio espectro. Durante la SAR se inducen genes asociados que codifican proteínas relacionadas a la patogénesis (PR), genes involucrados en traducción de señales, transporte e implicados en la maquinaria de secreción. En paralelo, durante la SAR se reprime la expresión de genes involucrados en respuesta a JA y etileno, como así también genes asociados a remodelación de la pared celular (Gruner et al., 2013).

Los patógenos necrótrofos, a diferencia de los biotrófos, generan daño en los tejidos para tomar nutrientes y reproducirse. En general, secretan enzimas y toxinas que degradan y matan a las células del hospedante para tener nutrientes disponibles. Frente al reconocimiento de esta clase de patógenos, las plantas activan rápidamente la producción de la hormona JA, la cual modula la expresión de un set de genes que codifican para PR diferentes de las activadas por el SA. Entre estas proteínas se encuentra la proteína PDF1.2, la cual posee una importante actividad antifúngica. Por otro lado, durante la respuesta de defensa frente a patógenos necrótrofos, también se incrementan los niveles de camalexina (Spoel et al., 2007). A nivel sistémico, estos patógenos activan una respuesta de defensa denominada “resistencia sistémica inducida”, mediada por las hormonas JA y ET (Ton et al., 2002).

Las vías del SA y del JA son generalmente antagónicas, es decir que la activación de una de ellas suprime la activación de la otra (Thaler et al., 2012). El antagonismo entre esos dos compuestos se evidenció a través del empleo de mutantes que presentaban alteraciones en las vías de SA y JA. En ensayos realizados con mutantes que presentaban alteraciones en vía de respuesta a JA, se observó la inducción del gen PR1 (marcador de la vía mediada por SA); mientras que en las mutantes que presentaban alteraciones de la vía del SA, se observó un incremento en la expresión basal de PDF1.2 (marcador de la vía mediada por JA) (Koornneef *et al.*, 2008; Leon-Reyes *et al.*, 2010). El antagonismo entre SA y JA también fue estudiado, por medio de ensayos realizados en plantas tratadas con SA o infectadas con el patógeno hemibiotrófico, *Pseudomonas syringae*, inductor de respuesta mediada por SA. En ambos casos se observó que estas plantas mostraban una

mayor susceptibilidad a infecciones con *Alternaria brassicicola*, un patógeno necrotrófico, como consecuencia de la supresión de la vía de defensa mediada por JA (Spoel *et al.*, 2007) (Fig. 1.6). Por otra parte, se ha propuesto que el factor *Non-expressor of PR1 GENE* (NPR1), un regulador maestro de la señalización mediada por SA (Wu *et al.*, 2012) y los eventos de oxidación modularían la interacción antagónica entre SA y JA (Spoel *et al.*, 2007).

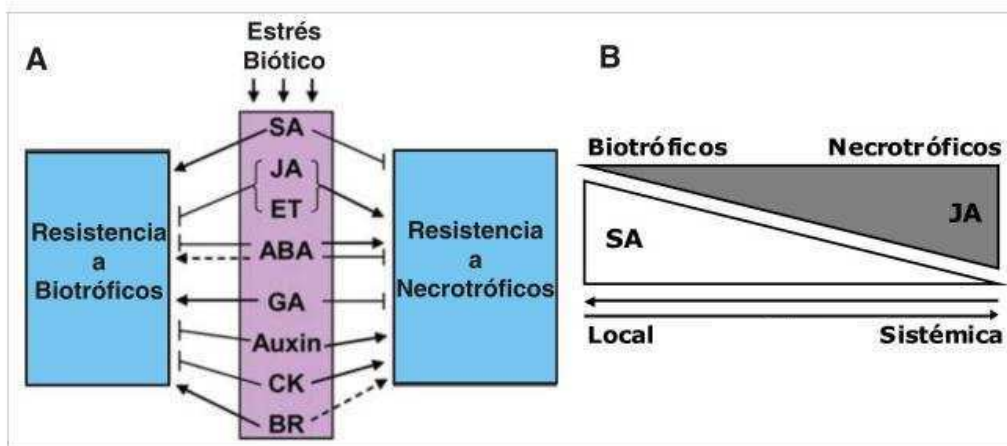


Figura 1.7. A) Esquema que resume un modelo simplificado de la acción de diferentes fitohormonas en la regulación positiva o negativa de la resistencia a patógenos biotróficos y necrotróficos. Las flechas indican la activación o interacción positiva y las líneas truncadas indican represión o interacción negativa (Bari and Jones, 2009). B) Modelo propuesto para la interacción de las vías de defensa contra patógenos biotróficos y necrotróficos. Los primeros inducen señalización fuerte por SA en tejidos locales y adyacentes, disminuyendo en los tejidos sistémicos, mientras que la relación opuesta se manifiesta en los necrotróficos. Adaptado de Spoel *et al.* (2007).

1.7 El rol de las fitohormonas y las especies reactivas de oxígeno (ROS) en los mecanismos de defensa contra patógenos

Las respuestas de defensa activadas durante las interacciones frente a patógenos bacterianos y hongos han sido ampliamente caracterizadas, sin embargo el estudio de los mecanismos de defensa innata durante las interacciones virales está menos caracterizado. A continuación se describe el papel de las principales fitohormonas implicadas en respuesta de defensa y de ROS durante interacciones bióticas, haciendo un

mayor énfasis en los estudios que caracterizan el rol de estos compuestos en las interacciones virales, en particular en aquellas interacciones de tipo compatible.

1.7.1 El rol del SA en la defensa antiviral

El SA es una hormona esencial en la inmunidad vegetal que se acumula tanto en las hojas infectadas como en hojas distales frente al ataque por patógenos (Dempsey, 1999; Métraux et al., 1990). El SA es sintetizado a partir del metabolito primario corismato mediante dos vías enzimáticas diferentes. En una de estas vías, la L-fenilalanina, derivada del corismato, es convertida al SA por medio de una serie de reacciones enzimáticas que involucran a la enzima fenilalanina amonio liasa. Por otra parte, el corismato también puede ser convertido a SA por medio de las enzimas isocorismato sintasa (ICS por su sigla en inglés) y isocorismato piruvato liasa (Wildermuth et al., 2001). Esta última vía genera la mayor parte del SA durante las infecciones ocasionadas por patógenos en *Arabidopsis* (Vlot et al, 2009).

Durante las infecciones virales incompatibles, al igual que las interacciones incompatibles con otros patógenos biotróficos, suelen producirse un fuerte incremento de los niveles de SA. Por ejemplo, se ha observado que los niveles de SA se incrementan fuertemente en plantas de pepino infectadas con el virus necrótico del tabaco (Métraux et al., 1990). El incremento de los niveles de SA genera, a su vez, el incremento de la expresión de genes que codifican para proteínas PR. Una de estas proteínas, la proteína PR-1, fue inicialmente caracterizadas en plantas de tabaco infectadas con el virus TMV (Van Loon et al., 1987) y suele ser usada como marcador de la señalización mediada por la hormona SA (Van Loon, 1997), sin embargo esta proteína PR no pareciera tener un rol en la defensa antiviral (Carr et al., 2010).

El rol del SA también ha sido caracterizado en interacciones virales de tipo compatible. El pretratamiento de plantas de tabaco susceptibles con la hormona SA reduce los niveles de acumulación de ARN genómico del virus TMV (Chivasa et al., 1997). Además, tanto en plantas de *Nicotiana glutinosa*, como en *Arabidopsis* el tratamiento con SA atrasa el movimiento sistémico del virus CMV (Ji and Ding, 2001). Por otro lado, ensayos realizados con el virus PPV (incapaz de infectar de manera sistémica al tabaco), mostraron que este virus puede moverse a los tejidos sistémicos en plantas transgénicas de tabaco que expresan una enzima bacteriana involucrada en la degradación de SA y en las cuales no

se produce la acumulación de SA (Alamillo et al., 2006). Por otra parte, ensayos realizados con el virus CaMV mostraron que este virus es incapaz de desplazarse hacia los tejidos sistémicos en plantas de Arabidopsis mutantes cpr1-1 y cpr5-2, las cuales tienen activadas de manera constitutiva las defensas mediadas por SA. Finalmente, ensayos realizados con plantas transgénicas que expresan proteínas virales individuales han mostrado que algunas proteínas virales son capaces de modular negativamente la vía mediada por SA; (Wang et al, 2009) (Love et al., 2012); lo que permitiría contrarrestar la defensa mediada por esta hormona (Huang et al., 2005).

Estos experimentos demuestran que el SA juega un rol durante las interacciones de tipo compatible, sin embargo el mecanismo de acción del SA y los componentes implicados en la vía de defensa antiviral todavía no han sido completamente caracterizados. Varios estudios sugieren que el SA actuaría en la defensa frente a virus por medio de componentes antivirales específicos, entre ellos la proteína RDR1. RDR1 es un componente de la maquinaria de silenciamiento, el cual es inducido por SA y es requerido para la resistencia basal contra virus de genoma de ARN, incluyendo al TMV (Xie et al., 2001). Además, se ha observado que plantas mutantes para rdr1 infectadas con el virus TMV-Cg muestran una mayor acumulación viral tanto en la hoja inoculada, como en hojas sistémicas (Yu et al., 2003a). La oxidasa alternativa (AOX) es otro factor involucrado en la respuesta de defensa mediada por SA. Estudios realizados en plantas de tabaco tratadas con un inhibidor de la oxidasa alternativa, mostraron que este compuesto antagoniza la resistencia mediada por SA tanto en cultivares susceptibles, como en cultivares resistentes (Chivasa et al, 1997). Además, se ha propuesto que cambios del estado redox, producidos durante la respuesta de defensa mediada por SA, también tendrían un rol en la resistencia antiviral (Gilliland et al., 2003);(Murphy et al., 2004).

1.7.2 El rol del JA en defensa antiviral

El ácido jasmonico y otras oxilipinas son moléculas señalizadoras cuyos niveles se incrementan frente a las infecciones por bacterias, hongos, insectos, nematodos y virus (Devoto and Turner, 2003); (Staswick and Tiryaki, 2004) (Dohondt et al, 2000) (Kovac et

al, 2009). Las oxilipinas pueden ser producidas a partir de la peroxidación no enzimática de lípidos de membrana (Dat et al., 2005), o bien por la peroxidación lipídica catalizada por enzimas de la familia de las lipoxigenasas. En particular, la síntesis del ácido jasmónico es iniciada en los cloroplastos a partir del ácido linolénico. El ácido linolénico es convertido al ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA) por medio de la acción de enzimas lipoxigenasas y reductasas. Finalmente, OPDA es dirigido hacia los peroxisomas donde, a través de varios pasos, es convertido en ácido jasmónico (Turner et al., 2002). Una vez finalizada la síntesis en los peroxisomas, el JA es exportado al citosol donde puede ser modificado y conjugado con otras moléculas, siendo su éster conjugado con isoleucina (JA-Ile) el de mayor actividad biológica (Staswick and Tiryaki, 2004).

Si bien el JA juega un importante rol frente en la defensa frente a diversos patógenos, su rol en las interacciones virales está poco caracterizado (Oka et al, 2013). En algunos de los estudios realizados hasta la fecha, se ha reportado que el JA no jugaría un rol en la resistencia antiviral. Por ejemplo, el estudio del rol de JA en el mecanismo de resistencia antiviral frente a los virus TCV y CMV, mediado por los genes HRT y RCY1 respectivamente, mostró que la resistencia mediada por estos genes es independiente del JA (Kachroo et al, 2000; Takahashi et al, 2002).

Por otra parte, el estudio de rol del JA en plantas de tabaco que portan el gen N que confiere resistencia frente al virus TMV mostró que el ácido jasmónico regula negativamente la respuesta frente al virus TMV (Oka et al., 2013). En particular, la aplicación de metil-jasmonato redujo la resistencia local contra el virus TMV, permitiendo el movimiento sistémico del virus. Además, en este trabajo se observó que plantas de tabaco que portan el gen N y en las cuales se silenció la expresión del gen que codifica para el receptor del jasmónico, COI1, presentaban lesiones locales más pequeñas y una menor acumulación viral al ser infectadas con el virus TMV. La reducción de la acumulación viral en plantas de tabaco que portan el gen N se correlaciona con un incremento de SA. Estos resultados sugieren que el rol del JA sobre la acumulación viral sería indirecta, a través de la inhibición parcial de la resistencia mediada por SA y que el balance SA/JA determinaría el grado de resistencia antiviral durante la interacción incompatible con el virus TMV (Oka et al, 2013).

1.7.3 El rol del etileno en la defensa antiviral

El etileno es una hormona involucrada en respuesta a estreses ambientales y en procesos de desarrollo, como por ejemplo la inhibición de la expansión celular y el atraso de la floración (Achard et al., 2007). La síntesis de etileno puede dividirse en tres etapas, en una primera instancia el aminoácido metionina es convertido al intermediario S-adenosyl-L-metionina (AdoMet) por una enzima Ado Met sintetasa. Este intermediario es luego convertido a ácido carboxili-1-aminociclopropano -1 (ACC) por medio de la enzima ACC sintasa (ACS). Este paso representa el paso limitante en la síntesis de etileno. Finalmente, el etileno es sintetizado a partir de ACC por medio de la enzima ACC oxidasa (ACO) (Bleecker and Kende, 2000).

La enzima ACS es codificada por una familia multigénica y varios estudios muestran que la transcripción de dichos genes es regulada en respuesta a estímulos ambientales (Chang and Bleecker, 2004). Recientemente, se ha observado que la expresión del gen *ACS6*, uno de los genes que codifica para ACS en *Arabidopsis*, es incrementado a medida que progresa la infección compatible del virus TMV-Cg (Chen et al., 2013). Además, plantas mutantes para este gen, mostraron una menor acumulación viral que las plantas salvajes (Chen et al., 2013).. Por el contrario, plantas tratadas con la hormona etileno mostraron una mayor acumulación viral que las plantas no tratadas con esta hormona. Estos resultados demuestran que el etileno incrementa la susceptibilidad frente al virus TMV-Cg. Estudios previos, realizados en plantas de *Arabidopsis thaliana* infectadas con el virus CaMV, también habían involucrado al etileno en la modulación de la defensa antiviral (Love et al., 2005). En el trabajo realizado por Love y colaboradores, se observó una menor susceptibilidad frente al virus CaMV en plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes para *etr1* (defectuosas en uno de los cinco receptores de ET que posee *Arabidopsis thaliana*) y en las mutantes *ein-2* (una mutante insensible a etileno). Además, en este trabajo se observó un retardo en la aparición de síntomas en las plantas mutantes *etr1* y *ein-2* respecto de las plantas salvajes (Love et al., 2005).

El ET también ha sido asociado con el mecanismo de escape de silenciamiento observado en plantas de *N. benthamiana* transformadas con un amplicón que codifica para el genoma del virus PLRV (Taliensky et al., 2004). Las plantas transgénicas transformadas con el amplicón que codifica para el genoma del virus PLRV tienen fuertemente activado el mecanismo de silenciamiento y , por ende, no acumulan niveles detectables de este

virus. Interesantemente, el tratamiento de estas plantas transgénicas con un análogo del ET activa el escape de silenciamiento, produciendo que el virus PLRV se acumule en altos niveles en estas plantas (Taliensky et al., 2004).

1.7.4 El rol de las ROS en la respuesta frente a patógenos virales

1.7.4.1 Las vías de producción de ROS y su rol en la señalización activada durante las infecciones virales

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) están involucradas en la regulación de numerosos procesos biológicos, entre los que se encuentran: el desarrollo, la respuesta de defensa de tipo hipersensible y las respuestas frente a estímulos abióticos y bióticos en plantas (Baxter et al., 2014). La generación de ROS es uno de los primeros eventos que tienen lugar luego de la infección con patógenos. Tras el reconocimiento de patógenos avirulentos por medio de proteínas de resistencia se desencadena una acumulación bifásica de las ROS, con una primera etapa en donde se detectan bajos niveles de acumulación de las ROS, seguida de una siguiente etapa de mayor magnitud que correlaciona con una respuesta de resistencia (Lamb and Dixon, 1997). Los patógenos que logran escapar al reconociendo del hospedante inducen únicamente la primer fase de esta respuesta, sugiriendo que las ROS jugarían un rol en el establecimiento de la defensa (Torres et al., 2006).

El apoplasto es uno de los compartimentos en donde se producen las especies reactivas de oxígeno (Ver Figura 1.7). La producción de las ROS en el apoplasto, mediada por enzimas NADPH oxidasas, ha sido considerada clave para el establecimiento de la respuesta hipersensible (Zurbriggen and Hajirezaei, 2010). Las plantas suelen contener varias enzimas NADPH oxidasas las cuales están codificadas por genes pertenecientes a la familia *Rboh*. La expresión de estos genes es incrementada luego de la infección con patógenos (Yoshioka et al., 2001) (Torres and Dangl, 2005). Por otra parte, ensayos realizados con plantas de *Arabidopsis* mutantes para los genes *AtrbohD* y *ArRbohF*, demostraron que la enzima *AtrbohD* es responsable de gran parte de la producción de las ROS en respuesta a la infección con hongos y con bacterias avirulentas. Mientras que

la enzima AtrbohF es importante en la regulación de la respuesta hipersensible (Torres and Dangl, 2005).

Otros compartimentos, como la mitocondria y el cloroplasto, también están involucrados en la formación de las ROS durante los estreses bióticos (Noshi et al, 2012; Zurbriggen and Hajirezaei, 2010) (Figura 1.8). Por ejemplo, el tratamiento de hojas de *Arabidopsis* con elicitores bacterianos genera un rápido incremento de la generación de las ROS, seguido de la formación de poros en la membrana mitocondrial y la disipación del potencial de membrana y de los niveles de ATP (Zurbriggen and Hajirezaei, 2010). Además, se ha observado que el SA es capaz de desacoplar la cadena de fosforilación oxidativa e inhibir la cadena respiratoria mitocondrial, lo que incrementa los niveles de las ROS (Zurbriggen and Hajirezaei, 2010).

Por otra parte, otros estudios realizados en plantas de tabaco transgénicas que expresan una flavodoxina permitieron caracterizar el rol del cloroplasto en la formación de las ROS durante la respuesta hipersensible (Zurbriggen and Hajirezaei, 2010). Estas plantas mostraron una menor acumulación de las ROS luego de ser infiltradas con una bacteria patógena y menores síntomas asociados a la muerte celular localizada, sin embargo la síntesis de proteínas PR y la inducción de fitohormonas no se vieron afectadas por la expresión de la flavodoxina. Estos resultados permitieron concluir que las ROS producidas en cloroplastos juegan un rol en el desarrollo de la muerte celular localizada durante la respuesta hipersensible, pero no alteran las respuestas de defensas mediadas por fitohormonas.

El incremento de la producción de las ROS también ha sido reportado durante las infecciones virales. Por ejemplo, se ha observado que la actividad de una enzima NADPH oxidasa es incrementada en discos de hojas de *N. tabacum* tomados de plantas resistentes infectadas con el virus TMV (Sagi and Fluhr, 2001). Además de estar involucradas en la señalización durante la HR, se ha observado que estas moléculas juegan un rol en las vías de señalización que son activadas durante las interacciones virales compatibles. Por ejemplo, el tratamiento con la CP del TMV de células de tabaco aisladas de un hospedante susceptible produjo la acumulación de ROS, mientras que la aplicación de inhibidores de las NADPH oxidasas inhibió dicha acumulación (Allan et al., 2001). Por otro lado, plantas de *Arabidopsis thaliana* infectadas con el virus CaMV mostraron una acumulación de ROS tanto en la hoja inoculada, como en tejidos

sistémicos entre las tres horas y un día post-infección. La infección de plantas mutantes *rbohD* y *rbohF* (mutantes para los genes que codifican enzimas NADPH oxidasas en *Arabidopsis*) mostró que estas enzimas están involucradas en la acumulación de ROS durante la infección con CaMV (Love et al., 2005). Estos resultados muestran que durante las interacciones de tipo compatible, ciertos virus desencadenan una señalización temprana mediada por ROS y que dicha señalización se propaga a tejidos sistémicos previa a la llegada del virus a estos tejidos.

1.7.4.2. Las vías implicadas en la modulación de los niveles de ROS y su rol frente a las infecciones virales

Si bien las ROS son importantes reguladores de diversos procesos biológicos, niveles elevados de ROS resultan tóxicos para las células (Mittler, 2002). Es por ello, que las plantas disponen de diversos mecanismos que les permiten regular las concentraciones intercelulares de ROS. Los principales mecanismos de regulación de los niveles de ROS incluyen a las enzimas: superóxido dismutasas (CSD), ascorbato peroxidasas (APX) y catalasas. Por otra parte, las plantas poseen mecanismos para evitar la producción de ROS, entre los que se encuentran la vía de oxidación alternativa en la mitocondria (Mittler, 2002).

Durante infecciones virales compatibles, es frecuente el incremento de la expresión de genes que codifican para enzimas implicadas en las vías de detoxificación de ROS (Maule et al., 2002). En particular, se ha observado un incremento en los niveles de los transcritos que codifican para las enzimas catalasa, superóxido dismutasa y para peroxidasas. Por ejemplo, en infecciones producidas por los virus CMV y *Zucchini yellow mosaic virus* en los hospedantes *Cucumis sativus* y *Cucurbita pepo*, se ha observado la inducción de estas enzimas detoxificantes (Riedle-Bauer, 2000). Por otra parte, los niveles de expresión de genes que codifican para las enzimas catalasa y peroxidada también son incrementados en las infecciones producidas por el virus TMV-Cg en *Arabidopsis thaliana* (Espinoza et al., 2007). Mientras que en las infecciones producidas por el virus TMV en tabaco se ha observado el incremento de la expresión de los genes que codifican para una enzima superóxido dismutasa, la ascorbato peroxidasa (APX1) y la enzima GDP manosa pirofosforilasa, implicada en la síntesis del ácido ascórbico (Conti

et al., 2012). En base a estas evidencias, se ha propuesto que el incremento de la expresión de genes involucrados en mecanismos de detoxificación de ROS durante las infecciones virales puede deberse a una respuesta generalizada de estrés (Espinoza et al., 2007)(Maule et al., 2002).

1.7.5 La interacción de especies reactivas de oxígenos y otras señales involucradas en defensa

Diversos autores han propuesto que, durante situaciones de estrés, las ROS actuarían coordinadamente junto con las hormonas vegetales para el desarrollo de las respuestas de defensa (Baxter et al., 2014)(Torres et al., 2006). En particular distintos trabajos han vinculado a las ROS con la vía de señalización mediada por ET. Por ejemplo, se ha observado que el receptor de etileno, ETR1, puede funcionar como un sensor de ROS, mediando el cierre de estomas en respuesta a peróxido de hidrógeno (Desikan et al., 2005). A su vez, se ha reportado que la biosíntesis de ET es modulada por medio de las enzimas NADPH oxidasas, las cuales como ya se mencionó previamente están involucradas en la formación de ROS durante la interacción con patógenos (Jakubowicz et al., 2010) Por otra parte, tanto las ROS como el ET han sido reportados en la señalización que es activada durante algunas infecciones virales (Love et al., 2005).

Por otra parte, las ROS también actuarían sinérgicamente con la hormona SA durante la respuesta frente a patógenos, lo que amplificaría la señalización mediada por SA generando la producción de la HR y promovería el establecimiento de la respuesta de defensa sistémica (Figura 1.8) (Draper J, 1997). Este modelo esta basado en experimentos realizados usando dosis sub-máximas de peróxido de hidrógeno en simultáneo con el tratamiento con patógenos, lo que genera la acumulación de SA; por otro lado se ha observado que el incremento de SA genera un incremento en los niveles de la producción de las ROS (Leon et al., 1995); (Shirasu et al., 1997).

En conjunto, distintas evidencias muestran que las ROS junto con las hormonas vegetales participan de una red de señalización compleja que es activada durante cambios ambientales y de desarrollo. (Baxter et al., 2014)

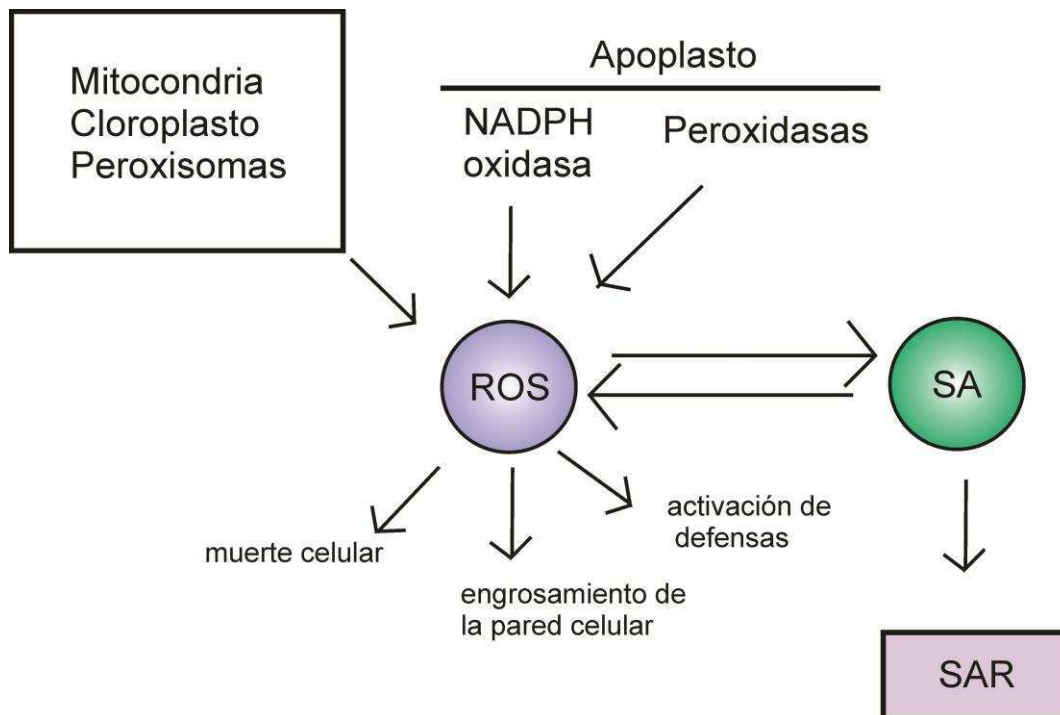


Figura 1.8: La producción de las ROS y su rol frente al ataque de patógenos. La producción de las ROS es llevada a cabo en distintos compartimentos (cloroplasto, mitocondria, peroxisomas y apoplasto.) Las enzimas NADPH oxidasas y peroxidasas son las responsables de la producción de las ROS en el apoplasto. Las ROS están involucradas en la señalización que produce la activación de defensas, en el engrosamiento de la pared celular, en la muerte celular y en la SAR. A su vez, las ROS actúan sinérgicamente con la hormona SA para cumplir algunos de estos roles. Adaptado de Torres et al, 2006.

1.7.6 La resistencia sistémica adquirida (SAR)

La SAR se activa luego de la infección de una única o pocas hojas generando inmunidad al resto del follaje (Gruner et al., 2013). La SAR puede ser desencadenada por diversas clases de patógenos, dando lugar a la activación de respuestas sistémicas que se caracterizan por: el incremento de los niveles de SA, la acumulación de ácido pipécólico (PIP) y el aumento de la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en resistencia, como por ejemplo las proteínas PR1, PR2 y PR5 (Gruner et al, 2013).

Para la activación de la SAR es requerido que una señal o varias señales generadas en la hoja inoculada sean transmitidas hacia las hojas sistémicas. Se han caracterizado varios compuestos/ factores que participan en la señalización del SAR, estos incluyen a una proteína de transferencia de lípidos (DIR1), el metil éster del SA, el glicerol 3 fosfato, el ácido azeleico y el PIP (Park et al., 2007); (Jung et al., 2009) (Chanda et al., 2011); (Návarová et al., 2012). La importancia de cada uno de estas señales de señalización de la

SAR depende de factores ambientales como por ejemplo las condiciones de luz (Attaran et al., 2009).(Návarová et al., 2012).

Luego de la llegada de la señal a los tejidos sistémicos se produce la amplificación de la misma. El SA y el PIP están involucrados en mecanismos de amplificación de la señal de SAR. PIP actúa incrementando su propia biosíntesis, e incrementando la expresión de una monooxigenasa dependiente de flavina (FMO1), que cumple un rol indispensable durante la SAR (Mishina and Zeier, 2006) (Návarová et al., 2012). SA es otro de los metabolitos críticos para desencadenar la SAR. SA induce la expresión de genes por medio de la interacción con la proteína reguladora NON-EXPRESSER OF PR GENES 1 (NPR1) (Wu et al, 2012). La proteína NPR1 juega un rol clave en la inducción de la SAR, como lo demuestra el trabajo con mutantes de *npr1*, las cuales tienen afectadas la inducción de la esta vía (Donofrio and Delaney, 2001). Finalmente, el establecimiento de SAR produce la acumulación de proteínas PR en los tejidos sistémicos, llevando a la generación de resistencia frente a futuras infecciones (Sticher et al., 1997) .

1.8 El rol del silenciamiento génico en la defensa frente a patógenos virales

El mecanismo de silenciamiento de ARN fue descrito en un rango diverso de organismos eucarióticos, incluyendo a algas, plantas superiores, hongos y animales (Fire, 1999). Este mecanismo genera una disminución de la expresión génica por medio de diversas vías que se encuentran interconectadas. Todas estas vías son mediadas por ARNs pequeños cuya secuencia es complementaria al ARN mensajero blanco del silenciamiento. En las plantas, el mecanismo de silenciamiento media la disminución de la expresión génica a través de la degradación de los transcritos blanco, la inhibición de la traducción o bien afectando la síntesis de los ARNm por medio de la metilación del ADN (Brodersen et al., 2008)(Dorokhov, 2007)(Chapman and Carrington, 2007).

En particular, el silenciamiento de ARN tiene un importante rol en la defensa antiviral, actuando en la defensa frente a virus con genomas de ARN y ADN. Durante las infecciones virales, el PTGS puede ser desencadenado por la formación de estructuras de ARN de doble cadena (ARNdc) generadas durante la replicación viral o por estructuras propias de su ARN genómico. Cualquiera sea su origen, una vez formadas las estructuras de ARNdc, estas estructuras son reconocidas por ARNasas de tipo III denominadas *DICER*

(DCLs) y procesadas dando lugar a ARNs pequeños (siARNs, *small interfering RNAs*) de 21 a 25 nt de ambas polaridades. En el genoma de *Arabidopsis* hay cuatro genes que codifican para enzimas *DICER*, las cuales generan productos de 20-25, 22, 24 y 21 nt respectivamente. Las enzimas DCL2, DCL3 y DCL4, pero predominantemente DCL2 y DCL4, están implicadas en la producción de siRNAs antivirales. Posteriormente, los siARNs se asocian a un complejo enzimático endógeno denominado RISC (*RNA induced silencing complex*). Este complejo es el encargado de reconocer a los ARNs blancos y actuar en la degradación específica de estos ARNs (Tang, 2005) (Joshua-Tor, 2006). La proteína Argonauta, la cual forma parte del complejo RISC, está implicada en la degradación de cadenas virales cuya secuencia es complementaria a la de los siARNs. En *Arabidopsis* han sido identificadas 10 proteínas pertenecientes a la familia de ARGONAUTA, siendo AGO1 y AGO7 las encargadas de degradar los ARNs de origen viral, mientras que AGO4 posee un rol en la inhibición de la traducción de ARNs virales (Qu et al., 2008)(Zhang et al., 2006).

1.8.1 Amplificación de la señal de silenciamiento génico

Las plantas codifican para ARN polimerasas celulares dependientes de ARN (denominadas RDR, por *RNA dependent RNA polymerase*) las cuales están involucradas en la amplificación de la señal de silenciamiento. Estas enzimas sintetizan ARNdc utilizando como templado ARN simple cadena. Luego el ARNdc es clivado por diferentes DCLs para producir siARNs que amplifican la señal y son capaces de moverse de manera sistémica. En *Arabidopsis thaliana* se han identificado seis proteínas RDRs (RDR1, RDR2, RDR3a, RDR3b, RDR3c, RDR6), aunque las RDR3a-RDR3c sólo han sido encontradas en el genoma de arroz y *Arabidopsis* y aún no se ha podido caracterizar la función de las mismas (Voinnet, 2008). Por otra parte, las proteínas RDR1 y RDR6 han sido implicadas en la resistencia antiviral (Voinnet, 2008). Por ejemplo, plantas de de tabaco que expresan una construcción antisentido para el gen *RDR1* y, por consiguiente acumulan menores niveles de este transcrito, son más susceptibles a la infección con el virus TMV (Xie et al., 2001). El rol de la polimerasa RDR1 también fue analizado en plantas mutantes de *Arabidopsis* infectadas con el virus TMV-Cg, encontrándose una mayor acumulación de este virus en las plantas mutantes que en las plantas salvajes (Yu et al.,

2003b). Por otro lado, la reducción de la expresión del transcripto codificado por el gen *RDR6* en *Nicotiana benthamiana* induce la hiper-susceptibilidad frente a diversos virus de plantas (Qu et al., 2008)(Voinnet, 2008).

1.9 El rol del ácido giberelico (GA) en respuesta de estrés y modulación de vías hormonales

Además de las hormonas previamente mencionadas, otras fitohormonas como el ácido abscísico, las auxinas, los brasinosteroides, las giberelinas y las citoquininas pueden modular las vías de defensa frente a patógenos, aunque sus roles en estas vías están menos estudiados (Pieterse et al., 2012). En los últimos años la hormona giberelina y sus proteínas reguladoras, las proteínas DELLAs, han sido involucradas en las respuestas frente a diversos estreses, tanto bióticos como abióticos. Se ha demostrado que las proteínas DELLAs tienen un rol central en la regulación del crecimiento durante las situaciones de estrés y, además, modulan vías de señalización de defensa mediada por las hormona SA y JA. En la presente sección se detalla el rol de las giberelinas, y los componentes implicados en su vía de señalización, sobre la regulación del desarrollo y la modulación de las vías de defensa mediadas por el ácido salicílico y el ácido jasmónico.

1.9.1 La vía de señalización mediada por GA

La hormona GA es percibida por el receptor *GID1* (GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1). En el genoma de *Arabidopsis* hay presentes tres genes que codifican para receptores de *GID1a-c* (Willige et al., 2007)(Nakajima et al., 2006)(Griffiths et al., 2006) (Ueguchi-Tanaka et al., 2005). Se ha observado que las mutaciones que producen pérdida de función de los genes *GID1* tienen un efecto menor en el desarrollo (Griffiths et al., 2006; Willige et al., 2007). Sin embargo, la triple mutante presenta alteraciones fenotípicas drásticas como enanismo, color verde oscuro, alteraciones en la germinación y atraso de la floración. Estas plantas son completamente insensibles a GA lo que confirma la importancia de *GID1* en la percepción de GA (Griffiths et al., 2006; Willige et al., 2007).

Análisis estructurales han mostrado que el cambio en la conformación de este receptor luego de la unión con GA bio-activas es un evento clave en la señalización de GA (Murase

et al., 2008);(Shimada et al., 2008). Luego de la unión, la molécula de GA queda encerrada en el extremo amino del receptor GID1 (Murase et al., 2008). Esta región, a su vez, interactúa con las proteínas represoras DELLAs (Griffiths et al., 2006). Como consecuencia de esta interacción, se produce la estabilización del complejo GID1-GA-DELLA y se promueve la unión de este complejo con una proteína F box del complejo E3 SCF ligasa. Tras la interacción con la proteína F-BOX, se produce la ubiquitinación de las proteínas DELLAs y la degradación de estas proteínas por la maquinaria de proteasoma (Sasaki et al., 2003) (Fu et al., 2004) (McGinnis et al., 2003)(Dill et al., 2004) (Ver Figura 1.9).

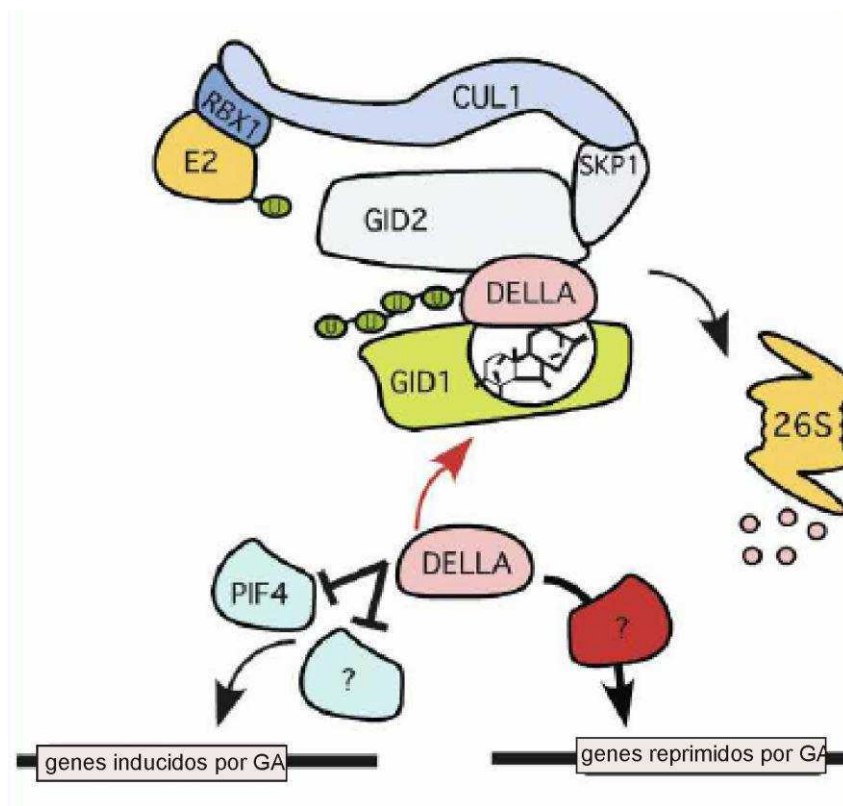


Figura 1.9: Luego de la unión de GA al receptor GID1, este receptor interactúa con las proteínas DELLAs. El complejo GID1-GA-DELLA es reconocido por el complejo SCF GID2, que actúa en la ubiquitinación de las proteínas DELLAs, lo que lleva a que las DELLAs sean degradadas por el proteasoma. Cuando los niveles de GA son bajos, las proteínas DELLAs reprimen la respuesta mediada por GA por medio de la regulación negativa de distintos factores de transcripción entre ellos PIF. Las proteínas DELLAs promueven la expresión de genes reprimidos por GA. Tomado de Spartz y Gray, 2008.

1.9.2 El rol de las proteínas DELLAs en la vía de GA

En *Arabidopsis*, las proteínas DELLAs fueron identificadas por medio de una búsqueda de mutantes insensibles a GA (Koornneef et al., 1985; Silverstone et al., 1997). Una de estas mutantes, denominada *gai-1*, codifica para una proteína funcional que presenta una deleción de 17 aminoácidos que remueve el motivo DELLA en la región N terminal (Peng et al., 1997) (Peng and Harberd, 1993). Otros alelos insensibles a GA fueron identificados en trigo (*Rht*), arroz (*SLR*) y maíz (*D8*), los cuales también codifican proteínas defectivas en el dominio DELLA (Fujioka et al., 1988) (Ikeda et al., 2001). En contraste con otras especies que codifican para una única copia de DELLA, en *Arabidopsis* hay cinco genes que codifican para cinco proteínas DELLA redundantes: *GA INSENSITIVE1 (GAI)*, *REPRESSOR OF ga1-3 (RGA)* and *RGA-LIKE1, -2 and -3 (RGL1, -2, -3)* (Bolle, 2004). Trabajos realizados con la mutante *gai-1* y, con otras mutantes de DELLA insensibles a GA, indican que el motivo DELLA es crítico para la interacción con *GID1* y para la degradación de las proteínas DELLAs en presencia de GA (Peng and Harberd, 1993; Peng et al., 1997; Dill et al., 2001; Willige et al., 2007). Altos niveles de GA inducen la rápida degradación de las proteínas DELLA por medio de la vía de proteasoma, mientras que plantas mutantes deficientes en la síntesis de GA presentan niveles incrementados de las proteínas DELLA (Dill et al., 2001; Griffiths et al., 2006; Willige et al., 2007).

1.9.3 El rol de las giberelinas en la regulación del desarrollo durante condiciones de estrés

La hormona GA tiene un impacto muy fuerte en el desarrollo. Esta hormona fue primeramente identificada en cultivos de arroz infectados con el hongo *Gibberella fujikuroi*, y ha sido involucrada en diversos procesos como la germinación de semillas, la elongación de internudos, la formación de frutos, el desarrollo de flor y el control del tiempo de floración (Behringer et al., 1990) (Randoux et al., 2012) (Davies, 2004). Frente a cambios ambientales, tanto los niveles de GA y los niveles de las proteínas DELLAs se encuentran altamente reguladas, llevando a una acumulación específica en sitios definidos de acción para regular el crecimiento (Ubeda-Tomás et al., 2009); (Löpfke et al., 2013); (Shani et al., 2013). Varios mecanismos que controlan los niveles de GA en los tejidos en crecimiento han sido identificados (Ver Figura 1.10). El primero de estos involucra a la biosíntesis de GA. La inducción de la expresión de los genes involucrados

en la biosíntesis de GA está asociado a los tejidos en crecimiento, sugiriendo que la biosíntesis de GA es el primero de los pasos regulatorios de los niveles de GA y por consiguiente del crecimiento (Hisamatsu et al., 2005). Por ejemplo, durante el síndrome de escape al sombreado, la inducción de las GA 20- oxidasas llevan al incremento de los niveles de GA (Hisamatsu et al., 2005). Un segundo mecanismo actúa a través de la desactivación de las GA bioactivas. La desactivación de GA por parte de las enzimas GA 2-oxidadas (GA2OX) es principalmente importante para la regulación del crecimiento del tallo y de las semillas (Rieu et al., 2008). Asimismo, la acción de las enzimas GA2 oxidadas es importante para limitar el crecimiento durante las condiciones de estrés. Estrés osmóticos, frío, estrés bióticos, inducen a las enzimas GA2OX en Arabidopsis a través de la actividad de factores de transcripción de tipo APETALA2 (AP2), disminuyendo los niveles de GA bioactivas y restringiendo el crecimiento en condiciones desfavorables (Achard et al., 2008) (Dubois et al., 2013).

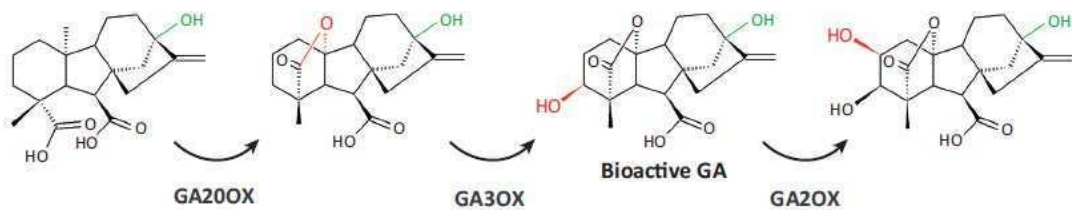


Figura 1.10: Los pasos regulatorios involucrados en la síntesis e inactivación de las GA bioactivas. Las enzimas GA20 OX y GA3OX están involucradas en la síntesis de las GA bioactivas, mientras que la enzima GA2OX está involucrada en la inactivación de la GA bioactivas. Tomado de Claeys et al, 2014.

1.9.4 El rol de las proteínas DELLAs en la modulación de las vías de SA y JA

El rol de las proteínas DELLA sobre la modulación de vías de defensa fue estudiado por primera vez por el grupo del Dr. Jonathan Jones. Ensayos realizados por este grupo de trabajo empleando una planta transgénica que porta una de las proteínas DELLA, la proteína RGA, fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP), mostraron que esta proteína era menos sensible a la degradación mediada por GA en presencia del péptido flagelina (Navarro et al., 2008). Además, se observó que plantas de Arabidopsis cuádruple

mutantes de DELLA mostraban una mayor resistencia frente al patógeno biotrofo *Pseudomonas syringae* y una mayor susceptibilidad frente al patógeno necrotrófico *Alternaria brassicola*. Por otro lado, estos autores observaron que el gen marcador de SA, el gen *PR1*, se inducía más tempranamente en las plantas cuádruples mutantes de DELLAs infectadas con *Pseudomonas* que en plantas salvajes infectadas con este mismo patógeno. Por el contrario, al infectar plantas cuádruples mutantes con *Alternaria brassicola* se producía un atraso en la inducción del gen marcador de JA, el gen *PDF1.2*, respecto del tiempo de inducción observado en plantas salvajes infectadas con este patógeno. Estos experimentos llevaron a concluir que las DELLAs potencian la vía de JA y atenúan la vía de SA (Ver Figura 1.11). Posteriormente, se observó que las proteínas DELLAs interactúan con una de las proteínas represoras de la señalización de JA, la proteína JAZ1. Por medio de esta interacción, las proteínas DELLAs secuestran a JAZ1, favoreciendo la expresión de genes de respuesta a JA (Hou et al., 2010) . A su vez, otro estudio, mostró que las proteínas DELLAs regulan positivamente la expresión de genes involucrados en la detoxificación de ROS, reduciendo los niveles de ROS (Achard et al., 2008). Se ha reportado que ROS puede potenciar la señalización mediada por SA, por lo que la modulación negativa de la vía SA mediada por las proteínas DELLAs podría ser explicada en base al efecto de las proteínas DELLAs sobre los niveles de ROS (Grant and Jones, 2009) (Ver Figura 1.11).

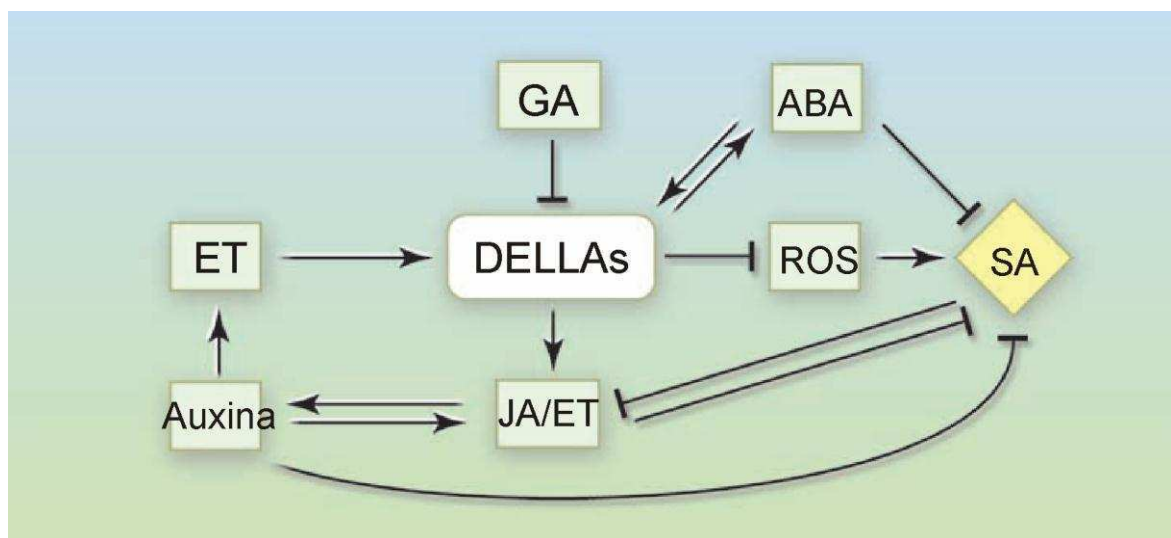


Figura 1.11: Interacciones propuestas entre las proteínas DELLAs y distintas vías hormonales. La vía de ET promueve la acumulación de proteínas DELLAs. Mientras que las DELLAs modulan positivamente la vía del ácido jasmónico y negativamente la vía del

SA, por medio de la disminución de los niveles de las ROS. Tomado de Grant y Jones, 2009.

1.10 La modulación de la respuesta de defensa durante las interacciones hospedante-patógeno

Las vías de señalización anteriormente descritas son finamente reguladas durante las interacciones bióticas. La regulación e interacción de estas vías de señalización determina la respuesta de defensa final, medida en términos de resistencia o susceptibilidad frente a un patógeno específico. Varios estudios han mostrado que los patógenos son capaces de alterar estas vías de defensa y de este modo incrementar la susceptibilidad del hospedante frente a la infección. En particular, en los últimos años, se han caracterizado varias proteínas virales capaces de alterar componentes implicados en vías de señalización y modular las vías de defensa mediadas por fitohormonas. En esta sección se resumen algunas de las vías regulatorias que son alteradas por los virus durante las interacciones con sus hospedantes.

1.10.1 El rol de la vía de ubiquitinación en defensa y su alteración por patógenos virales

La ubiquitina es un péptido de 76 residuos que se encuentra altamente conservado en el reino eucariótico. La adición de ubiquitina (proceso conocido como ubiquitinación) a las proteínas celulares se encuentra involucrado en el control de varias vías de señalización, entre ellas la respuesta mediada por hormonas, el desarrollo y la respuesta a patógenos (Glickman and Ciechanover, 2002).

El proceso de ubiquitinación se desarrolla en tres etapas, llevadas a cabo por tres clases de enzimas. En la primera etapa se produce la activación de la ubiquitina por medio de la enzima E1. En la segunda etapa se produce la transferencia de la ubiquitina de la enzima E1 a la enzima E2 (conjugadora de ubiquitina). Finalmente, en la tercera etapa se produce la transferencia de la ubiquitina, que se encuentra unida a la enzima E2, a la proteína blanco por medio de la enzima E3 ligasa. Las enzimas E3 ligasas son las encargadas de transferir de manera específica la ubiquitina. Existen distintas clases de E3 ligasas, entre ellas se encuentran el complejo SCF, el cual está compuesto por cuatro

componentes: RBX1, Cullin, SKP1 y una proteína F-BOX (Alcaide-Loridan and Jupin, 2012). El dominio RBX1 actúa como sitio de unión de las enzimas E2 e interactúa directamente con el dominio CULLIN1. A su vez, CULLIN1 se une a SKP1 el cual interactúa con una proteína tipo F-box, la cual funciona como una proteína adaptadora que recluta a los sustratos específicos hacia el complejo de ubiquitinación. En el genoma de *Arabidopsis thaliana* hay 694 genes que codifican para proteínas de tipo F-box, pero en la mayoría de los casos la función de dichas proteínas es desconocida (Alcaide-Loridan and Jupin, 2012). (Ver Figura 1.12)

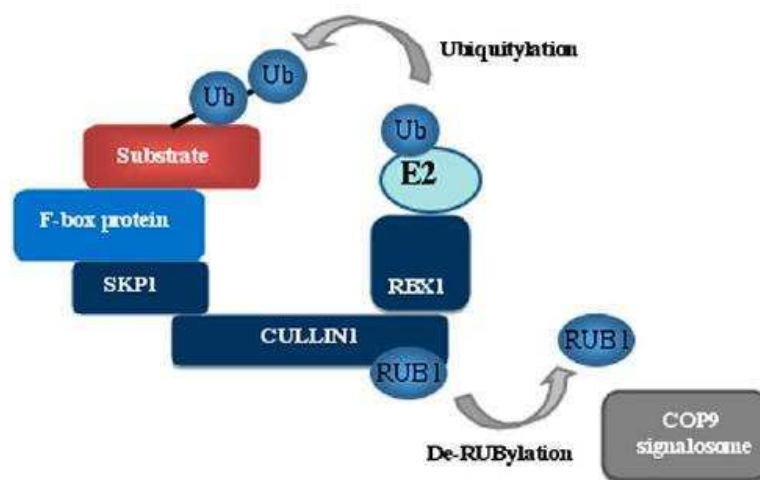


Figura 1.12: Representación esquemática del complejo SCF. La proteína F-BOX actúa reconociendo a las proteínas blanco. A su vez, la actividad del complejo es regulada por la adición de RUB1 (una proteína tipo ubiquitina) a la subunidad CULLIN1. La adición de RUB1 es regulada por el complejo COP9 signalosoma. Tomado de Alcaide-Loridan y Jupin, 2012.

A lo largo de la evolución los virus han adquirido diversas estrategias para eludir los mecanismos de defensas y, de este modo, generar un ambiente propicio para su replicación y propagación (Pallas and García, 2011). Varios trabajos indican que la alteración de la vía de ubiquitinación y la degradación de proteínas tendría un impacto en el establecimiento de las infecciones virales (Sahana et al, 2012, Alcaide-Loridan and Jupin, 2012). Por ejemplo, plantas de tabaco transgénicas que expresan una variante modificada de la ubiquitina y que, por consiguiente tienen alterada esta vía, acumulan menores niveles del TMV que las plantas salvajes (Becker et al., 1992). Por otra parte, ensayos realizados en plantas que expresan la proteína viral C2 de un geminivirus mostraron que esta proteína interactúa con la actividad del complejo COP9 signalosoma

(CSN) el cual regula la actividad de las E3 ligasas de tipo SCF. Como consecuencia de dicha interacción, varias respuestas hormonales están afectadas en estas plantas. En particular, la proteína C2 altera la respuesta de la vía de señalización del JA alterando la respuesta de defensa contra este Geminivirus (Lozano-Durán et al., 2011). Además, se ha observado que varias proteínas virales son también blancos del sistema de ubiquitinación, sin embargo se desconoce el impacto que esta modificación post-traducciona puede tener sobre el desarrollo de las infecciones virales (Alcaide-Loridan and Jupin, 2012).

1.10.2 Los factores de transcripción de la familia WRKY y su rol durante las infecciones virales

Las infecciones virales alteran la expresión de la transcripción de genes del hospedante contribuyendo a modular las respuestas de defensa antiviral. El genoma de *Arabidopsis* codifica para más de 2100 factores de transcripción, algunos de los cuales pertenecen a familias específicas de plantas, entre ellos la familia de transcripción WRKY (Riaño-Pachón et al., 2007). En *Arabidopsis*, esta familia está compuesta por 74 miembros que son clasificados en tres grandes grupos (Eulgem et al., 2000). Se ha observado que los factores de transcripción WRKY participan en respuestas frente a estreses bióticos y abióticos y en procesos de desarrollo como por ejemplo: la senescencia foliar, el desarrollo de tricomas y la señalización de hormonas. Además, se ha descrito que plantas mutantes para el factor WRKY33 son más susceptibles al patógeno necrotrófico *B. cinerea* (Zheng et al., 2006). Por otra parte, estudios recientes han mostrado que los factores de transcripción WRKY25, WRKY26 y WRKY33 coordinan respuestas frente al estrés de calor (Li et al., 2011). Los factores de transcripción WRKY también han sido involucrados en respuesta antiviral. Estudios realizados en plantas de tabaco, transformadas con una construcción capaz de silenciar al factor de transcripción WRKY4, mostraron mayores niveles de acumulación del virus TMV que las plantas control transformadas con el vector vacío (Ren et al., 2010). Además, estas plantas presentaban alteraciones en el desarrollo foliar, evidenciadas en hojas más anchas y con un mayor número que las plantas control (Ren et al., 2010). Otro trabajo realizado en *Arabidopsis thaliana* mostró que plantas mutantes del factor de transcripción WRKY8 acumulaban

mayores niveles de virus que las plantas salvajes (Chen et al., 2013) En este mismo estudio, se observó que el virus TMV-Cg regulaba negativamente la expresión de WRKY8 a medida que la infección progresaba. En conclusión, diversos trabajos muestran que los factores de transcripción pertenecientes a la familia WRKY tienen un rol en la modulación de las defensas antivirales.

1.10.3 El rol del SA y su modulación por proteínas virales

Varios estudios recientes han caracterizados proteínas virales capaces de alterar las vías de defensa mediadas por la hormona SA, entre ellos el estudio realizado por Conti y col. mostró que plantas de tabaco que expresaban la proteína de movimiento (MP) del TMV alcanzaban mayores niveles de acumulación de ROS y de la hormona SA con respecto a plantas salvajes, mientras que los niveles de acumulación de JA estaban reducidos en las plantas de tabaco que expresaban la MP respecto de las plantas salvajes (Conti et al., 2012). En este mismo trabajo, se analizó el rol de la CP del TMV sobre la modulación de la vía señalización de SA y JA. La expresión de la CP de TMV no produjo cambios en la acumulación de ROS, ni en los niveles de las hormonas SA y JA. Sin embargo, al analizar los niveles de expresión de genes de defensa, entre ellos PR1 y RDR1, se observó que mostraban niveles de expresión reducidos respecto de los niveles de expresión en plantas salvajes. En base a estos resultados, es posible suponer que la CP del TMV podría estar modulando negativamente la vía de defensa mediada por SA (Conti et al., 2012).

Por otra parte, el gen P6 del virus CaMV también ha sido involucrado en la modulación de la vía de SA. Este gen, que codifica para una proteína requerida para la traducción del ARN viral y para la supresión del silenciamiento de ARN (Love et al., 2007), también altera la respuesta de SA por medio de la modificación del factor NPR1 (Love et al., 2012). Como consecuencia de dicha modificación, la expresión de genes de respuesta a SA está inhibida, mientras que la expresión de genes de respuesta a JA está incrementada. Según estos autores, la regulación negativa de la vía de SA por parte de la proteína P6 podría contribuir a facilitar el movimiento sistémico viral (Love et al., 2012). En esta misma línea, trabajos realizados con el virus CMV, mostraron que la proteína 2b de este virus actúa como un supresor del silenciamiento y, además, le permite al virus evadir la resistencia mediada por la hormona SA (Ji & Ding, 2001; Lewsey et al., 2009). Estos trabajos

resaltan la importancia de la vía de defensa mediada por la hormona SA durante las infecciones virales y muestran que los virus han adquirido la capacidad de regular negativamente esta vía de defensa.

1.11 Objetivo General

El objetivo general de este trabajo es comprender el efecto de la expresión individual de la proteína de cápside (CP) del virus TMV-Cg sobre la expresión génica del hospedante *Arabidopsis thaliana*. Dado que se ha propuesto que la proteína CP de otro virus relacionado, el virus TMV, modula negativamente la expresión de genes involucrados en defensa en *N. tabacum*, resulta de interés analizar el rol de la CgCP sobre las vías de defensa, en particular aquellas que tienen un rol reportado en defensa antiviral.

Este trabajo tiene como foco contribuir al estudio de las vías de defensa que son alteradas durante la interacción virus-planta y a los mecanismos que, a lo largo de la evolución, han adquirido los virus a fin de contrarrestar el sistema de defensa del hospedante. Este estudio tendrá un impacto en la comprensión general de la relación hospedante-patógeno y contribuirá al mejoramiento del control de las enfermedades virales.

1.11.1 Objetivos específicos

- 1) Análisis del impacto de la CgCP en la modulación de la vía de defensa mediada por la hormona ácido salicílico.
- 2) Caracterización global del efecto de la expresión de la CgCP sobre la modulación de la expresión génica del hospedante *A. thaliana*. Análisis biológico de los datos obtenidos por medio de un ensayo de microarreglo realizado en plantas transgénicas que expresan la CgCP. Empleo de herramientas bioinformáticas y de información disponible en bases de datos para profundizar el estudio del efecto de la CgCP sobre la alteración de la expresión génica del hospedante *A. thaliana*.
- 3) Análisis del efecto de la expresión de la CgCP sobre la estabilidad de las proteínas DELLAs. Estudio del rol de las proteínas DELLAs en la modulación de la expresión

génica en plantas que expresan la CgCP y durante el desarrollo de la infección del virus TMV-Cg en el hospedante *Arabidopsis thaliana*.

1.12 HIPÓTESIS

La proteína de cápside del virus TMV-Cg altera la expresión de genes del hospedante durante las infecciones virales compatibles, impactando en la respuesta de defensa del hospedante.

Hipótesis anexa 1) *La alteración de la expresión génica y los niveles de acumulación de factores endógenos del hospedante contribuyen a modular la respuesta de defensa durante la expresión de la CgCP.*

1.13 Estructura de la Tesis

La tesis se compone de un primer capítulo en donde se presentan los trabajos que sirven de marco para el desarrollo del trabajo y un segundo capítulo en donde se detallan los materiales y métodos empleados durante la realización de la tesis. Los resultados obtenidos fueron organizados en tres capítulos, de acuerdo a los objetivos específicos previamente detallados. Inicialmente se indagó el rol de la CP sobre la modulación de genes de la vía de SA (Capítulo 3). Seguidamente, para profundizar el estudio del rol de la CgCP sobre la modulación de vías de defensa, se analizaron los datos de un microarreglo realizado en plantas que expresan la proteína de cápside bajo un promotor inducible. Los datos de dicho análisis y su validación se exponen en el capítulo cuarto de la presente tesis. Por otra parte, en este capítulo se analizó el impacto de la CgCP sobre la modulación génica de *A.thaliana* por medio del uso de herramientas bioinformáticas. En el capítulo quinto se caracterizó el rol de las proteínas DELLAs en la modulación de la expresión de los genes alterados por la CgCP. Asimismo, en este capítulo, se procedió a indagar el rol de las proteínas DELLAs durante la infección viral. Finalmente, en el capítulo sexto se plantean las conclusiones generales de la tesis, integrando la información obtenida en cada uno de los capítulos. La tesis se completa con un anexo en

donde se incorporó información adicional sobre la metodología y las herramientas empleadas para la confección de la tesis.

CAPÍTULO 2: MATERIALES y MÉTODOS

2.1 Material Vegetal empleado

En los capítulos tercero y cuarto se utilizaron plantas de *Arabidopsis* del cultivar Columbia (Col-0) no transgénicas y plantas transgénicas correspondientes a la misma variedad de *Arabidopsis*. Se emplearon dos líneas transgénicas, una que expresa la CP del virus TMV-Cg bajo un promotor inducible, denominada CP#72, y otra que expresa la CP de virus TMV-Cg bajo un promotor constitutivo, denominada CP#71 (Koo et al., 2004). Además, en el capítulo cuarto se empleó una línea mutante del gen NPR1 (AT1G64280), denominada npr1 1-3 (CS3802, número de identificación del *Arabidopsis Information Resource*, TAIR), la cual fue gentilmente cedida por el Dr. Gustavo Gudesblat.

En el capítulo quinto, además de las líneas previamente descritas, se empleó una línea de *Arabidopsis thaliana* perteneciente al cultivar Landsberg erecta (Ler) que expresa la proteína RGA fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés) regulada por medio del promotor propio del gen que codifica para la DELLA RGA (denominada pRGA::GFP-RGA) la cual fue gentilmente cedida por la Dra. Veronica Arana. Esta línea fue cruzada con la con la línea transgénica CP#72 para la realización de los experimentos de visualización de la proteína DELLA (ver: desarrollo de la línea pRGA::GFP-RGAxCP#72). Mientras que para los ensayos de cuantificación de genes regulados por las proteínas DELLA, se emplearon las líneas mutantes *gai-1* (CS63, número de identificación de TAIR) y la cuádruple mutante de DELLA (Dill et al., 2001; Achard et al., 2006). En este capítulo también se utilizaron plantas salvajes de la especie *N. benthamiana*.

Para los ensayos realizados con *A. thaliana*, las plantas fueron crecidas en una cámara Percival en condiciones controladas, 22°C y bajo un fotoperíodo de 16 hs luz y 8 hs oscuridad. Para los ensayos realizados con *N. benthamiana*, las plantas fueron crecidas en invernaderos con temperaturas dentro del rango de 20 a 26 °C con ciclos de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

2.2 Desarrollo de la línea pRGA::GFP-RGA x CP#72 por medio de cruzamientos

La línea que expresa la proteína DELLA RGA fusionada a GFP bajo el promotor propio de RGA (pRGA::GFP-RGA) fue cruzada con la línea transgénica CP#72. La línea doble transgénica homocigota fue obtenida por medio de subsiguientes cruces y fue seleccionada por medio de la técnica de PCR a partir de ADN genómico.

2.3 Protocolos generales de Biología Molecular

2.3.1 Extracción de ARN y confección de ADNc para RT-qPCR

Se recolectaron tejidos de roseta de plantas de Arabidopsis de aproximadamente 20 días de edad. El ARN total fue extraído a partir de 100 mg de tejido foliar de Arabidopsis procesado en nitrógeno líquido, utilizando *Trizol Reagent (Invitrogen)*, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ARN total se cuantificó por espectrofotometría mediante *Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies)* y posteriormente fue tratado con DNasa I (Invitrogen). El ADNc se sintetizó con la enzima retro-transcriptasa MMLV (Invitrogen) y oligonucleótidos al azar. Para los ensayos de RT-qPCR se emplearon como mínimo entre 4 y 5 réplicas biológicas.

2.3.2 Diseño de oligonucleótidos

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

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

Para la selección del gen de referencia más estable en las líneas transgénicas y la línea salvaje se evaluaron tres genes de referencia: el factor de elongación EF1 α (AT5G60390), el gen UBG5 (AT3G62250) y el gen que codifica para gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH), AT3G04120. Para el análisis de estabilidad se utilizaron los *softwares* : Normfinder y Bestkeeper. En el apéndice A se muestran los resultados del análisis realizado por medio de estos programas.

2.3.4 Realización de RT-qPCR, obtención y análisis de datos de expresión

Las condiciones experimentales para la confección de las RT-qPCR se establecieron a partir de las normas internacionales MIQE (Bustin, 2010). Estas normas se detallan en el apéndice B. Para obtener el valor de expresión diferencial de un gen específico en una línea transgénica con respecto al control, se deben normalizar los datos utilizando un gen de referencia como control interno. Los análisis de expresión relativa fueron realizados mediante el software fgStatistics (Di Rienzo J. A, 2009) que utiliza el algoritmo desarrollado por Pfaffl (Pfaffl, 2001) para obtener los valores de expresión relativa. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos niveles de expresión cuyos p-valores fueron menores a 0,05 (indicados con *).

2.3.5 Extracción de ADN genómico por medio del protocolo de DELLA PORTA

Para la extracción de ADN genómico se procedió a emplear el protocolo diseñado por DELLAPORTA (Dellaporta et al, 1983). Se tomaron dos hojas de Arabidopsis las cuales fueron procesadas en presencia de 700 µl de un buffer de extracción (100 mM Tris pH 8.0, 50mM EDTA pH 8.0, 500 mM NaCl, 10 mM β mercaptoetanol). Luego se procedió a tratar a las muestras a 65 °C por diez minutos. Pasados los 10 minutos, se agregó 200µl de acetato de potasio (ACK) 5 M a las muestras y se incubaron 20 min en hielo. Posteriormente, se procedió a centrifugar a las muestras a 13000 rpm durante otros 20 min a 4 °C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se precipitó el ADN con 600 µl de isopropanol. Se dejó 10 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó 15 minutos a 13 000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado del pellet con etanol 70 %. Luego se centrifugó nuevamente por 5 minutos a 10 000 rpm, se descartó el sobrenadante, se secó el pellet y se resuspendió en 25 µl de agua destilada.

2.3.6 Preparación de células de Agrobacterium electrocompetentes

Para la preparación de Agrobacterium electrocompetentes se agregaron 0,5 ml de un cultivo crecido durante 12 horas, a un recipiente conteniendo 500 ml de LB. Las células fueron crecidas hasta un OD600 de 0.7 y luego se enfriaron durante 30 minutos. Se centrifugaron a 4000g por 15 minutos y se realizaron lavados con una solución de 10% de

glicerol. Finalmente, se resuspendieron en 1,4 ml de glicerol 10% frío y se alicuotaron y guardaron a -80C

2.3.7 Electroporación de Agrobacterium

Para la electroporación se empleó un equipo BIORAD y cubetas de 0,2 cm. Se agregó 1 μ l de preparación de ADN plásmidico a 25 μ l de células electrocompetentes. Esta mezcla fue incorporada a la cubeta de electroporación y esta cubeta fue empleada para realizar la electroporación. Los siguientes parámetros fueron empleado para la realización de la electroporación: capacitancia = 330, resistencia= 4000 Ω y voltaje= 350 V.

Luego de la electroporación las células fueron transferidas a 1 ml de medio LB (Bertani, 1952) e incubadas por 1-2 horas a 28° C con una agitación suave. Finalmente las células fueron plaqueadas en LB- agar suplementado con los correspondientes antibioticos.

2.4 Análisis bioinformáticos

2.4.1 Clasificación funcional de los genes expresados diferencialmente en las plantas de la línea CP#72 inducida versus la línea CP#72 no inducida

Para la anotación funcional de los genes, se procedió a emplear la el programa GOEAST (<http://omicslab.genetics.ac.cn/GOEAST/>). Este programa permite clasificar a los genes según sus anotaciones funcionales. Este programa emplea test un hipergeometrico como método estadístico para identificar categorías funcionales enriquecidas en una lista de genes.

2.4.2. Empleo del programa ATTED para la generación de redes de co-expresión

El programa ATTED fue empleado para realizar un análisis bio-informático de los genes co-expresados. Este programa emplea el coeficiente “Mutual Rank” (MR) como medida de co-expresión entre dos genes. El MR es calculado a partir de la media geométrica de los valores del coeficiente “PCC rank” (rango del coeficiente de co-expresión). Además,

para cada gen de interés ATTED presenta los 300 genes más cercanamente co-expresados e informa el valor de MR.

2.4.3 Empleo de herramientas bio-informáticas para la búsqueda motivos regulatorios en un set de genes-co expresados

Para la búsqueda de motivos sobre-representados en el set de promotores, se siguió una aproximación “sesgada” (Bailey, 2008). Esta aproximación se basa en el ensamblado de un pequeño set de secuencias y en la búsqueda de motivos sobre-representados en dichas secuencias respecto de un set de secuencias control (*background model*).

Los pasos básicos del análisis de promotores son: el ensamblado de las secuencias, la limpieza de las secuencias, la búsqueda de motivos y la evaluación de los mismos.

Para el ensamblado de las secuencias se procedió a seleccionar un conjunto de genes cuya expresión estaba alterada por efecto de la expresión de CgCP y ampliar dicho set por medio del programa ATTED, el cual permite encontrar genes que tienden a co-expresar con los genes de interés. Este análisis presupone que los genes cuya expresión es alterada por la proteína de cápside, y los genes que co-expresan con este set de genes, comparten elementos regulatorios comunes en sus promotores y que dichos elementos se encuentran sobre-representados, con respecto a secuencias tomadas al azar.

Luego de seleccionar los genes, se procedió a extraer 1000 pb correspondientes a la región promotora de los genes. Para la extracción de las regiones promotoras, se empleó el programa RSA Tools (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>), el cual permite obtener en un archivo FASTA la lista de las regiones de interés de un gran número de organismos, entre ellos *Arabidopsis thaliana*.

El siguiente paso consistió en desechar promotores muy parecidos entre sí, esto se realizó con el programa Purge de MEME Suite. Seguidamente, se enmascararon las secuencias de baja complejidad y repetitivas con el programa TANTAN empleando los parámetros por default (Frith, 2011).

Una vez depuradas las secuencias, se procedió a la búsqueda de motivos por medio del empleo de distintos algoritmos. Se emplearon los programas Weeder, MEME y BioProspector (Bailey et al., 2009). Uno de los parámetros más importantes a definir en la

búsqueda de motivos, es el largo de los mismos. Por medio del programa Weeder se buscaron motivos de 6, 8, 10 y 12 pares de bases, con MEME se buscaron motivos de 10, 12 y 14 pb y con BioProspector se buscaron motivos de 8, 10, 12 y 14 pb.

Por medio de este análisis se obtuvieron 75 motivos, de los cuales 17 están sobre-representados ($p < 0.05$). Para eliminar motivos redundantes, se agruparon los motivos similares y obteniéndose 9 motivos no redundantes por medio del programa STAMP. Este programa también permitió analizar la función de los motivos encontrados comparando la similitud de los motivos con otros disponibles en bases de datos (Mahony and Benos, 2007). De estos 9 motivos, 7 poseen similitud con motivos previamente descritos. Finalmente con el programa FIMO se procedió a analizar la presencia de estos motivos en las secuencias promotoras que habían sido usadas para la búsqueda de los motivos. De este modo, se puede conocer la presencia y la ubicación de los motivos en las secuencias promotoras.

2.5 Análisis de microscopia

2.5.1 Visualización de la proteína GFP–RGA por microscopia de fluorescencia

Las imágenes de microscopia de fluorescencia fueron obtenidas con una microscopio Leica (Wetzlar, Germany) empleando un objetivo 63X. Para la excitación se empleó un laser de argón a 488 nm y la emisión se colectó a 500-550 nm para la detección de GFP. Para este experimento se emplearon plántulas de cinco días de edad *pRGA:GFP-RGA x CP#72* crecidas en el medio de cultivo Murashige and Skoog (MS al medio), estas plántulas fueron tratadas con 61.3 μ M del inductor methoxyfenozide (MOF) por tres días y subsiguientemente fueron tratadas por 1 hora con una solución conteniendo 10 μ M de GA₃.

2.5.2 Visualización de YFP-GAI por medio de microscopia de fluorescencia

Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio Leica de fluorescencia (Wetzlar, Germany) empleando el objetivo 10 X. La longitud de onda empleada para la excitación de GFP fue de BP 450-490 nm, mientras que para la emisión se usó un filtro LP (Long pass) de 515nm. Todas las imágenes fueron obtenidas empleando los mismos parámetros.

Para este experimento se emplearon hojas de *N. benthamiana*, infectadas con el virus TMV-Cg, las cuales fueron posteriormente agroinfiltradas con una construcción YFP-GAI. A los 3 días luego de la agroinfiltración, las hojas fueron rociadas con una solución conteniendo 100 μM de GA_3 . Tras una hora de la aplicación de GA_3 , las hojas fueron visualizadas al microscopio de fluorescencia.

La agroinfiltración fue realizada en hojas superiores de plantas previamente infectadas con el virus TMV-Cg (6 dpi). A los 3 días post- agroinfiltración, se procedió a tratar a las hojas agro-inoculadas con una solución 100 μM de GA. Luego de una hora, se procedió a observar los niveles de acumulación de DELLA empleando un microscopio de fluorescencia.

2.5.3 Análisis cuantitativo de la acumulación de GFP y YFP

Veinte núcleos al azar de cinco plantas diferentes para cada tratamiento fueron analizadas para la cuantificación de los niveles de GFP/ YFP que se acumulaban en células de *Arabidopsis thaliana* y *N. benthamiana* usando el programa ImageJ Software (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Todos los núcleos visibles fueron cuantificados, en los casos en los cuales se observaron menos de veinte núcleos visibles. Todas las imágenes fueron capturadas usando los mismos parámetros y fueron procesadas de igual modo. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas por medio del test one-way ANOVA usando el post test Tukey por medio del programa InfoStat (InfoStat version 2008. Grupo InfoStat. FCA, Universidad Nacional de Córdoba). El nivel de significancia empleado para todos los post test fue de $\alpha = 0.05$.

2.6 Experimentos de expresión transientes realizados en *N. benthamiana*

Los experimentos de expresión transientes en plantas de *Nicotiana benthamiana* fueron realizados mediante agroinfiltración con una solución de *Agrobacterium* conteniendo una construcción que codifica para YFP-GAI. La construcción YFP-GAI fue provista por el grupo del Dr. David Alabadí (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV), Valencia).

2.7 Análisis del desarrollo de *A. thaliana*

Para los experimentos del análisis de desarrollo de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* fueron crecidas macetas en cámara Percival en condiciones controladas, 22°C y bajo un fotoperíodo de 16 hs luz y 8 hs oscuridad. Las macetas fueron estratificadas a 4°C en un refrigerador durante tres días. A los 20 días de edad (estadio 1.08, (Boyes et al., 2001) las plantas CP#72 fueron regadas con 61.3 µM MOF o con agua (plantas control). Se contabilizó el día en que aparece la primera flor y, a las 6 semanas de edad, se determinó la altura de las plantas.

Para los experimentos realizados en plántulas, se procedió a desinfectar las semillas y a crecer las mismas en placas conteniendo el medio de cultivo Murashige Skoog (al medio)(Murashigue and Skoog, 1962). Las placas fueron estratificadas en un refrigerador a 4°C durante tres días para sincronizar la germinación. Las placas fueron luego ubicadas en cámaras de cría a 20°C y con un fotoperíodo de 16:8 h luz/oscuridad. Luego de la germinación, las semillas fueron tratadas con una solución conteniendo 61.3 µM MOF o bien con agua. El peso del tejido fresco de las plántulas tratadas con MOF y tratadas con agua fue medido a los 10 días del ensayo.

2.8 Metodología empleada para los ensayos de infecciones virales

2.8.1 Infección de *A. thaliana* con el virus TMV-Cg

Para las infecciones de las plantas de *Arabidopsis* se seleccionó la tercer hoja de plantas con 8 hojas verdaderas (20 días de edad aproximadamente) y se roció a esta hoja con carborundum. Subsiguientemente, se agregó 5 µl de una solución conteniendo el virus TMV-Cg diluído en una solución de 20 mM NaHPO₄ (pH 7) y se procedió a la abrasión suave de la superficie de la hoja. En las plantas mock-inoculadas la abrasión se realizó en presencia de buffer. Todas las infecciones fueron realizadas luego del mediodía. Muestras de tejido sistémico (excluyendo la hoja inoculada) fueron tomadas a días post infección. Las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y guardadas a -80°C hasta la extracción de RNA.

2.8.2 Cuantificación del título del virus TMV-Cg por medio de la técnica de RT-qPCR

El ARN total fue aislado empleando el reactivo Trizol (Invitrogen). Una vez extraído el ARN, se procedió al tratamiento con la enzima DNasa I (Invitrogen) y , posteriormente, a la síntesis de la primera hebra del ADNc con la enzima MMLV, (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones provistas por el fabricante. Los experimentos de RT-qPCR fueron llevados a cabo empleando el equipo de PCR en tiempo real ABI Prism 7500 (Applied Biosystems). Las secuencias de los oligonucleótidos empleados en la detección del virus TMV-Cg se detallan en en el apéndice C.

2.8.3 Infección de *A. thaliana* con el virus TuMV

Para infectar plantas de *Arabidopsis thaliana* se utilizó un extracto fresco recién obtenido de un machacado de plantas infectadas previamente. El potyvirus TuMV se mantuvo en plantas de *A. thaliana* ecotipo Col0 infectadas. Plantas mock-inoculadas fueron inoculadas con buffer sulfito de sodio (1% K₂HPO₄ + 0,1% Na₂SO₃ m/v) y los machacados infectivos se obtuvieron utilizando este buffer en relación 5:1 con tejido fresco infectado (v/m). Las plantas fueron inoculadas mecánicamente. Las plantas fueron infectadas a 21 días post-sembrado, durante el estadio de desarrollo de la planta 1.08 (Boyes et al, 2001). La inoculación se realizó en la tercera hoja verdadera, empleando 5 µL de inóculo por cada planta. A los 10 dpi, se procedió al muestro de las hojas sistémicas, excluyendo la hoja infectada.

2.8.4 Cuantificación del virus TuMV por medio de ELISA

2.8.4.1 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, según las especificaciones del fabricante. Para la confección de las curvas de calibración se empleó la proteína albumina proveniente de suero bovino (BSA por su sigla en inglés), 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.

2.8.4.2 Detección por DAS-ELISA de CP virales

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

2.9 Tratamiento con hormonas e inductor

2.9.1 Tratamiento con SA

Las plantas fueron rociadas con 0.5 ml de una solución que contenía 0.5 mM de ácido salicílico (SA) o agua. Se muestrearon las rosetas enteras luego de 24 hs del tratamiento con SA, inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido y fueron guardadas a -80°C hasta la extracción del ARN.

2.9.2 Tratamiento con GA₃

Para el tratamiento con GA₃ se procedió a preparar una solución madre (200 µM) de esta hormona en etanol. Posteriormente, se prepararon soluciones de uso de 100 µM y 10 µM, empleando agua como solvente. Para los ensayos realizados con plántulas de *A thaliana* se empleó una solución 10 µM, mientras que para los ensayos realizados en *N. benthamiana* se empleó una solución 100 µM.

2.9.3 Inducción de la expresión de la cápside del virus TMV-Cg en plantas transgénicas

Plantas de la línea CP#72 fueron crecidas en tierra hasta los 20 días de edad (estadio 1.08) (Boyes et al., 2001), luego estas plantas fueron regadas con una solución 61, 3 µM del inductor methoxyfenozide (MOF). Las plantas de la línea CP#72 no inducidas, usadas como control, fueron regadas con agua. A las 48 hs del tratamiento se tomaron muestras

de tejido de roseta e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido hasta la extracción de ARN.

2.10 Determinación de ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA)

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

Procedimientos para la cromatografía y espectrometría de masas (LC-ESI-MS/MS): Para la cromatografía líquida de alta performance se utilizó un sistema Waters (Milford) Alliance 2690. Se inyectaron alícuotas de 20 μl en un sistema de columnas C18 de fase reversa Nucleosil ODS (100 mm x 2.1 mm, 3- μm). Las fitohormonas fueron eluidas comenzando con un gradiente inicial de metanol 40 % y agua: etanol 60 %. Luego, 25 minutos después, con metanol 80 % y agua: etanol 20 %. La identificación y cuantificación se efectuaron mediante la inserción de efluentes con un electrospray de ionización negativa (ESI-MS/MS) dentro de un espectrómetro de masas triple-cuadrupolo (*Quattro UltimaTM*, Micromass) acoplado a HPLC.

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

CAPÍTULO 3: ANÁLISIS DEL ROL DE LA PROTEÍNA DE CÁPSIDE DEL VIRUS TMV-CG SOBRE LA MODULACIÓN DE VÍAS DE DEFENSA

Introducción

El empleo de plantas transgénicas que expresan proteínas virales ha sido una metodología ampliamente empleada para estudiar, de manera individual, el impacto de cada proteína viral sobre la modulación de la expresión génica y la alteración de factores del hospedante (Maule et al., 2002). Por ejemplo, el uso de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan de manera ectópica del gen P6 del Virus del mosaico del coliflor (CaMV) mostró que esta proteína puede actuar atenuando la expresión de genes de respuesta a SA (Love et al., 2012). La proteína P6 altera al factor NPR1 (NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED1) y como consecuencia disminuye la expresión de genes de respuesta de SA y, a su vez, incrementa la expresión de genes dependientes de la vía de JA. En otro caso, el empleo de plantas transgénicas que expresaban la proteína 2b del CMV mostró que esta proteína es un importante determinante en la formación de síntomas y, además, está involucrada en el movimiento de larga distancia (Lewsey et al., 2009). Esta misma estrategia fue usada para estudiar el rol de la proteína C2 de los Geminivirus (Lozano-Durán et al., 2011). El trabajo realizado por Lozano-Durán y colaboradores, mostró que la proteína C2 interfiere con un componente regulatorio de la vía de ubiquitinación (Lozano-Durán et al., 2011), la cual está involucrada en la regulación de la señalización de diversas hormonas (Dreher and Callis, 2007).

El estudio de la modulación de vías de defensa por medio de las proteínas virales forma parte de los temas de investigación desarrollados por nuestro grupo. En los últimos años, hemos caracterizado el rol de dos proteínas virales, la proteína de movimiento (MP) y la proteína de cápside (CP) sobre la modulación de vías de defensa (Conti et al., 2012). Dicho trabajo mostró que la CP del virus TMV modula negativamente la expresión de genes de defensa de la vía del SA. En la presente tesis, con el objetivo de profundizar los estudios previos realizados en *N. tabacum*, se procedió a analizar la expresión de genes

de respuesta a SA en una línea transgénica de *Arabidopsis thaliana* que expresa la proteína de la cápside del virus TMV-Cg (CgCP) (Yamanaka et al., 1998). El virus TMV-Cg se encuentra altamente relacionado al virus TMV, pero a diferencia de este último, es capaz de infectar exitosamente a *Arabidopsis thaliana*. A continuación, se presentan los resultados de dicho análisis.

Resultados

3.1 Estudio de la cinética de acumulación de la proteína CgCP en plantas transgénicas que expresan la CgCP bajo un promotor inducible

Para el desarrollo de la presente tesis se empleó una línea transgénica que expresa la proteína de cápside CgCP bajo un promotor inducible (CP#72). Esta línea transgénica fue desarrollada en el laboratorio del Dr. Roger Beachy (Donald Danforth Plant Science Center, USA). El nivel de expresión de la proteína CgCP de en la línea CP#72 fue analizado en un trabajo realizado por Koo et al. (2004). En este trabajo se determinó que el sistema empleado permite obtener mayores niveles de acumulación de la proteína de cápside que los obtenidos empleando la línea que expresa la proteína de cápside bajo la regulación del promotor 35S (Koo et al., 2004).

El sistema de expresión inducible presenta una serie de ventajas respecto al uso del sistema de expresión constitutiva regulado por el promotor 35S. Por empezar, el uso de un sistema inducible permite controlar el estadio de desarrollo en que se expresa la proteína viral, permitiendo reproducir de una manera más similar lo que ocurre en las plantas infectadas. Por otra parte, los mayores niveles de acumulación de la CgCP en la línea CP#72 (respecto de los niveles acumulados en la línea que posee un promotor 35S) se acercan más a los niveles de cápside detectados durante la infección viral.

Previo a analizar el rol de la proteína de CgCP en la modulación de vías de defensa, se procedió a caracterizar detalladamente la cinética de acumulación de esta proteína en la línea transgénica denominada CP#72, en las condiciones de crecimiento empleadas para los ensayos de esta tesis, las cuales presentan ciertas diferencias con las condiciones de crecimiento empleadas por Koo et al. (2004). Para ello, plantas de la línea CP#72 fueron crecidas en tierra hasta los 20 días de edad (estadio 1.08) (Boyes et al., 2001), luego estas

plantas fueron regadas con el inductor (MOF) y finalmente las plantas fueron muestradas a distintos tiempos post-inducción. Por medio de la técnica de RT-qPCR se compararon los niveles de acumulación de la CgCP en plantas de la línea transgénica inducible con los niveles de acumulación de CgCP en plantas de una línea transgénica constitutiva (CP#71). El nivel de acumulación de CgCP también fue determinado en plantas no transgénicas infectadas con el virus TMV-Cg. A las 6 hs post inducción, los niveles de acumulación de CgCP fueron menores en las plantas de la línea CP#72 con respecto a la línea constitutiva (CP#71). A partir de las 24 hs luego de la inducción de la CgCP, la línea inducible (CP#72) mostró niveles de acumulación superiores que la línea constitutiva (CP#71). A las 48 hs post inducción, se observaron los niveles máximos de acumulación de la CgCP, manteniéndose niveles similares a las 72hs. Por otro lado, al comparar los niveles de acumulación de la CgCP de la línea CP# 72 con los niveles de acumulación en plantas infectadas a 7 días post infección (dpi), se observó que los niveles de acumulación de la planta transgénica inducible son significativamente menores que los observados en una infección viral (Figura 3.1). En conclusión, este ensayo mostró que entre las 48 hs y las 72 hs luego del tratamiento con MOF se alcanzan los mayores niveles de acumulación de la CgCP. En base a esto, en todos los ensayos de esta tesis se procedió a analizar el comportamiento de la línea CP#72 entre las 48 y 72 hs luego de la aplicación de MOF.

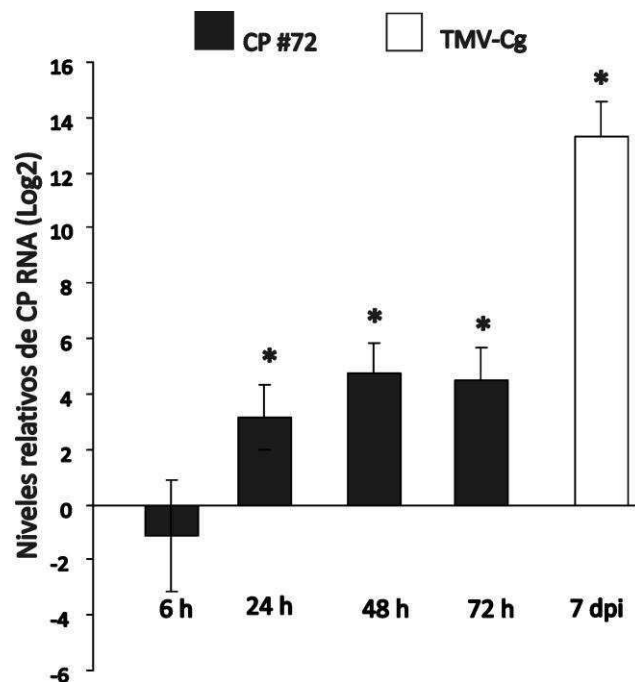


Figura 3.1 Cinética de la acumulación de la CgCP en plantas transgénicas de la línea CP#72.

Niveles relativos de la acumulación de la CgCP a distintos tiempos luego del tratamiento con el inductor MOF. Los niveles de expresión fueron relativizados respecto de la línea CP#71. Los niveles de acumulación de CgCP en la línea CP#71 (línea de expresión constitutiva) fueron arbitrariamente fijados en 1 ($\text{Log}_2(1)=0$).

Las barras corresponden al valor de la media \pm el error estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* = p-valor $\leq 0,05$).

3.2 Cuantificación relativa de genes implicados en la respuesta a SA en plantas que expresan la CP de TMV-Cg de manera inducible y de manera constitutiva

Ensayos realizados en plantas de *N. tabacum* que expresan la CP de TMV muestran que la CP es capaz de modular la expresión de genes de defensa, en particular genes involucrados en la vía de SA (Conti et al., 2012). En base a estos resultados, se procedió a cuantificar la expresión de genes de respuesta a SA en líneas transgénicas de la especie *A. thaliana* que expresan la CgCP bajo la regulación de un promotor inducible (CP#72) y bajo la regulación del promotor constitutivo (CP#71). Los genes, cuya expresión fue analizada, además de estar regulados por la hormona SA, poseen un rol reportado en defensa antiviral. Por ejemplo, el gen *RDR1* codifica para una proteína involucrada en la maquinaria de silenciamiento antiviral (Yu et al., 2003a). Mientras que *AOX1A* es la oxidasa terminal de la cadena de respiración alternativa resistente a cianuro y ha sido involucrada en resistencia frente a virus (Chivasa et al., 1997). Finalmente, el gen *WRKY70* fue elegido en base a su conocido rol regulatorio durante la señalización de SA (Jing et al., 2006).

Para la realización de este experimento, plantas de la línea transgénica CP#72, en el estadio de desarrollo 1.08, fueron regadas con el inductor o bien fueron regadas con agua (plantas control). Se tomaron muestras a 6, 24, 48 y 72 hs post- inducción y se procedió a la cuantificación de los genes previamente seleccionados por medio de la técnica de RT-qPCR. Los genes *RDR1* y *WRK70* mostraron una reducción en los niveles de expresión a las 6, 24, 48 y 72hs, y a las 6, 48 y 72hs respectivamente. Por otra parte, se observó un incremento transiente en el nivel del transcripto codificado por *AOX1a* a las

24 hs post inducción y, posteriormente, una disminución de la expresión del transcripto a las 72 hs post inducción (Figura 3.2 A).

En paralelo, se cuantificaron los mismos genes en la línea CP#71 (Figura 3.2 B). *RDR1* y *WRKY70* mostraron una reducción de su expresión en esta línea independiente comparada con los niveles en plantas no transgénicas. Sin embargo, el nivel de *AOX1A* permaneció inalterado en la línea CP#71.

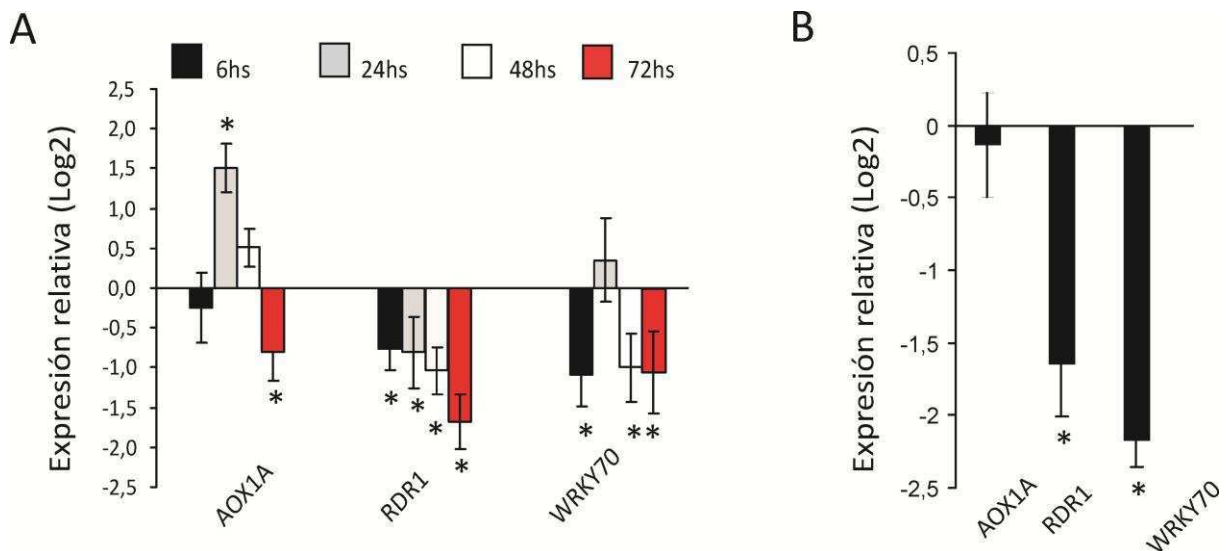


Figura 3.2: La CgCP regula negativamente los niveles de expresión de genes de respuesta a SA.

A) Niveles relativos de los transcritos codificados por *AOX1α*, *RDR1* y *WRKY70* luego de la inducción de la CgCP en plantas CP#72 a distintos tiempos luego de la inducción con MOF. El nivel de expresión de cada gen fue relativizado respecto del nivel de expresión en la línea CP#72 no inducida (plantas control), asignando como uno al nivel de expresión de cada gen en este grupo de plantas control ($\text{Log}_2(1)=0$).

B) Niveles relativos de los transcritos codificados por *AOX1α*, *RDR1* y *WRKY70* en plantas de la línea CP#71 fueron comparados con los niveles de las plantas salvajes Col-0. Se estableció arbitrariamente que el valor del nivel de expresión en las plantas salvajes fuese igual a 1($\text{Log}_2(1)=0$).

Las barras corresponden al valor de la media \pm el error estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* = p-valor $\leq 0,05$).

A continuación, con el objetivo de excluir que los efectos transcripcionales observados en la línea CP#72 fueran debidos al tratamiento con el inductor, se procedió a determinar el nivel de expresión de este grupo de genes en plantas salvajes (Col-0) tratadas con MOF y tratadas con agua (control). No se observaron diferencias estadísticamente

significativas entre tratamientos, confirmando que los cambios observados son exclusivamente debidos a la expresión de la CP (Figura 3.3).

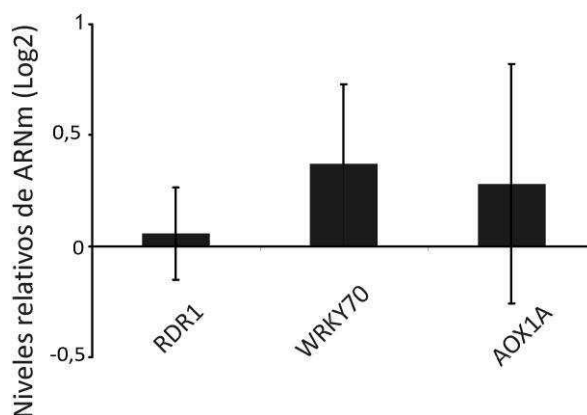


Figura 3.3: El tratamiento con MOF no altera la expresión de los genes de respuesta a SA. Niveles relativos de acumulación de los transcritos codificados por *RDR1*, *WRKY70*, *AOX1a* en plantas salvajes (Col-0) luego de 48 hs del tratamiento con el inductor MOF. El nivel de expresión de cada gen fueron relativizado respecto del nivel de expresión en plantas salvajes tratadas con agua (plantas control) y se estableció que el nivel de expresión de cada gen en las plantas control fuese 1. ($\text{Log}_2(1)=0$). Las barras corresponden al valor de la media \pm el error estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* = p-valor \leq 0,05)

3.3 Análisis del rol de la CP sobre la vía de señalización mediada por SA

Habiendo observado que la CgCP altera la expresión de genes de respuesta a SA, se procedió a analizar el efecto de la expresión de la CP en plantas tratadas con la hormona SA. Para ello, en primera instancia las plantas CP#72 fueron tratadas con MOF o agua y 48 hs más tarde fueron rociadas con una solución de SA 0.5 mM o agua. 24 hs luego del tratamiento con SA, los niveles de expresión de *WRKY70*, *AOX1A* y *RDR1* fueron analizados y comparados con los niveles en plantas CP#72 no tratadas con SA, ni MOF (CP#72 control). En las plantas CP#72 no inducidas (denominadas CP#72(-)), los niveles de expresión de *WRKY70*, *AOX1A* y *RDR1* se incrementaron luego del tratamiento con SA (Figura 3.4), comparadas con el grupo control. Sin embargo, no se observó un incremento en los niveles de expresión de este grupo de genes luego del tratamiento con SA en plantas CP#72 inducidas con MOF, (MOF)+SA, al ser comparadas con los niveles de

expresión en la plantas control CP#72(-) (Figura 3.4). Por lo tanto, estos resultados indican que la CgCP modula negativamente la expresión de *WRKY70*, *AOX1A* y *RDR1* luego el tratamiento con SA.

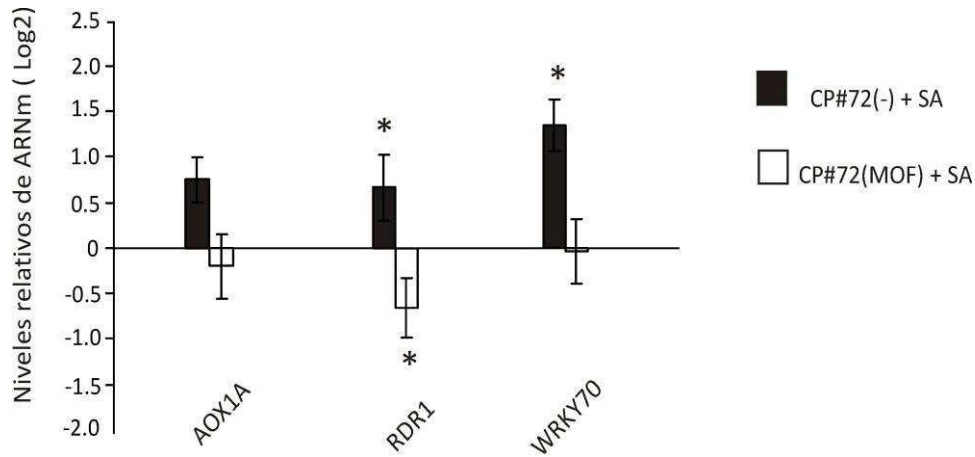


Figura 3. 4: La expresión de la CgCP contrarresta la inducción mediada por SA de los genes *RDR1* y *WRKY70*.

Niveles relativos de acumulación de los transcritos codificados por *AOX1a*, *RDR1* y *WRKY70* en plantas de la línea CP#72 luego del tratamiento con SA. Pasadas 48hs luego del tratamiento con agua o con MOF de plantas de la línea CP#72 se procedió a rociar a las plantas con SA (0,5mM) o con agua. Los niveles de expresión fueron relativizados respecto de los niveles en plantas no inducidas CP#72 tratadas con agua y este valor de expresión fue arbitrariamente fijado en 1 ($\text{Log}_2(1)=0$).

Las barras corresponden a los valores de la media \pm error estándar. Los asteriscos indican que existen diferencias significativas (* = p -valor < 0.05).

3.4 Determinación del ácido salicílico (SA) y del ácido jásmonico (JA) en plantas que expresan la CgCP

Dado que la CgCP altera la expresión de genes involucrados en la señalización por SA, se procedió a la cuantificación de los niveles hormonales de SA y del ácido jasmónico (JA) en plantas transgénicas CP#72 y no transgénicas Col-0 tratadas con el inductor. La determinación de JA fue llevada a cabo dado que esta hormona tiene un rol antagónico al SA (Spoel et al., 2007). La acumulación de ambas hormonas fue analizada previo a la aplicación del inductor (0 hs) y a distintos tiempos luego del tratamiento con el inductor (24 hs , 48 hs y 72 hs). El análisis estadístico fue realizado por medio de un test de

ANOVA y las comparaciones entre tratamientos fueron realizadas por medio de un test de Tukey.

Al comparar los niveles de acumulación de SA entre las CP#72 y las plantas no transgénicas tratadas con MOF en cualquiera de los tiempos estudiados no se detectaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 3. 5). Estos datos concuerdan con lo reportado previamente en los ensayos realizados con plantas transgénicas de tabaco que expresan la CP de TMV bajo un promotor constitutivo (Conti et al., 2012). Por otro lado, el análisis de las variaciones de los niveles de SA medidos en las plantas de la línea CP#72 luego del tratamiento con MOF; no mostró diferencias estadísticamente significativas. Por otra parte, cuando se analizaron las variaciones de los niveles de SA medidos en las plantas salvajes luego del tratamiento con MOF; se observó un leve incremento de los niveles de SA a las 48 hs luego del tratamiento con MOF. Si bien este incremento es estadísticamente significativo, no parecería tener impacto en la expresión de genes de respuesta a SA ya que que las plantas salvajes tratadas con MOF no muestran cambios estadísticamente significativos en la expresión de los genes *RDR1*, *WRKY70* y *AOX1A* respecto de plantas salvajes tratadas con agua (Figuras 3.3 y 3 .5).

En paralelo, se cuantificaron los niveles de acumulación de JA en las plantas de la línea CP#72 y en plantas no transgénicas tratadas con MOF. Al comparar los niveles de acumulación de JA entre las plantas de la línea CP72 y las plantas salvajes tratadas con MOF no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en cualquiera de los tiempos estudiados (Figura 3. 5). Por otra parte, el tratamiento con MOF no alteró los niveles de acumulación de JA en las plantas de la línea CP#72 a los distintos tiempos del tratadamiento con MOF. El tratamiento con MOF tampoco produjo cambios en los niveles de acumulación de JA en plantas Col-0 salvajes. En conjunto, estos experimentos demuestran que la CgCP modula la vía de señalización de SA, sin alterar los niveles basales de SA, ni de JA.

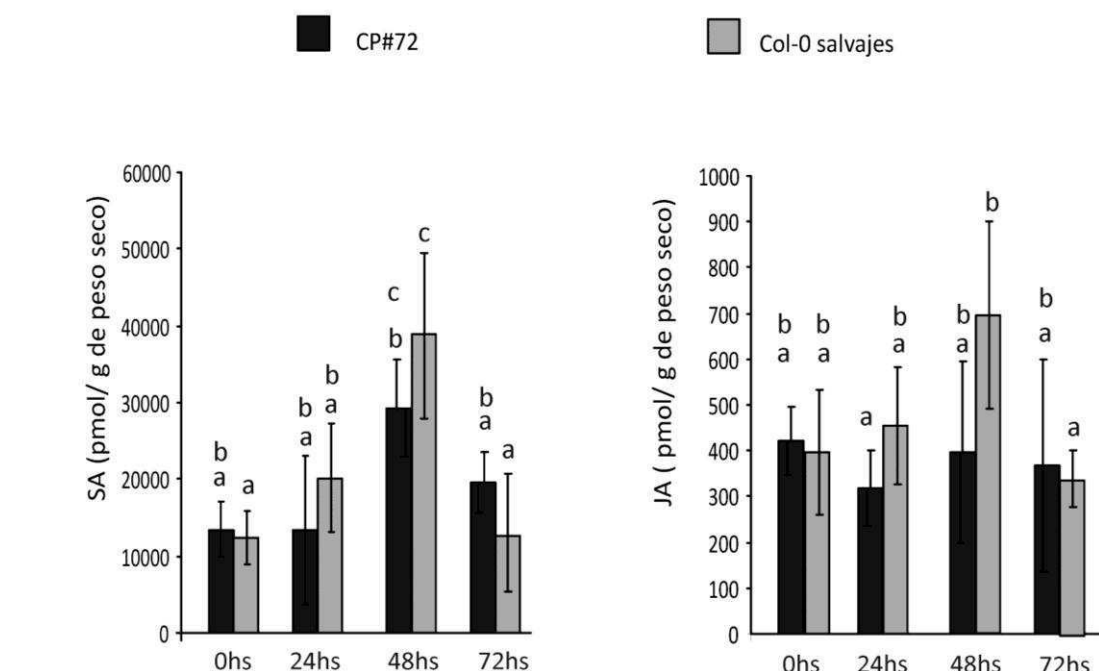


Figura 3.5: Niveles de acumulación de las hormonas JA y SA determinado por medio de la técnica de HPLC en plantas de la línea CP#72 y plantas salvajes a distintos tiempos luego de la aplicación de MOF. Las barras representan el valor promedio de cuatro réplicas biológicas \pm error estándar. Letras distintas sobre las barras indican que hay diferencias estadísticas entre los tratamientos, p -valor ≤ 0.05

3.5 Infección de plantas que expresan la CP del TMV-Cg con el virus TuMV

Habiendo observado que la proteína de la cápside disminuye la expresión de componentes involucrados en defensa antiviral, se procedió a estudiar si la regulación negativa de la vía de SA contribuye a modular los niveles de acumulación de un virus no relacionado al TMV-Cg, el virus TuMV. Para ello, plantas de la línea CP#72 y plantas no transgénicas (WT-Col 0) fueron tratadas con el inductor y, luego de 48 hs, fueron inoculadas con un extracto del virus TuMV. A los 10 dpi, se analizó por medio de la técnica de ELISA los niveles de acumulación viral en plantas CP#72 inducidas y no inducidas y en plantas no transgénicas tratadas con el inductor MOF y tratadas con agua. En este experimento se observaron mayores niveles de acumulación de la CP de TuMV en las plantas transgénicas de la línea CP#72 tratadas con el inductor con respecto a los

niveles de acumulación de la CP de TuMV en plantas Col-0 salvajes tratadas con el inductor. Por otra parte, al comparar los niveles de acumulación de la proteína CP de TuMV en plantas de la línea CP#72 tratadas con el inductor versus los niveles de acumulación de la CP de TuMV en la línea CP#72 no inducida, se observó un leve incremento de los niveles de acumulación del virus TuMV, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 3.6).

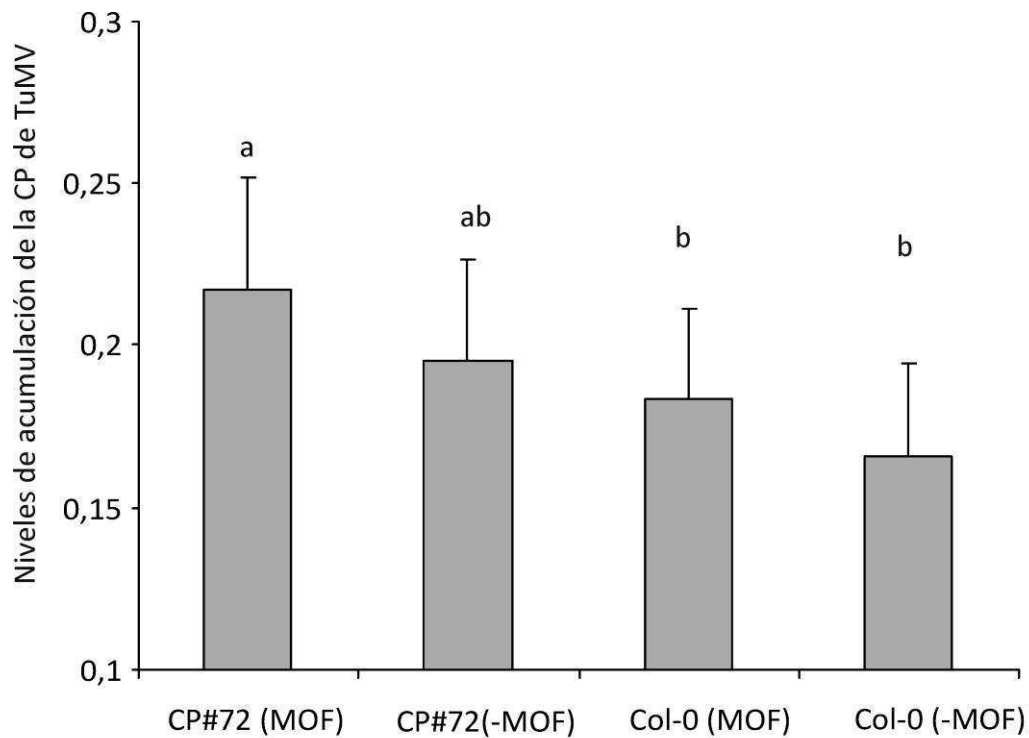


Figura 3.6: Niveles de acumulación de la proteína CP de TuMV en plantas de las líneas CP#72 tratadas con el inductor (MOF) y tratadas con agua (-MOF) y en las plantas salvajes tratadas con MOF y tratadas con agua (-MOF). Letras distintas sobre las barras indican que hay diferencias estadísticas entre los tratamientos, p -valor ≤ 0.05 .

Discusión

En un trabajo previo realizado por nuestro grupo usando plantas transgénicas de tabaco que expresan la proteína de cápside del TMV se observó que esta proteína regulaba negativamente la expresión de genes de defensa pertenecientes a la vía de SA (Conti et al., 2012). En la presente tesis se procedió a analizar, por medio de la técnica de RT-qPCR,

los niveles de expresión de genes de respuesta a SA en plantas de *A. thaliana* transgénicas que expresan la CP del virus TMV-Cg. Tanto en la línea transgénica que expresa la CgCP por medio de un promotor inducible, como en la línea transgénica que expresa la CgCP por medio de un promotor constitutivo, se observó que los niveles de acumulación de los transcritos codificados por los genes *RDR1* y *WRKY70* fueron menores en las plantas que expresan la CgCP respecto de las plantas que no acumulaban esta proteína (plantas control). El transcripto codificado por el gen *AOX1a* sólo mostró una reducción en los niveles de acumulación en las plantas de la línea CP#72 luego de 72 hs de aplicación de MOF (Figura 3.2 A), pero no mostró cambios en los niveles de expresión en la línea CP#71 (Figura 3.2 B). El menor nivel de acumulación del transcripto que codifica para la CgCP en las plantas de la línea CP#71, respecto del nivel de acumulación del transcripto que codifica para la CgCP observado en la línea CP#72, podría explicar las diferencias en los niveles de expresión del gen *AOX1a* en estas dos líneas transgénicas. Alternativamente, podría ocurrir que la CgCP alterase la expresión del gen *AOX1a* de manera transiente y que únicamente se observara cambios en la expresión del gen *AOX1a* en la línea que expresa la CgCP de manera inducible.

El rol del SA en la modulación de la expresión génica durante las infecciones virales compatibles ha sido reportada por varios autores (Huang et al., 2005, Wang et al, 2009). Además, varios trabajos han mostrado que el tratamiento con SA disminuye la susceptibilidad durante las infecciones virales compatibles (Chivasa et al, 1997; Ji and Ding, 2001; Alamillo et al, 2006). En base a estas evidencias, se ha postulado que los virus podrían atenuar la respuesta de defensa mediada por SA interfiriendo con componentes de señalización de esta vía, de un modo similar al efecto que los supresores de silenciamiento tienen sobre la vía de silenciamiento (Wang et al., 2009b)(Huang et al., 2005). Los datos presentados en este capítulo muestran que la expresión de la CgCP modula negativamente la inducción de genes de respuesta a SA, aún luego del tratamiento con esta hormona (Figura 3.4). Dado que los genes dependientes de la vía de SA analizados en este capítulo (*RDR1*, *AOX1a*) codifican para proteínas que han sido reportadas en defensa antiviral (Xie et al., 2001). (Yu et al., 2003c). (Chivasa et al., 1997), la disminución de la expresión de estos genes en plantas transgénicas que expresan la CgCP sugiere que la CgCP incrementaría la susceptibilidad del hospedante frente a la infección producida por el virus TMV-Cg. En esta misma línea, varios estudios han

mostrado que las proteínas virales suprimen la acción de componentes involucrados en vías de defensa mediadas por la hormona SA (Wang et al., 2009; Love et al., 2012). En particular, la proteína P6 del CaMV actúa como un efector de patogenicidad y reduce la expresión de genes de respuesta a SA (Love et al., 2012). De hecho, P6 modifica al factor NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED1 (NPR1) y, en consecuencia, reduce la expresión de genes de SA, pero incrementa la expresión de genes de respuesta a JA. Por otra parte, en un trabajo realizado por Wang et al. donde se analizó el rol del virus TMV sobre la modulación de genes de defensa, se observó que este virus disminuye la expresión de genes de respuesta a SA en tejidos sistémicos infectados, lo que sugiere que el virus TMV codifica para un factor involucrado en la atenuación de la expresión de genes de respuesta a SA (Wang et al., 2009).

Con el objetivo de profundizar la caracterización del rol de la CgCP sobre la vía de señalización de SA, se cuantificaron los niveles de las hormonas SA y JA durante la expresión de la CgCP. Este ensayo mostró que la CgCP reduce la expresión de un conjunto de genes de respuesta a SA, sin producir cambios en los niveles de esta hormona (Figura 3.5). Por otra parte, no se detectaron cambios en los niveles de JA en plantas transgénicas que expresan la CgCP respecto de los niveles detectados en plantas no transgénicas (Figura 3.5). En conjunto, estos resultados muestran que la CgCP altera la vía de SA, sin alterar los niveles de las hormonas SA, ni JA. Además, estos resultados sugieren que la CgCP podría estar modulando negativamente un componente involucrado en la señalización del SA o bien en la modulación de vías hormonales que afecten la sensibilidad de esta hormona.

Finalmente, la caracterización del rol de la CP sobre la vía de defensa antiviral fue completada desafiando a estas plantas con el virus TuMV, un Potyvirus. Como se explicó en el capítulo introductorio, la expresión de la proteína CP confiere resistencia a las plantas frente virus relacionados por medio del mecanismo de resistencia mediado por cápside (CP-MR). Sin embargo, este mecanismo de resistencia no es efectivo frente a virus no relacionados como el TuMV. Por su parte, el virus TuMV fue seleccionado en base a los reportes que muestran que la vía de SA es inducida durante la infección con el virus TuMV (Manacorda et al, 2013). Al infectar las plantas que expresan la CP del TMV-Cg con el virus TuMV se observó un leve incremento de la acumulación viral respecto de plantas no transgénicas infectadas con el virus TuMV (Figura 3.6). El incremento en los

niveles de acumulación del virus TuMV podría ser explicado por efecto de la CgCP en la regulación negativa de componentes implicados en defensa antiviral como RDR1 y AOX1a. Mientras que al comparar los niveles de acumulación de la proteína CP de TuMV en plantas de la línea CP#72 tratadas con el inductor versus los niveles de acumulación de la CP de TuMV en la línea CP#72 no inducida, se observó un leve incremento de los niveles de acumulación del virus TuMV, pero dicho incremento no resultó estadísticamente significativo (Figura 3.6).

En resumen, los experimentos presentados en este capítulo muestran que la CgCP actúa modulando negativamente la vía de señalización mediada por SA, posiblemente por medio de la alteración de un componente implicado en la vía de señalización de SA o bien por medio de la alteración de vías hormonales que afecten la sensibilidad del SA. Además, el efecto de la CgCP sobre la regulación negativa de genes implicados en defensa antiviral sugiere que la proteína CgCP podría contribuir a aumentar la susceptibilidad del hospedante frente a la infección viral.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente capítulo permiten concluir que:

- La expresión de la proteína de cápside modula negativamente la expresión de genes implicados en vías de defensa mediada por la hormona SA.
- La expresión de la proteína de cápside regula negativamente genes involucrados en mecanismos de defensa antiviral, el gen *RDR1* y *AOX1A*.
- La expresión de la proteína de cápside no altera los niveles de las hormonas SA, ni JA.

CAPÍTULO 4: CARACTERIZACIÓN GLOBAL DEL EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE LA CGCP SOBRE LA MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL HOSPEDANTE *A. THALIANA*

Introducción

El empleo de microarreglos es una valiosa herramienta que ha permitido analizar los cambios de expresión génica que tienen lugar durante la interacción hospedante-patógeno en plantas de un modo global (Wise et al., 2007). Existen diversas estrategias empleadas para el estudio de los perfiles de expresión génica en respuesta a la infección viral (Maule et al., 2002). Algunas de las estrategias empleadas se basan en el estudio de la alteración de la expresión génica producida por virus salvajes, entre ellas se encuentran los perfiles de expresión génica de plantas infectadas con los virus TMV, TMV-Cg, RDV (Golem and Culver, 2003)(Espinoza et al., 2007) (Sato et al., 2011), entre otros. Por otra parte, esta técnica también ha servido para caracterizar el impacto de proteínas virales individuales sobre la expresión génica del hospedante (Conti et al., 2012)(Lozano-Durán et al., 2011).

En el presente capítulo, se procedió a analizar los datos de un microarreglo realizado en una planta transgénica de *Arabidopsis thaliana* que codifica la proteína de la cápside del virus TMV-Cg regulada por un promotor inducible (Koo et al., 2004), con el objetivo de estudiar el efecto de la CP sobre la modulación de la expresión génica y, en particular, de las vías involucradas en respuestas de defensa.

En los últimos años han surgido varias herramientas bioinformáticas que permiten analizar la información provista por experimentos de microarreglos y construir redes de genes co-expresados. Existen distintas herramientas de análisis, como por ejemplo ATTED II, CressExpress, GeneCAT, las cuales permiten ingresar uno o varios genes de interés a partir de los cuales generan una red de co-expresión (Usadel et al., 2009). En general, estas redes son construidas a partir de ensayos de microarreglos realizados bajo condiciones diversas, este modo de análisis es llamado “condición independiente”. Otros

análisis pueden realizarse a partir de ensayos de microarreglos realizados bajo condiciones similares, en dicho caso el análisis es denominado “condición dependiente”. La información obtenida por medio de estas herramientas suele ser complementada con otros análisis que permiten reducir el número de genes de interés y aportar información sobre la función/ regulación de estos genes (Wise et al., 2007). En particular, el estudio de los elementos regulatorios presentes en la región promotora permite generar hipótesis sobre la regulación de los genes co-expresados.

A continuación se presentan los resultados del análisis de un microarreglo realizado en plantas que expresan la CgCP bajo un promotor inducible. Dicho análisis fue completado por medio de las herramientas bioinformáticas anteriormente descritas. Los genes seleccionados a partir de estos análisis fueron validados experimentalmente en las plantas que expresan la proteína CgCP, por medio de la técnica de PCR en tiempo real. Por último, se estudio la expresión de estos mismos genes durante el desarrollo de la infección con el virus TMV-Cg.

Resultados

4.1 Análisis biológico de los datos obtenidos por medio de un perfil de expresión realizado en una línea transgénica de *Arabidopsis thaliana* que expresa CP de TMV-Cg bajo un promotor inducible.

Con el objetivo de profundizar el estudio del rol de la CgCP en la modulación de expresión génica, se procedió a analizar los datos de un perfil de expresión desarrollado en una línea transgénica de *Arabidopsis thaliana* que expresa a la proteína de cápside del virus TMV-Cg bajo un promotor inducible. Para la realización de este ensayo, plantas transgénicas de la línea CP#72 fueron crecidas en tierra bajo un fotoperíodo de día largo y regadas con el inductor en un estadio previo a la floración (estadio 1.08). Las muestras fueron tomadas a las 48 hs post inducción dado que a este tiempo la acumulación de la CP alcanza un máximo (Ver Figura 3.1). Para el análisis de expresión se empleó un microarreglo ATH1 provisto por Affymetrix. Este microarreglo contiene más de 22.500 sondas, que representan aproximadamente 23.750 genes (Redman et al, 2004). Las secuencias empleadas en este array están basadas en la información provista por el proyecto internacional de secuenciación de Arabidopsis. La realización del ensayo de

hibridación del microarreglo y su análisis estadístico fue realizado por el Dr Sebastian Asurmendi en el laboratorio del Dr. Roger Beachy (DDPSC, USA). El análisis del perfil de expresión mostró que 296 genes incrementan su expresión en las plantas CP#72 al ser tratadas con MOF, respecto de las plantas CP#72 tratadas con agua a las 48hs luego del tratamiento. Por otra parte, se observó una reducción en los niveles de 145 transcritos en las plantas que expresan la CgCP, respecto de plantas que de la línea CP#72 tratadas con agua.

Posteriormente se procedió al análisis biológico de los datos obtenidos por medio del microarreglo. Para ello, se emplearon herramientas bioinformáticas que permiten realizar análisis de enriquecimiento. Los análisis de enriquecimiento suponen que si un proceso biológico está alterado en la situación de estudio, los genes que funcionan conjuntamente en dicho proceso biológico tienen una mayor probabilidad de estar enriquecidos dentro de la lista de genes generada a partir del microarreglo. Por medio del análisis de enriquecimiento realizado con el programa GOEAST (<http://omicslab.genetics.ac.cn/GOEAST/tools.php>) se determinaron las categorías GO (Gene Ontology) que están sobre-representadas en el conjunto de genes cuya expresión se incrementa por efecto de la CgCP. Este análisis mostró que las plantas que expresan la CgCP acumulan mayores niveles de transcritos involucrados en respuestas a estrés, en particular de genes involucrados en estrés de sequía y de respuesta a compuestos químicos inorgánicos. Por otro lado, las plantas que expresan la CgCP también acumularon mayores niveles de transcritos involucrados en proceso biosintético de oxilipinas, lípidos y carbohidratos. Interesantemente, se encontró que genes de respuesta al ácido jasmónico representan otra de las categorías sobre-representadas dentro del conjunto de genes cuya expresión se incrementa durante la expresión de la CgCP (Ver Tabla 4.1).

GOID	Proceso biológico	Número de genes presentes en la lista	Número de genes presente en el microarreglo	<u>Resultado del análisis estadístico (valor p)</u>
GO:0016758	Actividad transferasa,	20	387	0.000112
GO:0009414	Respuesta a falta de agua	14	195	0.00015

GO:1901576	Biosíntesis de compuestos orgánicos	55	2102	0.000184
GO:0016053	Biosíntesis de ácidos orgánicos	21	476	0.000501
GO:0046394	Biosíntesis de ácido carboxílicos	21	476	0.000501
GO:0005975	Proceso de metabolismo de carbohidratos	30	873	0.000513
GO:0006950	Respuesta a estrés	53	2121	0.000925
GO:0009269	Respuesta a sequía	5	19	0.00116
GO:0031407	Proceso metabólico de oxilipinas	5	21	0.00193
GO:0016051	Biosíntesis de carbohidratos	13	228	0.00301
GO:0006631	Proceso metabólico de ácidos grasos	12	203	0.00429
GO:0046527	Actividad glucosil-transferasa	10	141	0.00454
GO:0006629	Proceso metabólico de lípidos	25	751	0.00502
GO:0008610	Biosíntesis de lípidos	17	410	0.00718
GO:0009753	Respuesta a ácido jasmónico	10	154	0.0082
GO:0044550	Proceso de metabolismo secundario	15	164	3.84e-6
GO:0016491	Actividad oxido-reductasa	49	1407	3.84e-7
GO:1901700	Respuesta a compuestos que contienen oxígeno	35	992	5.66e-5
GO:0009699	Biosíntesis de fenil-propanoide	12	125	5.66e-5
GO:0044281	Proceso de metabolismo de moléculas pequeñas	45	1247	6.72e-7
GO:0010035	Respuesta a sustancias inorgánicas	29	742	9.1e-5

Tabla 4.1: Clasificación de los genes (según la categoría GO sobre-representada) incrementados a las 48 hs post expresión de la CPde TMV-Cg. Las categorías con un P valor $\leq 0,01$ son aquellas que están sobre-representadas dentro del grupo de genes cuya expresión se incrementa por efecto de la CgCP.

El análisis de enriquecimiento también se empleó para estudiar los genes cuya expresión se disminuye durante la expresión de la CgCP. Al analizar las categorías GO sobre-representadas, se observó que un grupo de genes pertenecientes a la categoría de defensa se encuentra sobre-representados dentro del grupo de genes cuya expresión disminuye por efecto de la CP. Las categorías correspondientes a vías de señalización de

hormonas y de respuesta a cambios en la intensidad de luz también están sobre-representadas en el grupo de genes cuya expresión se disminuye por efecto de la CP. (Ver Tabla 4.2).

GOID	Proceso biológico	Número de genes presentes en la lista (q)	Número de genes presente en el microarreglo	Resultado del análisis estadístico (valor p)
GO:0006952	respuesta de defensa	18	758	0.00059
GO:1901698	respuesta a nitrógeno	9	176	0.000659
GO:0009646	respuesta a ausencia de luz	4	15	0.000659
GO:0009642	respuesta a intensidad de luz	6	80	0.00362
GO:0006979	respuesta a estrés oxidativo	10	309	0.00817
GO:0009755	Vías de señalización mediadas por hormonas	12	458	0.00911
GO:0009628	respuesta a estímulos abióticos	21	1247	0.0094
GO:0009611	respuesta a daño mecánico	10	145	1.54e-5
GO:0042221	respuesta a estímulos químicos	35	1826	1.73e-6
GO:0010033	respuesta a sustancias orgánicas	32	1167	1.96e-9
GO:0009607	respuesta a estímulos bióticos	20	626	1.99e-6
GO:0050832	Respuesta de defensa frente a hongos	13	158	2.08e-8
GO:0006950	Respuesta a estrés	48	2121	2.14e-12
GO:0051707	Respuesta a otros organismos	19	581	3.2e-6
GO:1901700	Respuesta a compuestos que contienen oxígeno	23	992	3.3e-5
GO:0010200	Respuesta a quitina	9	120	3.3e-5
GO:0009725	Respuesta a hormonas	24	944	3.52e-6

Tabla 4.2: Clasificación de los genes (según categoría GO sobre-representada) disminuidos a las 48 hs post expresión de la Cp de TMV-Cg. Las categorías con un P valor $\leq 0,01$ son aquellas que están sobre-representadas dentro del grupo de genes cuya expresión disminuye por efecto de la CgCP.

Seguidamente se procedió a seleccionar un conjunto de genes, pertenecientes a las categorías que se encuentran sobre-representadas, para su posterior análisis por medio de la técnica de RT-qPCR en tiempo real. Los genes que codifican proteínas involucradas en vías de señalización resultaron de particular interés ya que la alteración de la expresión génica de estos genes podría revelar el mecanismo o los mecanismos implicados en la modulación de vías de defensa mediada por SA analizada en el capítulo previo. Por ejemplo, dentro del grupo de genes cuya expresión es incrementada por la CgCP, se seleccionaron genes de respuesta a JA, genes cuya expresión es alterada por efecto de las proteínas DELLAs (reguladores negativos de la vía del ácido giberélico), genes de respuesta a ácido absicico (ABA), entre otros. Mientras que para el estudio de los genes cuya expresión es disminuída por la CgCP, se seleccionó un grupo amplio de genes involucrados en vías de defensa innata. Interesantemente, al analizar la categoría de genes de defensa cuya expresión es disminuída por efecto de la CgCP, fue posible hallar al gen *WRKY70* (caracterizado en el capítulo previo), sin embargo los genes *RDR1* y *AOX1a* no se encontraron presentes dentro del grupo de genes surgidos por medio del análisis del microarreglo. En las Tablas 4.3 y 4.4 se resumen los genes candidatos seleccionados para su posterior validación.

Clasificación	Locus	Gen	Proceso biológico
Genes implicados en biosíntesis o respondedores de jasmónico	At1g55020	LOX1	Gen implicado en la biosíntesis de Jasmónico Implicado en respuesta de defensa contra bacterias
	At3g45140	LOX2	Respuesta a Jasmonico y respuesta heridas
	At1g19640	JMT	biosíntesis de Metil jasmónico
Regulados por proteínas DELLAs	At5g50915	Basic helix-loop-helix (bHLH)	Su expresión se incrementa por efecto de las proteínas DELLAs
	At4g36410	UBC17	Involucrado en procesos dependientes de ubiquitina Su expresión se incrementa por efecto de las proteínas

			DELLAs
Genes respondedores o reguladores de la vía de ABA	At5g57050	ABI2	Regulador negativo de la vía de ABA
	At5g59320	LTP3	Respuesta a estímulo por ABA
Factores de transcripción con dominio NAC	At1g01720	ATAF1	Regulador negativo de la vía de ABA, regulador negativo de defensas
	At3g10500	ANAC053	Regulación de la transcripción
Genes de respuesta a estrés abióticos	At1g07350		Respuesta a estrés de calor y alta intensidad de luz
	At2g40970	MYBC1	Respuesta a frío
	At1g01250	ERF/AP2	Respuesta a frío
Genes de involucrados en defensa	At5g46910		Regulación de la transcripción, respuesta a quitina
	At5g23820	MRO11.14	Proteína que contiene un dominio de reconocimiento de lípidos
	At4g39800	MIPS1	
Otros genes	At3g60530	GATA4	Involucrado en respuesta a luz
	AT1G02205	CER1	Involucrado en la síntesis de ceras de la cutícula
	At5g15230	GASA4	Homeostasis redox, Respuesta a giberelina
	At4g23690	RDP	Síntesis de ligninas

Tabla 4.3: Selección de genes candidatos cuya expresión se incrementa a las 48 hs post expresión de la CP de TMV-Cg. La información sobre el proceso biológico en el cual participa el gen fue tomada del sitio TAIR (*The Arabidopsis information Resource*, www.arabidopsis.org)

Clasificación	Locus	Gen	Proceso biológico
	AT2G30250	WRKY25	Implicado en respuesta a estrés salino
	AT3G56400	WRKY70	Activador de la respuesta mediada por SA y regulador negativo de la respuesta mediada por JA

Genes involucrados en vías de defensa	AT2G38470	WRKY33	Respuesta de defensa a bacterias y a varios estreses abióticos, en especial estrés salino
	At1g72920	TIR-NBS	Respuesta innata
	AT5G26920	CBP 60 g	Respuesta de defensa a bacterias, biosíntesis de SA
	AT3G45640	MPK3	Respuesta a patógenos
	At5g06600	UBP12	Regulador negativo de inmunidad
Otros genes	At4g39400	BRI1	Involucrado en la señalización de brassinosteroides
	At4g35770	SEN1	Gen asociado a la senescencia
	At1g80920	ATJ8	Proteína encontrada en los cloroplastos. Es regulada negativamente por la luz.
	AT5G20250	DIN10	Los niveles de expresión de este gen son regulados por los niveles de azúcares

Tabla 4.4: Selección de genes candidatos cuya expresión se disminuye a las 48 hs post expresión de la CP de TMV-Cg. La información sobre el proceso biológico en el cual participa el gen fue tomada del sitio TAIR (*The Arabidopsis information Resource*, www.arabidopsis.org)

4.2 Análisis de los niveles de expresión de los genes candidatos mediante RT-qPCR en una línea transgénica de *Arabidopsis thaliana* que expresa CP de TMV-Cg bajo un promotor inducible

A fin de validar los datos de expresión obtenidos tras el análisis del microarreglo, se procedió a cuantificar por medio de RT-qPCR los genes previamente seleccionados. La expresión relativa de treinta transcritos fue cuantificada en la línea CP#72 tratada con el inductor con respecto a esta misma línea transgénica tratada con agua. El gen que

codifica para ubiquitina fue usado como gen de referencia siguiendo las reglas MIQE que establecen los criterios más adecuados para el uso de la técnica de qPCR (Ver apéndices A y B).

La validación fue realizada en muestras tomadas de un ensayo independiente realizado en plantas crecidas en condiciones similares a las empleadas para la confección del microarreglo. De los 30 genes analizados, 21 mostraron cambios estadísticamente significativos respecto del control. Por lo tanto, mediante la técnica de RT-qPCR se pudo confirmar un 70% de los cambios de expresión observados por medio del análisis del microarreglo. En la Figura 4.1 se muestran el nivel de expresión de los genes cuyo cambio de expresión resultó estadísticamente significativo por medio de la técnica de RT-qPCR.

A grandes rasgos, se observa que la proteína CgCP altera la expresión de genes que responden a hormonas involucradas en vías de estrés, como por ejemplo el JA y el ABA. En particular, se observó que la expresión de la CgCP incrementa la expresión de un grupo de genes involucrados en la respuesta frente a estreses abióticos. Por ejemplo, SR45a tiene un rol reportado frente al estrés producido por la alta intensidad de luz (Yoshimura et al., 2011), mientras que los factores ATAF1 y ANAC053 juegan un rol en estrés producido por sequía (Wu et al. 2009) (Lee et al., 2012). Finalmente, se ha reportado que el gen MYBC1 incrementa su expresión frente al estrés por frío (Zhai et al., 2010). Por otra parte, dos genes cuya expresión es incrementada por efecto de la CgCP (*UBC17* y un gen que codifica para un factor de transcripción tipo bHLH) son regulados por las proteínas DELLAs (Zentella et al., 2007a). Estas proteínas han sido involucradas en la regulación de una amplia variedad de vías de señalización y son factores claves para la regulación del crecimiento (Claeys et al., 2014).

Por otra parte, un conjunto amplio de los genes cuya expresión se disminuye durante la expresión de la CgCP participan de vías de señalización activadas durante las respuestas de defensa frente a patógenos microbianos. Por ejemplo, el gen *CBP60g* está involucrado en el mecanismo de defensa frente a *P. syringae* (Wang et al., 2009). Este gen codifica para una proteína de unión a calmodulina y posee un rol en la acumulación de SA (Zhang et al., 2010). Por otro lado, el gen *MPK3* codifica para una MAPK activada durante las infecciones producidas por patógenos (Li et al., 2012). Mientras que *WRKY33* y *WRKY25* codifican para dos factores de transcripción involucrados en respuesta a la hormona SA (Lippok et al., 2007) (Zheng et al., 2007). Por último, como ya se indicó en el capítulo

previo, el gen *WRKY70* codifica para una proteína involucrada en la modulación positiva de la vía de SA y negativa de JA (Jing et al., 2006).

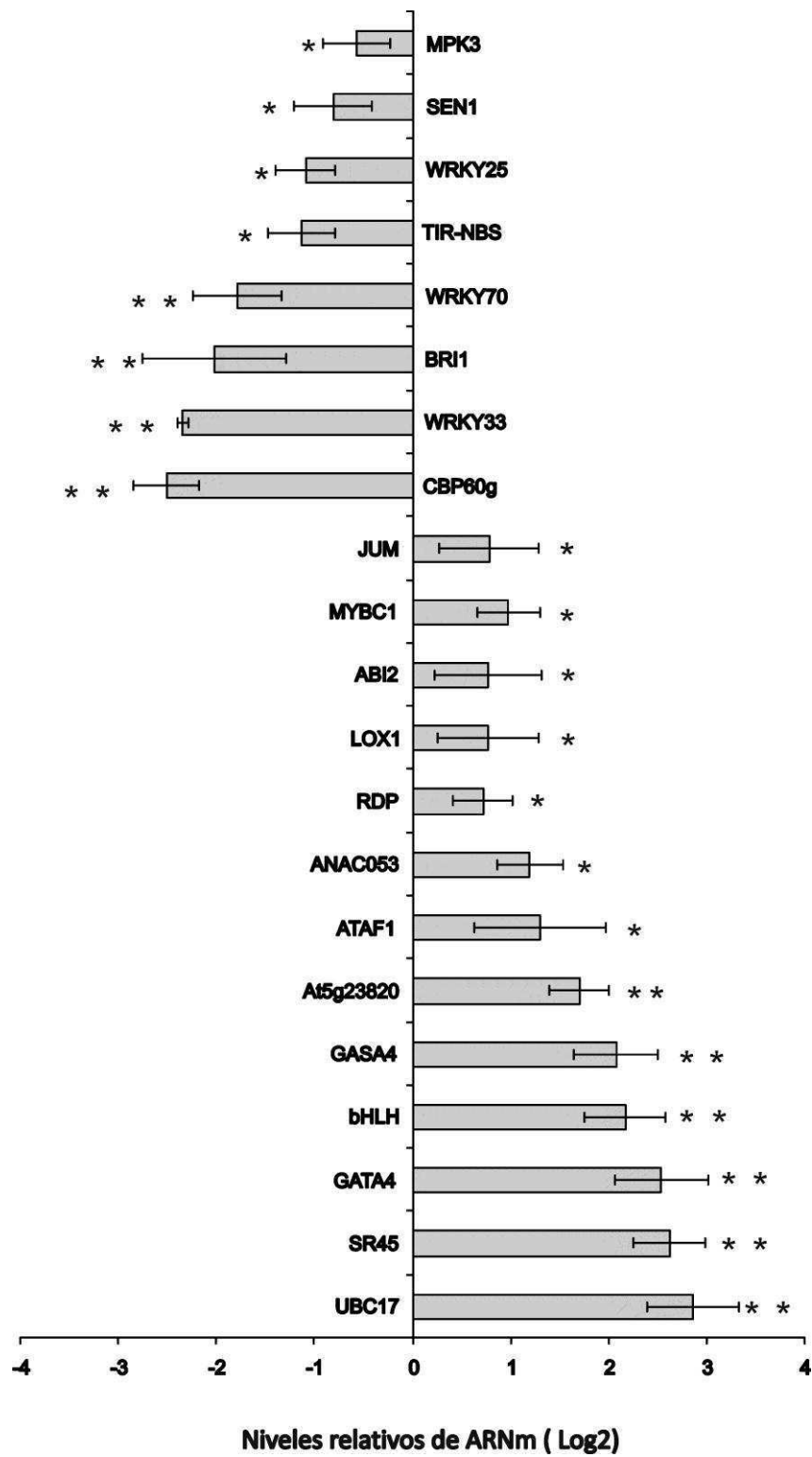


Figura 4.1: Validación de los datos de expresión relativa obtenidos en el microarreglo por medio de la técnica RT-qPCR. Las barras indican los niveles de expresión diferencial (\log_2) de genes entre las líneas CP#72 inducida y no inducida correspondientes a transcritos que pudieron ser validados y mostraron cambios estadísticamente significativos con un p valor $\leq 0,05$. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$). Se utilizó como control interno el gen de referencia *UBI5*.

En paralelo, se analizaron los cambios de expresión en plantas Col-0 tratadas con el inductor y plantas sin tratar para descartar que el tratamiento con el inductor fuera el responsable de los cambios observados. Con excepción del gen *BRI1*, los genes analizados no mostraron cambios significativos en su expresión en las plantas salvajes Col-0 tratadas con el inductor respecto de las no tratadas (Figura 4.2). Por otra parte, el gen *BRI1* mostró una leve reducción en sus niveles de expresión (con un p valor cercano a 0,05) en las plantas salvajes tratadas con el inductor, respecto de las plantas no tratadas. Este ensayo permitió concluir que el MOF no es el responsable del cambio de expresión observado en las plantas CP72 inducidas para la mayoría de los genes analizados. Si bien no puede descartarse que MOF tenga un efecto en la alteración de la expresión del gen *BRI1*, es importante remarcar que el cambio de expresión observado en las plantas salvajes tratadas con el inductor respecto de las plantas salvajes no tratadas es considerablemente menor que el cambio de expresión de *BRI1* observado en las plantas CP72 tratadas con el inductor versus las CP72 no tratadas con el inductor.

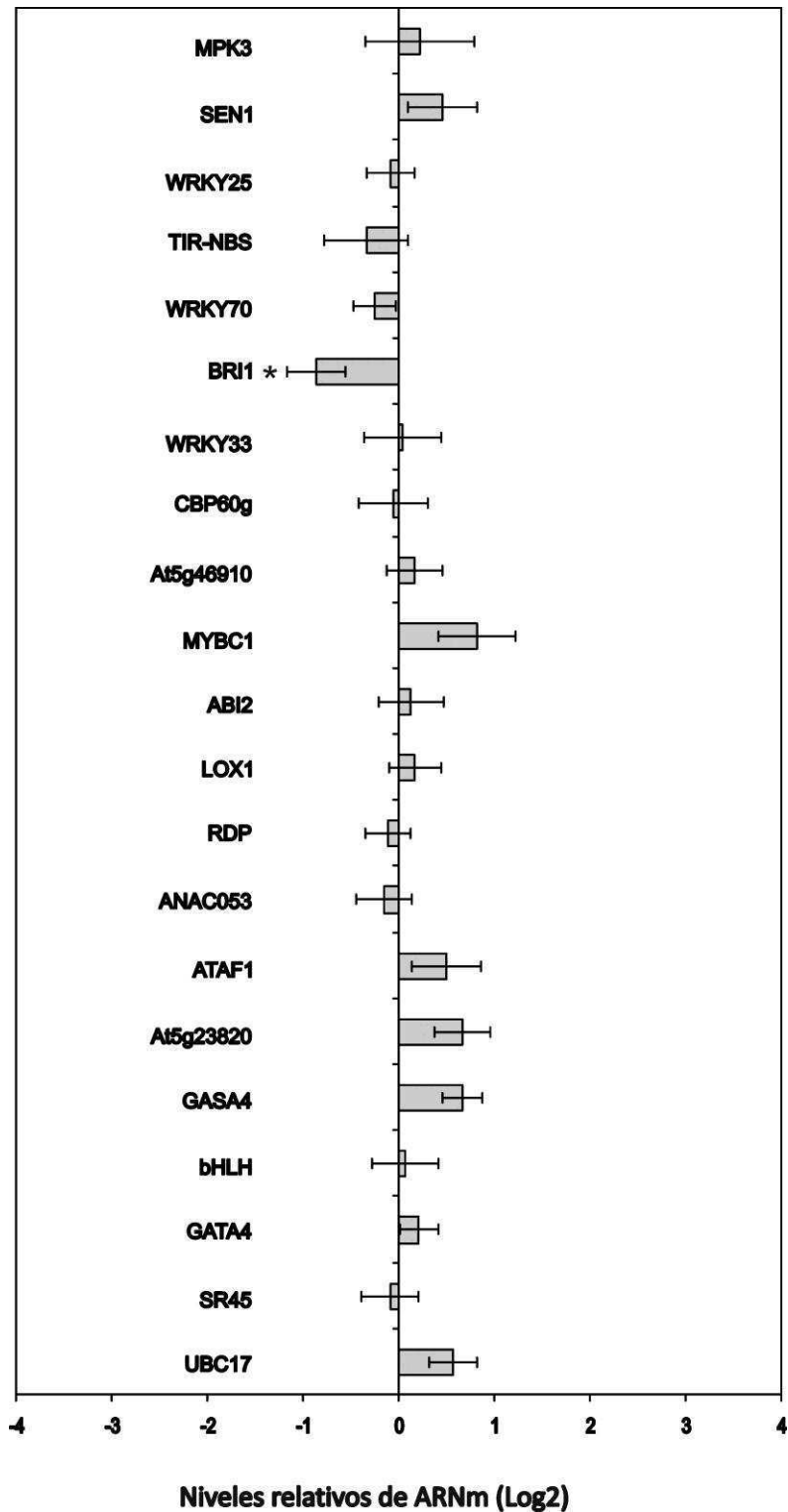


Figura 4.2: Estudio del efecto del inductor sobre la expresión de los genes alterados por la CgCP por medio de la técnica RT-qPCR. Las barras indican los niveles de expresión diferencial (log2) de genes en las plantas salvajes tratadas con el inductor y en las plantas salvajes tratadas con agua. Los asteriscos indican diferencias significativas (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$). Se utilizó como control interno el gen de referencia *UBIQ5*

4.3 Empleo de herramientas bioinformáticas para la caracterización de genes implicados en vías de defensa cuya expresión disminuye por efecto de la CgCP

A continuación, se procedió a analizar el conjunto de genes involucrados en vías de defensa cuya expresión es regulada negativamente por la CgCP con el objetivo de estudiar si estos genes integran una vía de señalización común. Dado que los procesos biológicos son típicamente desarrollados por un grupo de genes y no por un único gen, se procedió en primera instancia a realizar un análisis de co-expresión. Los análisis de co-expresión permiten encontrar genes que tienen patrones de expresión similares al gen o a los genes de interés por medio del uso de la información generada a partir de experimentos de microarreglos. Además, este estudio permite identificar módulos de co-expresión integrados por genes con funciones similares a los genes bajo estudio y que tienen una alta probabilidad de ser regulados de forma conjunta (Usadel et al., 2009) (Aoki et al., 2007). Este análisis fue complementado con el estudio de elementos regulatorios presentes en las regiones promotoras del grupo de genes co-expresados con el objetivo de caracterizar motivos que puedan explicar la expresión coordinada del set de genes. En la Figura 4.3 se resumen los pasos seguidos para el estudio de los genes que están involucrados en vías de defensa y cuya expresión es regulada negativamente por la CgCP. La metodología seguida para el análisis bioinformático se detalla en la sección de Materiales y Métodos.

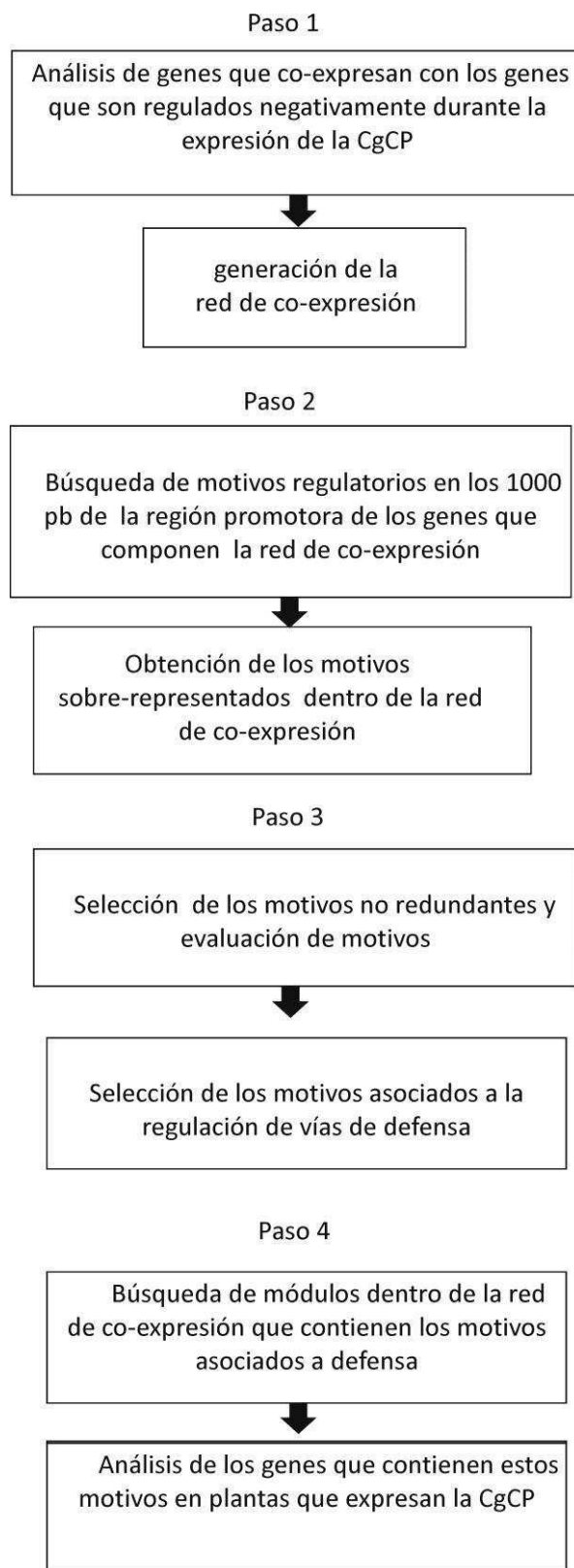


Figura4.3: Procedimiento empleado para el estudio por medio de herramientas bioinformáticas de los genes involucrados en vías de defensa cuya expresión es disminuída durante la expresión de la CgCP.

4.3.1 Generación de una red de coexpresión integrada por genes implicados en defensa cuya expresión disminuye durante la acumulación de la CgCP

Para la generación de la red de co-expresión, se procedió a seleccionar aquellos genes que tienen un rol reportado en defensa y cuya expresión se reduce luego de la inducción de la CgCP. Los genes seleccionados fueron: *CBP60g*, *WRKY70*, *WRKY33*, *WRKY25*, *MPK3*, *At1g72920*, *RDR1* y *AOX1a*. Los primeros seis genes surgieron del análisis del microarreglo, mientras que los genes *RDR1* y *AOX1a* fueron seleccionados a partir del estudio realizado en el capítulo tercero.

Seguidamente, se procedió a realizar el análisis de co-expresión. Existen varios programas que permiten realizar análisis de co-expresión (Usadel et al., 2009). El programa ATTED-II, en particular, permite visualizar en forma de redes los datos obtenidos del análisis de co-expresión (Obayashi et al., 2009). Dichas redes están compuestas por nodos, que representan a los genes y por líneas que unen a dichos nodos, que representan a los coeficientes o rangos de co-expresión. Esta última forma de representar los datos permite identificar visualmente, dentro de la red, módulos de genes altamente conectados asociados a un dado proceso biológico. En base a estas consideraciones, se procedió a realizar el análisis de co-expresión por medio del programa ATTED-II.

Mediante este análisis se encontró que 7 de los 8 genes validados por medio de la técnica de PCR en tiempo real integran una red de co-expresión formada por 94 genes (Ver Figura 4.4 y apéndice: Lista de genes co-expresados). En la Figura 4.4 se muestra la red de co-expresión y se indica en rojo a los genes *CBP60g*, *WRKY70*, *WRKY33*, *WRKY25*, *MPK3*, *At1g72920*, y *AOX1a*.

El análisis del rol de los genes que forman la red muestra que la misma está integrada por una gran cantidad de genes implicados en respuesta de defensa frente a patógenos, entre los cuales se encuentran genes que codifican para los factores de transcripción pertenecientes a la familia WRKY, factores de transcripción con dominio AP2/ERF y varias quinasas. Entre los genes que codifican para factores de transcripción pertenecientes a la familia WRKY, se encuentran los genes *WRKY70*, *WRKY33*, *WRK25*, *WRKY40* y *WRKY46*. Interesantemente, el factor de transcripción *WRKY46* ha sido caracterizado por tener un rol en la inducción de la síntesis de la hormona SA (van Verk et al., 2011). Por otra parte,

la red también está integrada por los genes que codifican para factores de transcripción con dominio AP2/ ERF: ERF6, ERF5, ERF105 y ERF104. En particular, el gen *ERF104* ha sido implicado en la modulación de vía de defensa frente al virus TMV-Cg (Chen et al., 2013). En este módulo también están presentes genes que codifican para proteínas con dominio TIR (Toll Interleukin Resistance). Recientemente se ha reportado que los transcritos codificados por los genes At1g72900 y AT1g72940, incrementan sus niveles luego del tratamiento con la hormona SA (Nandety et al., 2013). En resumen, el análisis de co-expresión realizado por medio del programa ATTED-II posibilitó la identificación de genes implicados en vías de defensa cuya expresión tiene una alta probabilidad de estar alterada en las plantas que expresan la CgCP (Usadel et al., 2009) (Aoki et al., 2007).

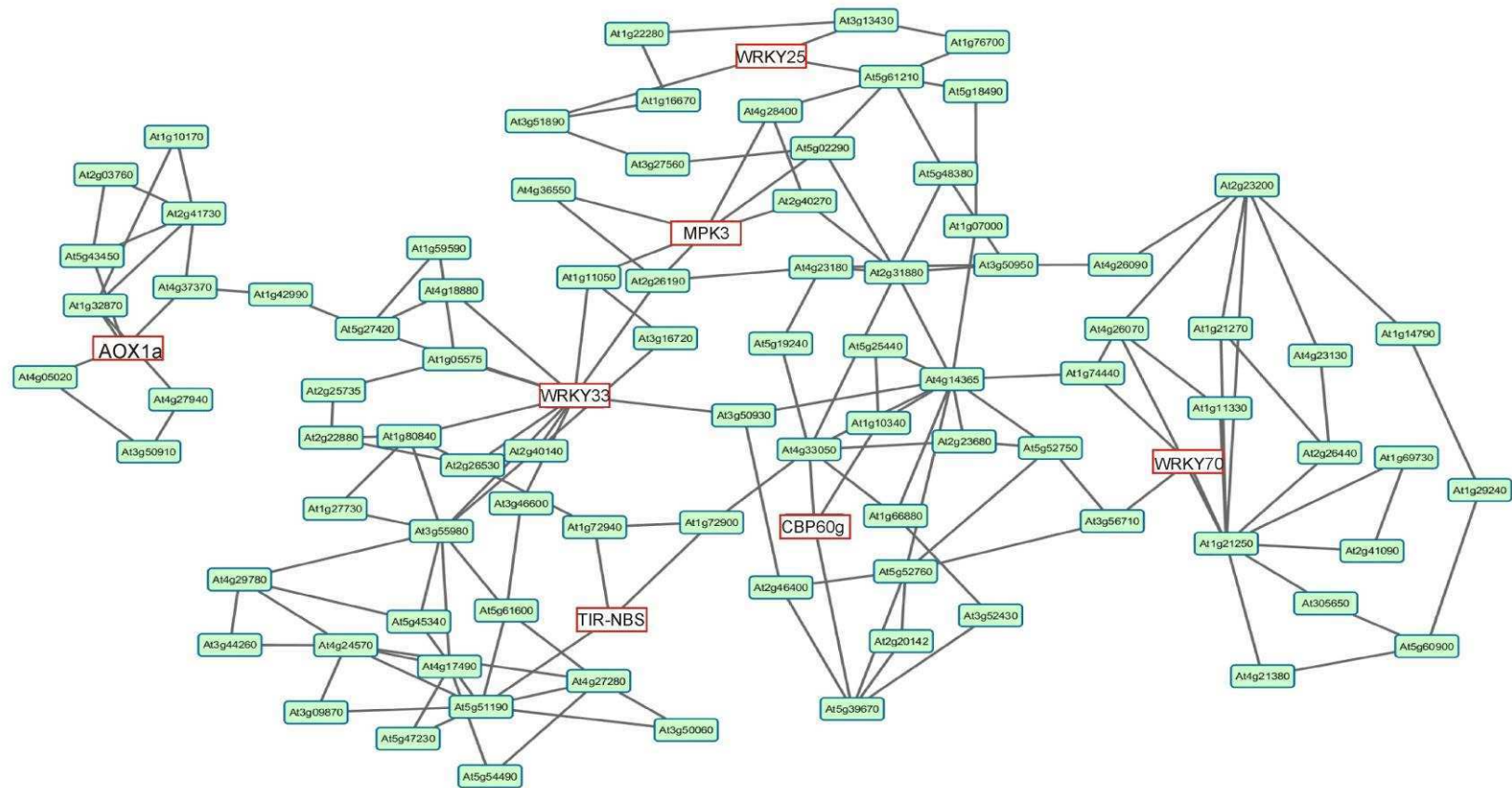


Figura 4.4: Red de co-expresión obtenida por medio del programa ATTED-II. En rojo se indican los genes CBP60g, WRKY70, WRKY33, WRKY25, MPK3, At1g72920, y AOX1a a partir de los cuales se contruyó la red.

4.3.2 Búsqueda de motivos regulatorios sobre-representados en las regiones promotoras de los genes involucrados en la red de co-expresión

Con el objetivo de caracterizar si la expresión de los genes co-expresados está siendo regulada de manera conjunta, se procedió a analizar la presencia de motivos regulatorios sobre-representados en las regiones promotoras en los 94 genes que integran la red de co-expresión con respecto de un grupo de secuencias control no relacionadas. A grandes rasgos este análisis supone que la probabilidad de encontrar motivos regulatorios en un conjunto de genes co-expresados es mayor que la de encontrar dichos motivos en genes no relacionados (set de secuencias control). La metodología seguida para la búsqueda de motivos se detalla en la sección de Materiales y métodos.

Por medio de este análisis se encontraron 9 motivos no redundantes, de los cuales 8 poseen similitud con motivos previamente caracterizados (Tabla 4.5). Dos de estos motivos, ATL1SAR y W-BOXATNPR1, han sido previamente hallados en zonas regulatorias de genes que participan de vías de defensa. El motivo TL1ATSAR está presente en la región promotora de genes regulados por NPR1, un factor clave en la vía de señalización de la hormona SA (Wang et al., 2005). Mientras que el motivo W-BOXATNPR1 está presente en la región promotora del gen NPR1 y es reconocido por factores de transcripción pertenecientes a la familia WRKY (Yu et al, 2001). Entre los restantes motivos que están presentes en las secuencias promotoras de los genes co-expresados, se encuentran un motivo de respuesta a sacarosa (SURE1STPAT21), un motivo de respuesta a azúcares (SBOXATRBCS), un motivo de respuesta a auxinas(CCTCGTGTCTCGMGH3) y un motivo presente en el promotor del gen que codifica para PHYA (PE3PASPHYA3) (Tabla 4.5). Tanto la vía de señalización mediada por auxinas, como la señalización mediada por azúcares han sido asociadas a respuestas de defensa (Kazan and Manners, 2009; Moghaddam and Van den Ende, 2013), aunque sus roles sobre estas vías de defensa y estrés no están aún completamente caracterizados.


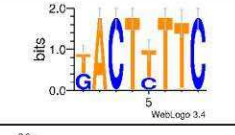
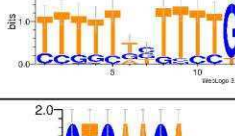
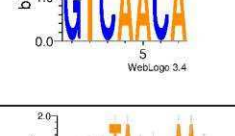
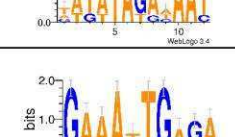
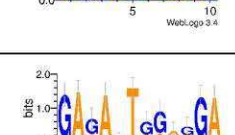
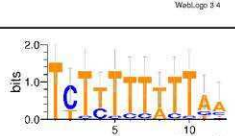
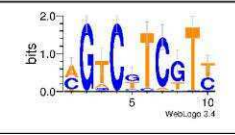
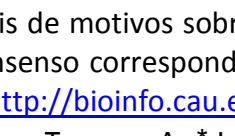
Número de veces que el motivo esta presente en el set de secuencias	Motivo encontrado dentro del set de secuencias	Secuencia consenso en bases de datos	Denominación del motivo en bases de datos	Descripción *
53		GACTTCTTCTT	TL1ATSAR	Motivo sobre - representado en 13 genes respondedores de NPR1
40		ACATTTC A	EMHVCHORD	Motivo encontrado en el gen c -hordein de cebada
53		CAGCTCCCATGGCTC TCCCATCCGCGCCG T	PE3ASPHYA3	Motivo encontrado en el promotor de PHYA
26		GTCAA	WBOXATNPR1	Motivo W -Box encontrado en la secuencia promotora de NPR1
36		AATAGAAAA	SURE1STPAT21	Elemento de respuesta a sacarosa
58		GAAWTTGTGA	5659BOXLELA T5659	Motivo presente e los genes LAT56 y LAT59 de tomate
46		CCTCGTGTCTC	CCTCGTGTCTC GMGH3	Motivo que confiere respuesta a auxinas
14		CACCTCCA	SBOXATRBCS	Motivo de respuesta a azucres y a ABA
53		Motivo desconocido	Motivo desconocido	Motivo desconocido

Tabla 4.5: Análisis de motivos sobre-representados en el grupo de genes co-expresados. La secuencia consenso corresponden a la secuencia consenso depositada en la base de datos ProFITS (<http://bioinfo.cau.edu.cn>). La letra W indica que en esa posición puede estar presente una T o una A. * La descripción corresponde a la descripción hallada en ProFITS.

4.3.3 Identificación de un módulo de co-expresión integrado por genes que poseen los motivos TL1ATSAR y W-BOX en su secuencia promotora

El hallazgo de los motivos TL1ATSAR y W-BOXATNPR1 (dos motivos implicados en vías de defensa) en las secuencias promotoras de un grupo amplio de los 94 genes analizados, sugiere que una parte de los genes que integran la red de co-expresión podría estar siendo regulada por el factor NPR1 y por factores de la familia de transcripción WRKY, los cuales han sido descritos en la modulación de vías de defensa.

Para determinar el grupo de genes posiblemente regulados por NPR1 y por factores de transcripción pertenecientes a la familia W-BOX, se procedió a buscar genes que presentaran en sus promotores los motivos TL1ATSAR y/o W-BOX NPR1 y que se encontraran cercanamente conectados dentro de la red (lo que indica una mayor probabilidad de que su expresión esté regulada de manera conjunta). Por medio de este análisis se encontró un modulo formado por 26 genes, 20 de los cuales tienen presentes los motivos TL1ATSAR y/o el motivo W-BOXATNPR1 en sus regiones promotoras. Además, se observó que los genes que integran el modulo se encuentran altamente conectados lo que indica que su expresión estaría altamente coordinada (Figura 4.5).

En la Figura 4.5 se muestra el modulo integrado por los genes que poseen el motivo TL1ATSAR (indicados en rojo), el motivo W-BOXATNPR1 (indicado en verde) o ambos motivos (genes indicados en azul). Como puede observarse, la mayor parte de los genes presentan el motivo TL1ATSAR (16 genes), mientras que el motivo W-BOXATNPR1 está presente en 8 genes.

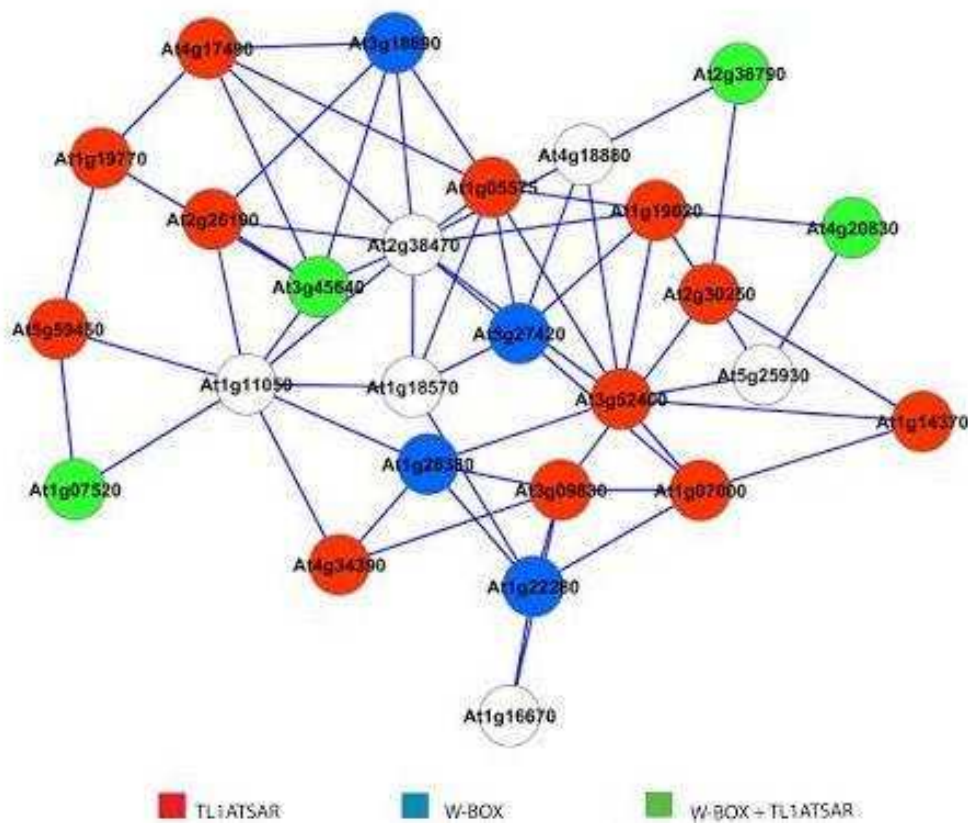


Figura 4.5: Modulo de co-expresión formado por genes que presentan en sus regiones promotoras el motivo TL1ATSAR o/y W-BOXNPR1. Los genes en rojo presentan el motivo TL1ATSAR, los azules el motivo W-BOXNPR1 y los genes en verde ambos motivos.

En la Tabla 4.6 se describe el rol de los genes que integran el modulo de co-expresión. Los colores de los genes indican la presencia de los motivos TL1ATSAR y/o W-BOX. Además, en esta tabla se incluyó la descripción de los genes que participan del modulo de co-expresión, pero que no presentan los motivos TL1ATSAR y W-BOX en sus regiones promotoras.

El análisis del rol de los genes que integran el modulo de co-expresión muestra que la mayor parte de los genes están asociados a respuestas de defensa y estrés. Interesantemente, los genes WRKY25 y MPK3, cuya expresión fue analizada por medio de la técnica de RT-qPCR en plantas que expresan la CgCP (Ver Figura 4.1), presentan en sus regiones promotoras al motivo ATL1SAR. MPK3 también posee el motivo W-BOXATNPR1 en secuencia promotora (Ver Tabla 4.6). El gen WRKY33 también está presente en el modulo de co-expresión aunque en su secuencia promotora no contiene los motivos TL1ATSAR, ni W-BOX.

Gen	Descripción
At1g05575	Proteína con función desconocida
At1g07000	Miembro de la familia EXO70. EXO702B está involucrada en la vía de exocitosis y en respuesta de defensa frente a diversos patógenos.
At1g14370	APK2A. Proteína kinasa involucrada en respuestas de estrés.
At1g19020	Proteína con función desconocida
At1g19770	ATPUP14 involucrado en el transporte de purinas
At2g26190	Proteína de unión a calmodulina
At2g30250	WRKY25. Factor de transcripción involucrado en respuestas a estrés.
At3g09830	PCRK1. Kinasa citoplasmática que contribuye a la inmunidad contra <i>Pseudomonas Syringae</i> .
At3g52400	ATSYP122. Involucrada en la regulación negativa de vías de defensa
At4g17490	ERF6. Factor de transcripción involucrado en regulación de la división celular y en respuestas de defensa.
At4g34390	XLG2. Proteína extra-large de unión a GTP. Regulador negativo de respuestas de defensa, involucrado en la señalización de ABA, AUX, JA, ETILENO y SA.
At5g59450	Factor de transcripción de la familia GRAS involucrado en la respuesta a quitina.
At1g07520	Factor de transcripción de la familia GRAS involucrado en la respuesta a quitina.
At2g38470	Proteína con función desconocida
At3g45640	MAPK3
At4g20830	Proteína involucrada en el transporte de electrones
At1g22280	PAPP2C. Proteína asociada a fitocromos que interactúa con la proteína de resistencia RPW8.2
At1g28380	NSL1. Proteína involucrada en la regulación negativa de la vía de SA
At3g18690	MKS1. Involucrado en la respuesta a patógenos. Interactúa con los factores de transcripción WRKY
At5g27420	CNI1. Carbono/Nitrógeno insensible 1, ubiquitin-ligasa que funciona en la respuesta de [carbono/nitrógeno] para transiciones de fase de crecimiento
At1g16670	Elemento transponible
At1g18570	MYB51. Involucrado en la regulación de la síntesis de glucosinolato
At1g11050	Proteína kinasa involucrada en respuesta a etileno
At2g38470	WRKY33
At4g18880	ATHSF4A sustrato de MPK3 y MPK6
At5g25930	Proteína kinasa involucrada en respuestas de defensa.

Tabla 4.6. Descripción del rol de los genes que integran el modulo de co-expresión. Los genes en rojo presentan el motivo TL1ATSAR, los azules el motivo W-BOXNPR1 y los genes en verde ambos motivos.

4.4 Estudio de la expresión de genes que contienen en sus secuencias promotoras a los motivos TL1ATSAR y W-BOXNPR1 en la línea transgénica de *Arabidopsis thaliana* que expresa CP de TMV-Cg bajo un promotor inducible

La información obtenida por medio del análisis bioinformático fue empleada para estudiar más en detalle el rol de la CgCP sobre la modulación de la expresión génica en el hospedante *A. thaliana*. En particular, se procedió a estudiar el efecto de la CgCP sobre la expresión de los genes que integran el modulo de co-expresión previamente caracterizado. Para ello se cuantificó por medio de la técnica de RT-qPCR la expresión de los genes que se detallan en la tabla 4.7 en plantas de la línea CP#72 tratadas con el inductor MOF y en plantas CP#72 tratadas con agua.

Gen	Descripción ^a	TL1TASAR	WBOX-NPR1
WRKY33 (At2g38470)	Regula las vías de defensa contra <i>Pseudomonas syringae</i> y hongos necrotróficos. Respuesta a estreses abióticos, especialmente a estrés salino.	–	–
WRKY25 (At2g30250)	Factor de transcripción. Involucrado en respuesta a estreses abióticos, principalmente estrés salino.	-659 -796	–
MAPK3 (At3g45640)	Kinasa activada por mitógenos. Aumenta su expresión en respuesta a daño mecánico, frío, estrés salino y quitina. Involucrada en inmunidad innata.	-731	-739 -897
ERF6 (At4g17490)	Factor de transcripción con dominio AP2. Involucrado en la respuesta a etileno, ROS y estrés lumínico.	-888	–
XLG2 (At4g34390)	Proteína extra-large de union a GTP. Regulador negativo de respuestas de defensa, involucrado en la señalización de ABA, AUX, JA, ETILENO y SA.	-460	-365

CNI1 (At5g27420)	Carbono/Nitrógeno insensible 1, ubiquitin-ligasa que funciona en la respuesta de [carbono/nitrógeno] para transiciones de fase de crecimiento.	-51 -895	-339
At1g05575	Función desconocida	-115	_
MKS1 (At3g18690)	Proteína quinasa involucrada en respuesta a patógenos. Interactúa con factores WRKY	-	-837
At1g14370	Proteína quinasa 2 ^a	-926	-
PAPP2C (At1g22280)	Proteína tipo fosfatasa asociada a fitocromos Interactúa con PHYA y PHYB	-	-253
At3g09830	Proteína perteneciente a una familia de proteínas kinasas	-173	-

TABLA 4.7 Genes que presentan en sus regiones promotoras a los motivos TL1ATSAR y W-BOXNPR1 y que fueron seleccionados para su análisis en la línea transgénica que expresa la CgCP. En la tercer y cuarta columna se indica la ubicación de los motivos (TL1ATSAR t W-BOX NPR1) dentro de la secuencia promotora relativa al sitio de inicio de la transcripción. El sitio de inicio de la transcripción corresponde a la posición +1.

^a Descripción del rol de genes provista por TAIR.

El análisis por medio de la técnica RT-qPCR muestra que la expresión de una gran parte de estos genes disminuye durante la expresión de la CgCP (Figura 4.6). Estos resultados validan el análisis bio-informático y sugieren que la CgCP actúa regulando negativamente la expresión de genes dependientes del factor NPR1 y de los factores de transcripción pertenecientes a las familia W-BOX.

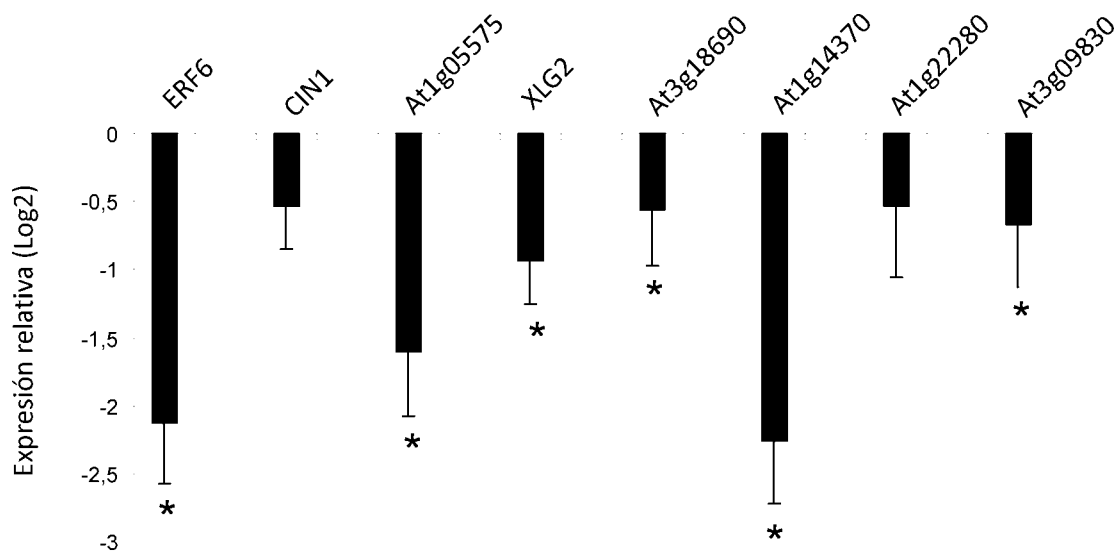


Figura 4.6: La expresión de la CgCP regula negativamente la expresión de un set de genes que contienen el motivo TL1ATSAR y/o W-BOX en sus secuencias promotoras. Niveles relativos de mRNA determinados por la técnica de RT-qPCR de genes que contienen el motivo TL1ATSAR (*ERF6*, *CNI1*, *XLG2*, *APK2a*, *At3g09830*, *At1g05575*) y el motivo W-BOX (*ERF6*, *XLG2*, *CNI1*, *MKS1*,) en plantas CP#72 inducidas (tratadas con MOF) comparadas con las no inducidas CP#72(-) (tratadas con agua) luego de 48hs del agregado del inductor. El nivel de expresión en las plantas CP#72(-) fue arbitrariamente fijado en uno ($\text{Log}_2(1)=0$). Se muestra el promedio \pm ES de cinco replicas biológicas. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas (* = P values < 0.05).

4.5 La infección con el virus TMV-Cg altera la expresión de un grupo de genes co-expresados que tienen en sus secuencias promotoras los motivos TL1ATSAR y W-BOXNPR1

Los datos obtenidos empleando una línea transgénica que expresa la CgCP por medio de un promotor inducible muestran que la CgCP modula negativamente la expresión de genes de respuesta a SA (Capítulo 3) y que además presentan en sus secuencias promotoras a los motivos TL1ATSAR y W-BOXNPR1 (Figura 4.6). Si bien el uso de plantas transgénicas que expresan proteínas virales individuales ha demostrado ser una herramienta útil para el estudio del rol de las proteínas virales, es importante complementar esta información con el análisis de la expresión génica durante la progresión de la infección viral. Para ello, se procedió a analizar la expresión de estos genes a distintos tiempos del desarrollo de la infección con el virus TMV-Cg. Para la realización de este experimento, se infectaron plantas salvajes pertenecientes al cultivar

Col-0 que se encontraban en un estadio 1.08. Se tomaron muestras a 3, 5, 7 y 10 días post infección del tejido sistémico infectado, excluyendo la hoja inoculada. La cuantificación, por medio de la técnica de RT-qPCR, mostró que el conjunto de genes que contienen los motivos TL1ATSAR y W-BOX en sus secuencias promotoras son incrementados a 3, 5 y 7 días luego de la infección con el virus TMV-Cg (Figura 4.7). Mientras que a 10 dpi la expresión de la mayoría de estos genes disminuye significativamente.

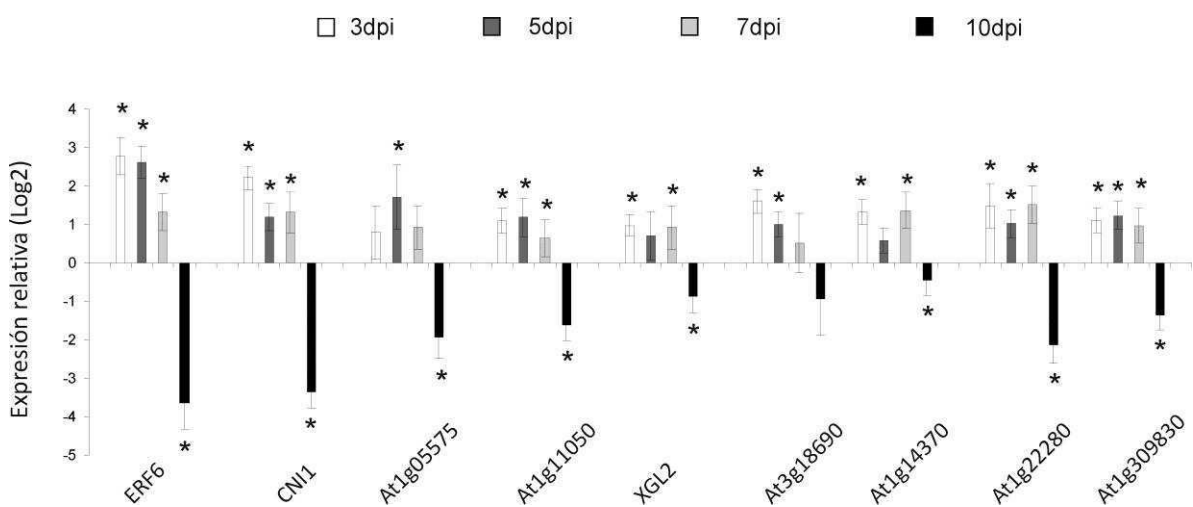


Figura 4.7: Análisis de la expresión de genes que contienen los motivos TL1ATSAR y W-BOXNPR1 en sus secuencias promotoras en plantas infectadas con el virus TMV-Cg a 3, 5, 7 y 10 dpi por medio de la técnica RT-qPCR. Los niveles relativos de mRNA de los genes *ERF6*, *CNI1*, *At1g05575*, *At1g11050*, *XLG2*, *At3g18690*, *At1g14370*, *At1g22280* y *At1g309830* fueron determinados por la técnica de RT-qPCR en plantas WT-Col-0 infectadas con el virus TMV-Cg en comparación con los niveles de expresión en plantas WT Col-0 no infectadas. Los niveles de expresión en plantas no infectadas fue arbitrariamente fijado en uno ($\text{Log}_2(1)=0$). Se muestra el valor medio de cuatro replicas biológicas \pm SE. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* = P valor < 0.05).

Discusión

4.1 La expresión de la proteína de cápside del virus TMV-Cg modula la expresión de genes involucrados en una amplia variedad de procesos

Las interacciones virales compatibles desencadenan grandes cambios en la expresión génica del hospedante (Whitham et al., 2006). En el presente capítulo, se analizaron y validaron los datos de un microarreglo realizado a partir de muestras de una línea transgénica que expresa la CgCP de manera inducible. Este análisis mostró que los genes incrementados por efecto de la CgCP están involucrados en una amplia diversidad de vías de señalización. En particular, varios de los genes incrementados tienen un rol reportado frente a estreses abióticos, como por ejemplo el factor de transcripción ATAF1. Este factor es inducido por múltiples estreses, entre ellos el estrés de salinidad y el estrés de sequía (Wu et al., 2009). En el trabajo realizado por Wu y colaboradores, se observó que plantas sobre-expresantes de ATAF1 poseen una mayor tolerancia frente al estrés de sequía, pero muestran una mayor susceptibilidad frente al estrés de salinidad (Wu et al. 2009). Por otro lado, recientemente se ha reportado que este factor se une a la región promotora de un gen que codifica para una proteína involucrada en la síntesis de ABA, incrementando la abundancia de esta hormona (Jensen et al., 2013). El factor ANAC053, otro factor de transcripción perteneciente a la familia de factores de transcripción NAC/ATAF/CUC, también mostró niveles de expresión mayores en las plantas que expresan la proteína de cápside. Este factor de transcripción es inducido por estrés de sequía y de calor (Lee et al., 2012) y estimula la producción de ROS por medio del pegado a la región promotora de genes involucrados en la producción de estas moléculas de señalización. De igual modo, también se observaron niveles incrementados del transcrito codificado por el gen MYBC1 en las plantas que expresan la CgCP. Se ha reportado que la expresión de este gen es inducida por respuesta a frío, luego del tratamiento con ABA y por estrés de tipo salino. Además se ha observado que mutantes de MYBC1 son más tolerantes al frío, mientras que plantas que sobre-expresan este gen resultan menos tolerantes a este estrés (Zhai et al., 2010).

Por otra parte, se observó que las plantas que expresan la CgCP acumulaban mayores niveles de un transcrito que codifica para un factor involucrado en el mecanismo de splicing, el factor SR45a. Los niveles de expresión de SR45a son regulados por diversos estreses, como por ejemplo sequía, estrés de calor y alta incidencia de luz (Yoshimura et

al., 2011). Además, el mecanismo de splicing alternativo interviene en regulación de la transcripción de SR45a, dando lugar a distintas variantes de la proteína. Se ha observado que las plantas sometidas a estrés de calor y sequía, no sólo acumulan niveles mayores de este transcrito, sino que, además, tienen incrementada la abundancia del transcrito que codifica para una proteína de largo completo (Gulledge et al, 2012).

Estos resultados concuerdan con reportes previos en donde se describe que los genes implicados en vías de estrés abiótico aumentan su expresión durante las infecciones virales compatibles (Postnikova and Nemchinov, 2012). En particular, un trabajo realizado en plantas de *Arabidopsis thaliana* infectadas con el virus TMV-Cg (Espinoza et al., 2007) mostró que este virus incrementa la expresión de genes de respuesta a ABA, una hormona clave en la respuesta frente a estrés abiótico. En base a estas evidencias, y a los resultados obtenidos en nuestro estudio, es posible suponer que la proteína de cápside del virus TMV-Cg podría estar contribuyendo a modular la expresión de genes involucrados en estrés abiótico durante el desarrollo de las infecciones virales por medio de la alteración de factores endógenos del hospedante involucrados en esta vía de señalización. Alternativamente, la CgCP podría impactar sobre otras vías regulatorias que, indirectamente, produjeran un efecto sobre la la expresión de genes involucrados en estrés abiótico.

Por otra parte, el análisis de los datos obtenidos por medio de la técnica de microarreglo mostró que la expresión del transcrito que codifica para el factor de transcripción GATA4 se incrementa durante la expresión de la proteína CgCP. Este factor de transcripción, junto con el factor GATA2, tienen un rol en la regulación transcripcional de genes involucrados en la fotomorfogenesis, aunque el rol de GATA4 sería menos prominente (Luo et al., 2010). En el trabajo realizado por Luo y colaboradores, se demostró que la expresión de los factores GATA2 y GATA4 es controlada por el pegado del factor BZR1 (BRASSINAZOLE-RESISTANT 1) al promotor de estos genes. BZR1 es un factor de transcripción activado por brasinosteroides que inhibe la expresión de GATA2/4 (Luo et al., 2010). La disminución de los niveles de brasinosteroides o la alteración de componentes involucrados en dicha señalización, incrementan la expresión de los genes codificantes para los factores de transcripción GATA2/4. Estas evidencias sugieren que el incremento de la expresión de GATA4, observada durante la expresión de la CgCP podría deberse a alteraciones en los niveles/ señalización de la vía de

brassinosteroides. En esta misma línea, se observó que la expresión del gen que codifica para uno de los receptores presentes en el complejo involucrado en la percepción de brassinosteroides, *BRI1*, está disminuida en plantas que expresan la proteína CgCP. Plantas mutantes para este gen muestran importantes alteraciones fenotípicas, entre ellas enanismo y un color verde oscuro de las hojas (Clouse and Sasse, 1998). Además, estas plantas mutantes para el gen *BRI1* acumulan mayores niveles de transcritos que codifican para genes involucrados en la respuesta a estrés de frío y son más tolerantes a este estrés (Kim et al, 2010).

Otros dos genes cuya expresión es incrementada por efecto de la CgCP, At5g50915 y UBC17, han sido asociados al incremento en los niveles de las proteínas DELLAs (Zentella et al., 2007a). Las proteínas DELLAs son reguladores negativos de la vía de señalización mediada por giberelinas y además interfieren en la modulación de distintas vías hormonales, entre ellas las vías mediadas por los brassinosteroides, el ácido jasmónico y el ácido salicílico (Navarro et al, 2008; Gallego-Bartolomé et al, 2012). En particular, las proteínas DELLAs interfieren con la vía de brassinosteroides por medio del pegado al factor de transcripción BZR1, impidiendo la unión de dicho factor a los promotores de sus genes blancos (Gallego-Bartolomé et al, 2012). Por otro lado, las proteínas DELLAs tienen un rol negativo en la vía de señalización mediada por la hormona SA (Navarro et al., 2008). Tanto la alteración de la vía de genes de respuesta a brassinosteroides, como la alteración de la expresión de genes de la vía de SA, sugieren que la CgCP podría estar alterando la acumulación de las proteínas DELLAs, impactando en la regulación de diversas vías hormonales.

4.2 La expresión de la CgCP modula negativamente la expresión de genes involucrados en vías de defensa que presentan en sus promotores los motivos W-BOX y TL1ATSAR

Recientemente, el análisis de redes génicas ha permitido un nuevo enfoque para el estudio de la información obtenida por medio de ensayos de microarreglos y de otras tecnologías. El objetivo de estos análisis es describir las relaciones funcionales entre los genes que participan de la red. En muchos casos, la expresión coordinada de un grupo de genes en distintas condiciones experimentales indica que estos genes tienen una relación funcional (Aoki et al., 2007). Por ejemplo, se ha demostrado que los genes

asociados a vías metabólicas comunes tienden a mostrar patrones de co-expresión (Ihmels et al., 2004) (Kharchenko et al., 2005). Sin embargo la co-expresión no implica en todos los casos que exista una relación funcional entre los genes que integran la red (Aoki et al., 2007). La búsqueda de elementos regulatorios compartidos entre los genes que integran redes de co-expresión permite caracterizar las relaciones funcionales entre los genes que participan de dicha red. En los últimos años se han desarrollado diversas herramientas bioinformáticas que permiten realizar estos análisis (Usadel et al., 2009) (Bailey, 2008). Por medio de estas herramientas bioinformáticas, se procedió a analizar el subset de genes involucrados en vías de defensa cuya expresión es disminuida por la proteína CgCP. Para el análisis de co-expresión se empleó el programa ATTED-II (Obayashi et al., 2009). Este programa permite realizar análisis de co-expresión de manera “condición independiente”, es decir que emplea una base de datos de microarreglos realizados en diversas condiciones. Tras dicho análisis, se encontró que un set de genes cuya expresión es alterada por la CgCP integra una red de co-expresión. En una siguiente instancia, se realizó una búsqueda bioinformática de los elementos regulatorios presentes en las secuencias promotoras de dichos genes (Bailey, 2008). Tras este análisis se encontraron 9 motivos no redundantes, de los cuales 8 poseen similitud con motivos previamente caracterizados (Tabla 4.5). Entre los motivos hallados se encuentran, TL1ATSAR el cual ha sido previamente encontrado en la región promotora de genes regulados por NPR1, un factor clave en la vía de señalización de la hormona SA (Wang et al., 2005). W-BOXATNPR1 es otro de los motivos presente en las secuencias regulatorias de los genes que participan de la red (Yu et al., 2001). Este motivo está presente en la región promotora del gen NPR1. Por medio de un ensayo de retraso en la corrida electroforética (EMSA por su sigla en inglés), se determinó que factores de transcripción de la familia WRKY reconocen este motivo (Yu et al., 2001). En este mismo trabajo, se reportó que la presencia de este motivo es clave para el incremento de la expresión del gen NPR1 luego del tratamiento con SA.

A continuación, se procedió a validar los datos obtenidos por medio del análisis bioinformático empleando la técnica de RT-qPCR. Este análisis mostró que la CgCP regula negativamente la expresión de un conjunto de genes que tienen a los motivos TL1ATSAR y W-BOX NPR1 en sus secuencias promotoras (Figura 4.6). Estos resultados apoyan las conclusiones presentadas en el capítulo III sobre el rol de la CgCP en la regulación

negativa de genes que pertenecen a la vía de señalización de SA. Además, estos resultados indican que la CgCP alteraría la expresión de genes de la vía de SA cuya expresión es dependiente del factor NPR1. Este factor juega un rol clave en la regulación de la vía de defensa mediada por SA controlando la respuesta de resistencia sistémica adquirida (SAR). Por otra parte, este factor se une a la hormona SA con una afinidad similar a la reportada para otras interacciones hormona-receptor, lo que llevó a proponer que NPR1 sería el receptor de la vía de SA (Wu et al, 2012). En conjunto, estos resultados muestran que los análisis de co-expresión en conjunto con la caracterización de motivos regulatorios sobre-representados son herramientas útiles para la caracterización de los componentes implicados en vías de señalización.

4.3 La proteína CgCP altera la expresión de genes que están involucrados en vías de defensa frente a patógenos bacterianos y fúngicos

En el capítulo III de Resultados se caracterizó el rol de la CgCP sobre la alteración de la expresión de genes involucrados en vías de defensa antiviral (AOX1a, RDR1, WRKY70). Por otra parte, en el presente capítulo se observó que la CgCP, no sólo disminuye la expresión de genes de vías de defensa antiviral, sino que también impacta sobre la expresión de genes previamente reportados en vías de defensa frente a patógenos fúngicos y bacterianos. Estos resultados concuerdan con un trabajo realizado por Postnikova y Nemchinov (2012), en donde se observó que existe una gran similitud entre los genes alterados por virus y los alterados por bacterias y por hongos.

Entre los genes cuya expresión es alterada por la CgCP se encuentran varias proteínas quinasas: MAPK3, At3g18690 (MKS1), At1g14370 (proteína kinasa 2A) y At3g309830 (Figura 4.6). Las proteínas quinasas tienen rol altamente conservado en la activación de cascadas de señalización que regulan las respuestas del sistema inmune frente a patógenos. En el genoma de Arabidopsis existen 20 genes que codifican para MPKs, siendo las MPK3, MPK4 y MPK6 las más caracterizadas. Estas MPKs son activadas por estrés abiótico, patógenos y estrés oxidativo (Pitzschke et al, 2009). MPK3 y MPK6 actúan como reguladores positivos de la vía de respuestas de defensa (Pitzschke et al, 2009), mientras que MPK4 actúa como un regulador negativo de la vía de SA y positivo de la vía

de JA/ET (Petersen et al, 2010). Por otra parte, MKS1 es un sustrato de MPK4 e interactúa con el factor de transcripción WRKY33 (Qiu et al, 2008).

PAPP2C es otro de los genes cuya expresión es disminuida por efecto de la CgCP. Este gen codifica para una proteína con actividad fosfatasa que es capaz de interactuar con la proteína de resistencia RPW8.2 que confiere resistencia frente al hongo *Golovinomyces* spp (Wang et al., 2012). Por otra parte, la expresión de los genes *ERF6* y *XLG2* también es alterada durante la expresión de la CgCP. Al igual que *PAPP2C*, estos genes codifican para proteínas que poseen un rol reportado en la modulación de vías de defensa. Por ejemplo, *ERF6* ha sido involucrado en la respuesta frente al hongo *B. cinera* (Moffat et al., 2012.). Por otra parte, el gen *XLG2* codifica para una proteína de unión a GTP, dependiente de Ca^{2+} , cuya expresión se incrementa luego de la infección con *P. syringae* y modula la susceptibilidad frente a infección con este patógeno (Zhu et al, 2009).

Finalmente, la CgCP también altera la expresión de un grupo de factores de transcripción de la familia WRKY (*WRKY33*, *WRKY25* y *WRKY70*) los cuales también han sido involucrados en las respuestas de defensa frente a patógenos bacterianos (Lippok et al., 2007) (Zheng et al., 2007).

En conjunto, estos resultados indican que la CgCP impacta negativamente tanto sobre la expresión de genes de defensa antiviral, como también sobre la expresión de genes involucrados en respuesta a patógenos fúngicos y bacterianos.

4.4 La infección con el virus TMV-Cg altera la expresión de un grupo de genes co-expresados que tienen en sus secuencias promotoras los motivos TL1ATSAR y W-BOX

Para completar el estudio del rol de la CgCP sobre la modulación de la expresión génica del hospedante *A. thaliana*, se procedió a analizar la expresión de genes que participan de vías de defensa y que contienen los motivos TL1ATSAR y W-BOX en sus secuencias promotoras durante la infección viral con el virus TMV-Cg. La cuantificación de la expresión de este conjunto de genes mostró un incremento de la expresión a tiempos tempranos de la infección viral (Figura 4.7). Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente por Huang y colaboradores en un trabajo en donde se caracterizó la expresión de genes de defensa a tiempos tempranos del desarrollo de la infección del

virus ORMV (un virus altamente relacionado al TMV-Cg) en el hospedante *A. thaliana* (Huang et al, 2005).

Por otra parte, se observó que la expresión de estos genes disminuía coordinadamente a los 10 dpi (Figura 4.7). Teniendo en cuenta que estos genes son regulados negativamente por efecto de la CgCP (Figura 4.6) y que a medida que la infección progresa los niveles de acumulación de CgCP son mayores, es posible suponer que la CgCP sea la responsable de la reducción de la expresión de estos genes a tiempos avanzados de infección viral. La disminución de la expresión de genes implicados en vías de defensa durante el desarrollo de la infección del virus TMV (relacionado al virus TMV-Cg) ha sido previamente reportada por Wang y col (2009). En el trabajo de Wang y col, la disminución de la expresión de genes de defensa, en particular de respuesta a SA, fue atribuída a la interacción entre la replicasa del virus TMV y el factor de transcripción ATAF2 y posterior degradación del factor ATAF2 el cual regula positivamente la expresión de genes de la vía de SA, entre ellos PR1 y PR2.

En resumen, los resultados presentados en esta tesis, en conjunto con evidencias presentadas por otros autores, muestran que durante el desarrollo de las infecciones con Tobamovirus se produce una alteración de la expresión de genes involucrados en vías de defensa. El hallazgo de los motivos TL1ATSAR y W-BOX en las secuencias promotoras de genes que son alterados durante la infección con el virus TMV-Cg, sugiere que los factores NPR1 y W-BOX modularían la expresión génica durante el desarrollo de la infección con el virus TMV-Cg.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente capítulo permiten concluir que:

- La CgCP modula la expresión de genes involucrados en una amplia variedad de procesos. En particular, genes involucrados en vías de estrés abiótico están sobre-representados dentro del conjunto de genes cuya expresión es incrementada durante la acumulación de la CgCP.
- Un conjunto de genes cuya expresión es disminuida por la CgCP está involucrado en vías de defensa innata e integra una red de co-expresión. Un subgrupo de

dichos genes comparten dos elementos regulatorios en sus promotores: W-BOX y TL1ATSAR. Ambos motivos están asociados a la regulación de vías de defensa.

- El virus TMV-Cg incrementa la expresión de este subgrupo de genes a tiempos cortos de infección, mientras que disminuye la expresión de estos genes a tiempos tardíos de la infección con el virus TMV-Cg.

En resumen, en este capítulo se observó que los genes cuya expresión es alterada por la CgCP integran de una red de co-expresión compuesta, en gran parte, por genes de defensa innata, varios de los cuales comparten motivos regulatorios en sus secuencias promotoras. Además, dichos motivos regulatorios han sido previamente encontrados en genes que participan en la señalización de vías de defensa innata

CAPÍTULO 5: LA CGCP ESTABILIZA A LAS PROTEÍNAS DELLAS, OCASIONANDO LA MODULACIÓN NEGATIVA DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA

Introducción

Trabajos realizados por distintos grupos de investigación muestran que los patógenos virales que afectan a las plantas pueden interferir en la síntesis de las hormonas vegetales y como resultado alterar el desarrollo (Pallas and García, 2011). Uno de los síntomas más frecuentes producidos por los virus es el retardo del crecimiento (Doumayrou et al., 2013). Experimentos realizados a mediados del siglo pasado, muestran que los síntomas producidos por virus pueden ser revertidos por la aplicación de ácido giberélico (GA) (Maramorosch, 1957), lo que sugeriría que esta hormona podría estar involucrada en la producción de los síntomas observados durante las infecciones virales. Trabajos más recientes en donde se estudió el impacto de las infecciones virales sobre la expresión génica del hospedante, han mostrado que los virus y viroides alteran componentes de la vía de síntesis/ degradación de la hormona GA (Vidal et al., 2003) (Hammond and Zhao, 2009);(Sato et al., 2011).

Las proteínas DELLAs son reguladores negativos del crecimiento y en presencia de GA son degradadas a través del sistema de degradación de proteasoma (Spartz and Gray, 2008). Estas proteínas también juegan un rol como integradores de las distintas vías hormonales (Grant and Jones, 2009). Además, estas proteínas promueven la susceptibilidad frente a patógenos bacterianos biotróficos por medio de la modulación negativa de la respuesta de defensa de SA en *Arabidopsis thaliana* (Navarro et al., 2008). Recientemente, varios reportes han mostrado que los virus alteran la biosíntesis y la señalización de diversas hormonas (Pallas and García, 2011). Sin embargo, el rol de las proteínas DELLAs en la modulación de la señalización durante las infecciones virales no había sido caracterizada hasta el desarrollo de la presente tesis.

Los resultados presentados en este capítulo muestran que la CgCP altera la expresión de un grupo de genes cuya expresión es dependiente de las proteínas DELLAs (blancos de

DELLA). Asimismo, el análisis del fenotipo de plantas que expresan la CP del virus TMV-Cg muestra que esta proteína atrasa el crecimiento y el tiempo de transición floral lo que sugiere que la vía de señalización mediada por GA estaría alterada. En base a estas evidencias, en el presente capítulo se procedió a evaluar el rol de las proteínas DELLAs en la modulación de la respuesta de señalización desencadenada durante la expresión de la proteína de cápside del virus TMV-Cg. Por otra parte, en este capítulo se analizó el rol de las proteínas DELLAs durante la infección con el virus TMV-Cg.

Resultados

5.1 Análisis por medio del programa Genevestigator de los genes alterados por la proteína CgCP

Con el objetivo de caracterizar los factores endógenos del hospedante involucrados en la modulación de la expresión de los genes de defensa en las plantas de la línea CP#72 inducida reportada en los capítulos previos, se procedió a emplear la base de datos Genevestigator (Zimmermann et al., 2004). Esta base de datos reúne la información de una gran cantidad de experimentos de microarreglos. Entre estos, se encuentran los ensayos realizados en el laboratorio del Dr. J. Jones en plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes para una de las cinco proteínas DELLAs, denominada GAI la cual es insensible a los niveles de GA. En este ensayo se emplearon plantas de cinco semanas de edad a las cuales se las trató con el péptido flg22. Por medio del programa Genevestigator, se encontró que un conjunto de genes, cuya expresión es alterada por la CgCP, muestra un patrón de expresión similar en las plantas que expresan la CgCP que el observado en plantas que tienen alterados los niveles de una de las proteínas DELLAs (plantas mutantes *gai-1* tratadas con el péptidos flg22, comparadas con plantas no mutantes tratadas con este mismo péptido, GEO accession: GSE17464) (Figura 5.1 A).

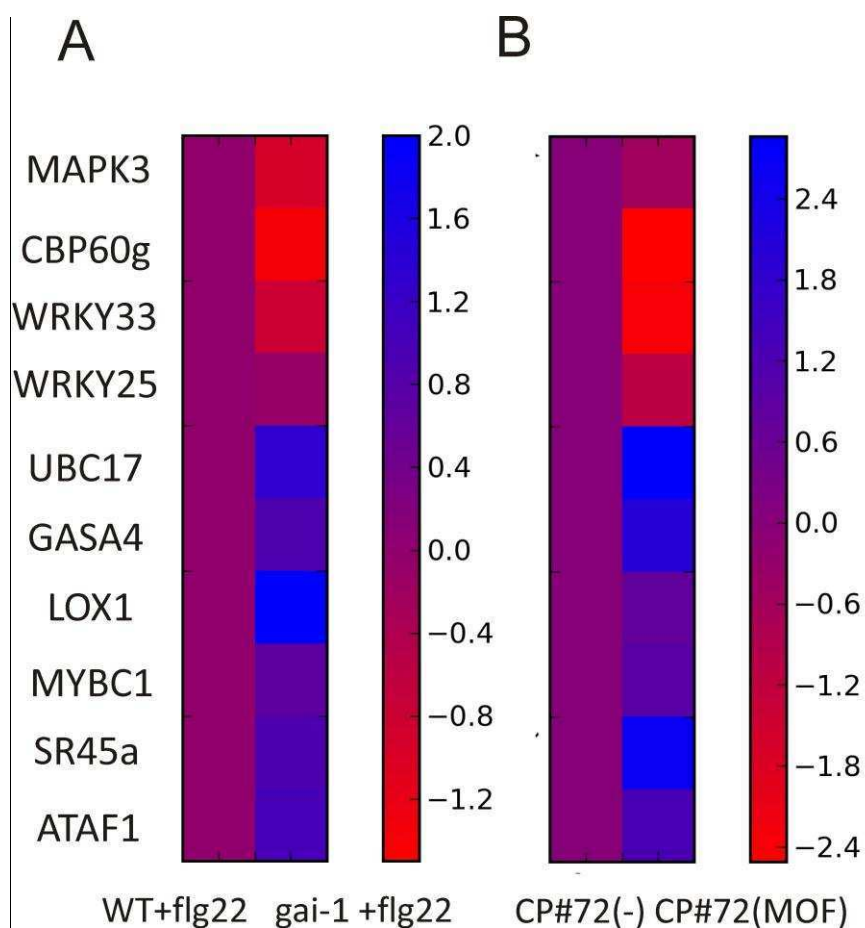


Figura 5.1: Empleo del programa Geneinvestigator para analizar la expresión de un conjunto de genes cuya expresión se altera durante la CgCP. A) Niveles de expresión de un conjunto de genes en plantas mutantes *gai-1* tratadas con flg22 (*gai-1* +flg22) relativos a los niveles de expresión en plantas WT tratadas con flg22 (*gai-1* +flg22). El nivel de expresión en plantas WT tratadas con flg22 (WT + flg22) fue fijado en uno. La escala de color representa (en escala logarítmica) el grado en que la expresión de los genes en las plantas *gai-1* tratadas con flg22 cambia respecto de las plantas salvajes tratadas con flg22. B) Niveles de expresión de un conjunto de genes en plantas CP#72 tratadas con el inductor (MOF) relativos a los niveles de expresión en plantas CP#72 no inducidas (-). El nivel de expresión en plantas CP#72(-) fue fijado en uno. La escala de color representa (en escala logarítmica) el grado en que la expresión de los genes en las plantas CP#72(MOF) cambia respecto de las plantas CP#72.

En particular, se observó que los genes UBC17, GASA4, LOX1, MYBC1, SR45a, ATAF1 cuya expresión es incrementada por la CgCP (Figura 5.1 B), también presentan mayores niveles de expresión en plantas mutantes *gai-1* tratadas con el péptido flg22 respecto de plantas salvajes (WT) tratadas con este mismo péptido (Figura 5.1 A). Por otra parte, los genes MAPK3, CBP60g, WRKY33 y WRKY25 involucrados en respuestas de defensa cuya expresión es disminuida por efecto de la proteína de cápside (Figura 5.1 B),

muestran un patrón de expresión similar al observado en plantas mutantes *gai-1* tratadas con flg22 versus plantas WT tratadas con este mismo péptido (Figura 5.1 A). La correlación de la expresión génica observada en plantas que expresan la CgCP y plantas que tienen alterados los niveles de una de las proteínas DELLAs, sugiere que las proteínas DELLAs podrían estar involucradas en la modulación de la expresión génica durante la acumulación de la CgCP.

5.2 La proteína CgCP incrementa la expresión de los genes blancos de las proteínas DELLAs

Para profundizar la caracterización de las proteínas DELLAs en la modulación de la expresión de genes alterados por la CgCP, se procedió a determinar por medio de la técnica de RT-qPCR la expresión de un set de genes regulados por DELLA. Los genes *UBIQUITIN- CONJUGATIN ENZYME 17 (UBC17)*, *IQ-DOMAIN 22 (IQD22)*, *GA INSENSITIVE DWARF1B (ATGID1b)* y *BASIC HELIX –LOOP HELIX 137 (bHLH137)* codifican para transcritos cuya expresión es disminuida por GA e incrementada por la estabilización de DELLA en plántulas (Zentella et al., 2007b). En primera instancia se procedió a estudiar si estos genes son regulados por DELLA en plantas adultas, para lo cual se determinó su expresión en plantas cuádruple mutantes para DELLA (plantas que carecen de los genes *RGA*, *GAI*, *RGL1*, *RGL2*) (Sun and Gubler, 2004) y también en plantas mutantes *gai-1* (plantas insensibles a giberelinas debido a la estabilización constitutiva de la proteína codificada por *GAI*) (Peng et al., 1997). Para este experimento, se tomaron muestras de hojas provenientes de plantas que presentaban 8 hojas verdaderas. Por medio de la técnica de RT-qPCR se observó que una mayor acumulación de los transcritos codificados por *UBC17* como *bHLH137* en plantas mutantes *gai-1* comparadas con plantas no mutantes Ler (Figura 5.6). Por el contrario, los niveles de los transcritos codificados por *UBC17*, *IQD22*, *ATGID1b* fueron incrementados de manera estadísticamente significativa en plantas cuádruple DELLA comparadas con plantas no mutantes Ler (Figura 5.2). Estos resultados confirman que la expresión de los genes *UBC17*, *IQD22*, *ATG1b* y *bHLH137* correlaciona con los niveles de DELLA en el estadio de plantas adultas.

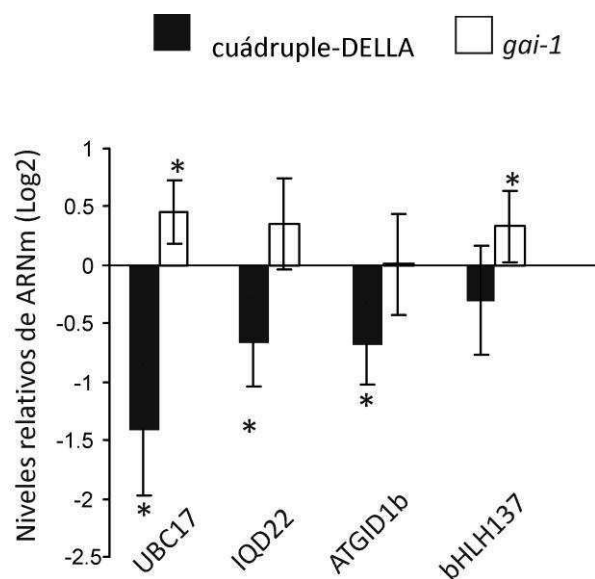


Figura 5.2: Expresión de genes blancos de las proteínas DELLAs en plantas cuádruple mutantes de DELLA y en plantas *gai-1* mutantes. Los niveles de expresión relativa de mRNA en las plantas DELLA cuádruple mutantes y en las plantas *gai-1* mutantes fueron calculados en comparación con los niveles de expresión en plantas no mutantes del cultivar Ler. Los niveles de expresión en plantas Ler no mutantes fueron fijados arbitrariamente en uno ($\text{Log}_2(1)=0$). Se muestra el valor medio de cuatro replicas biológicas \pm ES. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* = P valor < 0.05)

A continuación, se procedió a la cuantificación estos transcritos en las plantas que expresan la CgCP. Además, se evaluaron los niveles de expresión de los transcritos *CSD1* y *CSD2* que codifican para dos enzimas superóxido dismutasas (Cu/ Zn SOD) que son moduladas positivamente por las proteínas DELLAs (Achard et al., 2008). Como se muestra en la Figura 5.3, todos los genes analizados mostraron niveles de expresión incrementados en las plantas que expresan la CgCP respecto de los niveles de expresión detectados en plantas de la línea CP#72 no inducida; lo que sugiere que las proteínas DELLA están modulando los niveles de dicha transcripción durante la expresión de la CgCP.

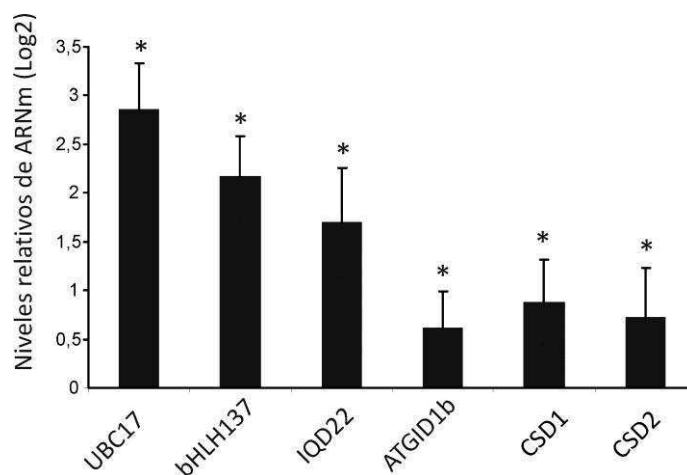


Figura 5.3. La expresión de la CgCP incrementa la expresión de genes blancos de DELLA. Los niveles relativos de ARNm de los genes blancos de DELLA *UBC17*, *bHLH137*, *IQD22*, *ATGID1b*, *CSD1* y *CSD2* fueron determinados por la técnica de RT-qPCR en plantas CP#72 inducidas (72 h luego del tratamiento con MOF) en comparación con los niveles de plantas CP#72 no inducidas CP#72(-). Los niveles de expresión en plantas CP#72(-) fue arbitrariamente fijado en uno ($\text{Log}_2(1)=0$). Se muestra el valor medio de cuatro replicas biológicas \pm SE. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* = P valor < 0.05).

5.2 Las proteínas DELLAs modulan la expresión de genes involucrados en vías de defensa alterados por la proteína de cápside

En los capítulos tercero y cuarto se describió el rol de la CgCP sobre la modulación negativa de la expresión de un amplio grupo de genes cuya expresión es regulada por la hormona SA. Por otra parte, trabajos previos han demostrado que las proteínas DELLAs están involucradas en la modulación negativa de la respuesta de defensa mediada por el SA en *Arabidopsis thaliana* (Navarro et al., 2008). Con el objetivo estudiar si las proteínas DELLAs modulan negativamente la expresión de los genes de defensa estudiados en los capítulos previos, se procedió a cuantificar por medio de la técnica de RT-qPCR la expresión de este grupo de genes. Para ello, se cuantificaron los niveles de expresión de estos genes en plantas cuádruples mutantes de DELLA y en plantas *gai-1* mutantes respecto de los niveles de expresión en plantas no mutantes (Figura 5.4). Se observó un incremento en la expresión de este grupo de genes en las plantas cuádruple mutantes de DELLA comparado con plantas no mutantes. Contrariamente, plantas mutantes *gai-1*

mostraron una menor acumulación de estos genes que las plantas no mutantes. Estos resultados confirman que las proteínas DELLA regulan negativamente el set de genes estudiado.

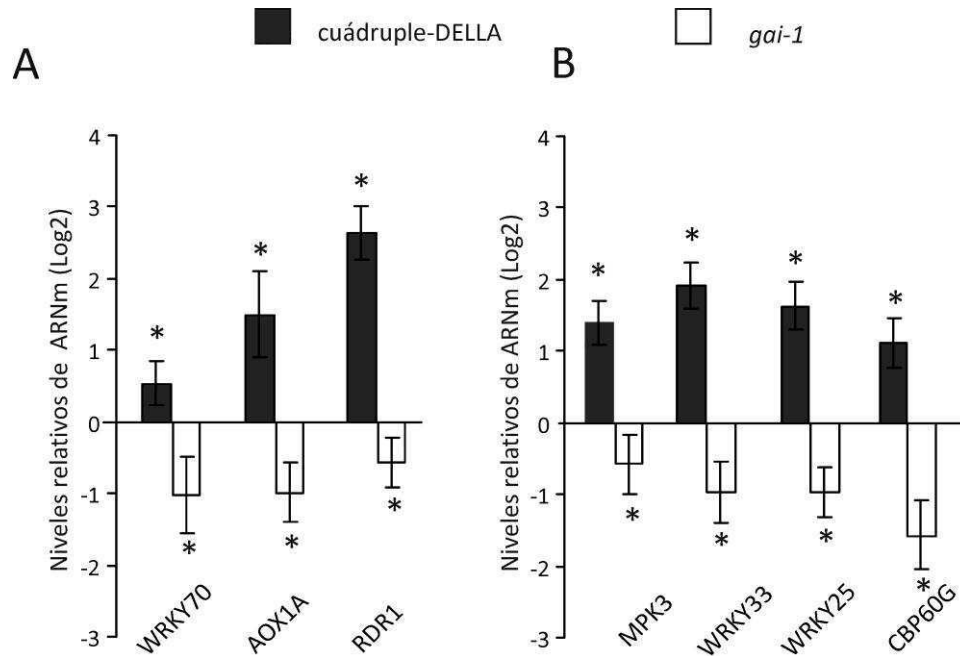


Figura 5.4: Las proteínas DELLAs modulan la expresión de genes involucrados en vías de defensa alterados por la proteína de cápside.

A) Los niveles relativos de los transcritos de genes de respuesta a SA (WRKY70, AOX1A y RDR1), y B) Los niveles de transcritos regulados por DELLA (MPK3, WRKY33, WRKY25 y CBP60g) fueron medidos por medio de RT-qPCR en plantas *gai-1* y cuádruple DELLA mutantes. Estos niveles fueron comparados con los niveles de acumulación en plantas WT-Ler. Los niveles de expresión en plantas WT fueron arbitrariamente fijados en uno ($\text{Log}_2(1)=0$). A), B) y C) Se muestran el valor medio \pm ES de cuatro replicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas (* = P valor < 0.05).

5.4 La expresión de la CgCP atrasa el crecimiento y el tiempo de transición floral

Las proteínas DELLAs juegan un rol central en la regulación del desarrollo (Grant and Jones, 2009); por lo tanto si los niveles de estas proteínas son alterados durante la expresión de la CgCP, la expresión de la CgCP debería tener un impacto en el fenotipo. Con el objetivo de caracterizar si la CgCP altera el desarrollo se procedió a analizar el fenotipo de las plantas de las líneas CP#72 y CP#71 en detalle. Para el análisis del

desarrollo, se cuantificaron la altura de las plantas a las seis semanas de edad y la transición floral (número de días en que aparece la primera flor). La elección de estos parámetros se realizó en base al trabajo realizado por Achard et al. (2008), en donde estos mismos parámetros fueron empleados para analizar el rol de las proteínas DELLAs en la regulación del crecimiento durante situaciones de estrés.

Para la realización de este experimento, se procedió a regar con el inductor (MOF) plantas de la línea CP#72 que estaban en un estadio de desarrollo 1.08 (Boyes et al., 2001). Las plantas de la línea CP#72 regadas con el inductor mostraron una menor altura a las seis semanas de edad y retraso en la transición floral, al ser comparadas con plantas transgénicas no inducidas (Figura 5.5). Estos parámetros también fueron cuantificados en plantas no transgénicas tratadas con MOF (Figura 5.5). En este caso no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los dos parámetros cuantificados en las plantas CP#72 no inducidas y las plantas no transgénicas tratadas con MOF. Por lo tanto los cambios observados en el fenotipo fueron atribuidos a la expresión de la CP. Este mismo experimento fue realizado en plantas de la línea CP#71. De un modo similar a lo observado en las plantas de la línea CP#72 tratadas con el inductor, las plantas de la línea CP#71 mostraron un retraso en la altura de las plantas a las seis semanas de edad y en la transición floral, al ser comparadas con plantas no transgénicas (Figura 5.6).

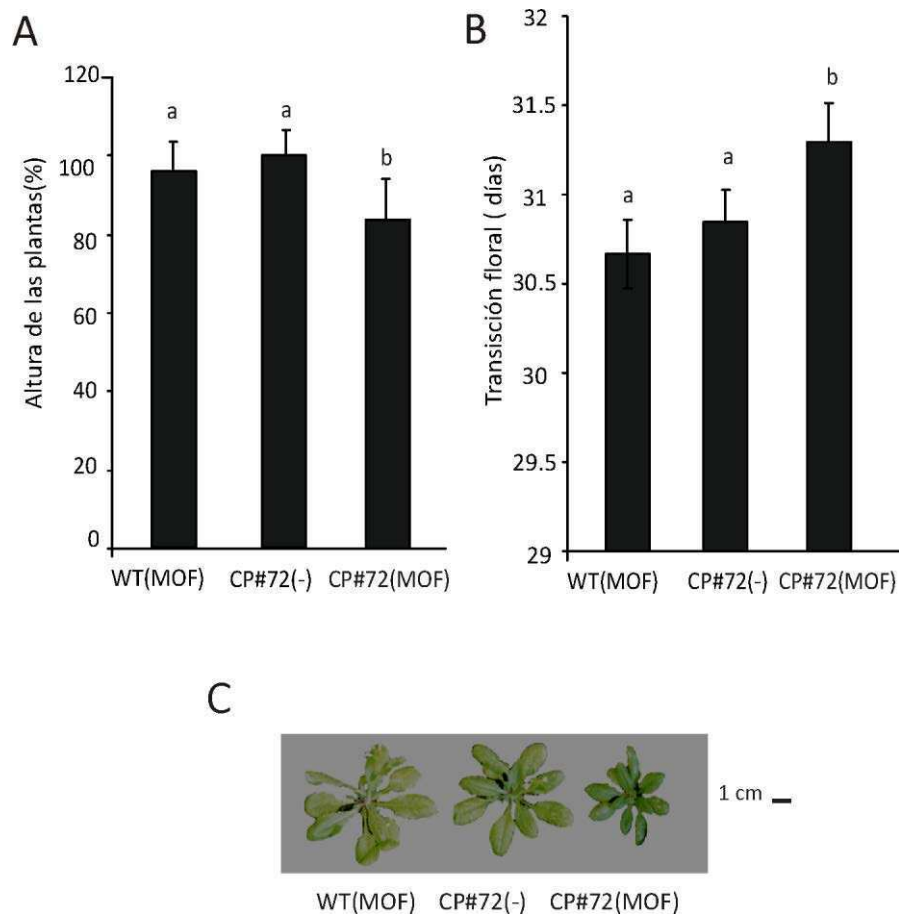


Figura 5.5: Análisis del efecto de la expresión de la CgCP en plantas de la línea CP#72. Las mediciones se realizaron en plantas salvajes (WT) tratadas con MOF y en plantas de la línea CP#72 tratadas con MOF. La línea CP#72 tratada con agua fue usada como control. A) Gráfico de barras mostrando la altura de las plantas a las seis semanas B) Transición floral (número de días en que aparece la primera flor). Cada columna representa la media de 25 plantas \pm ES. C) Fotografía representativa de plantas WT y CP#72 tomada a las 6 semanas de edad, de plantas crecidas en presencia de MOF (MOF) o agua (-). Letras distintas sobre las barras indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, p -valor ≤ 0.05 .

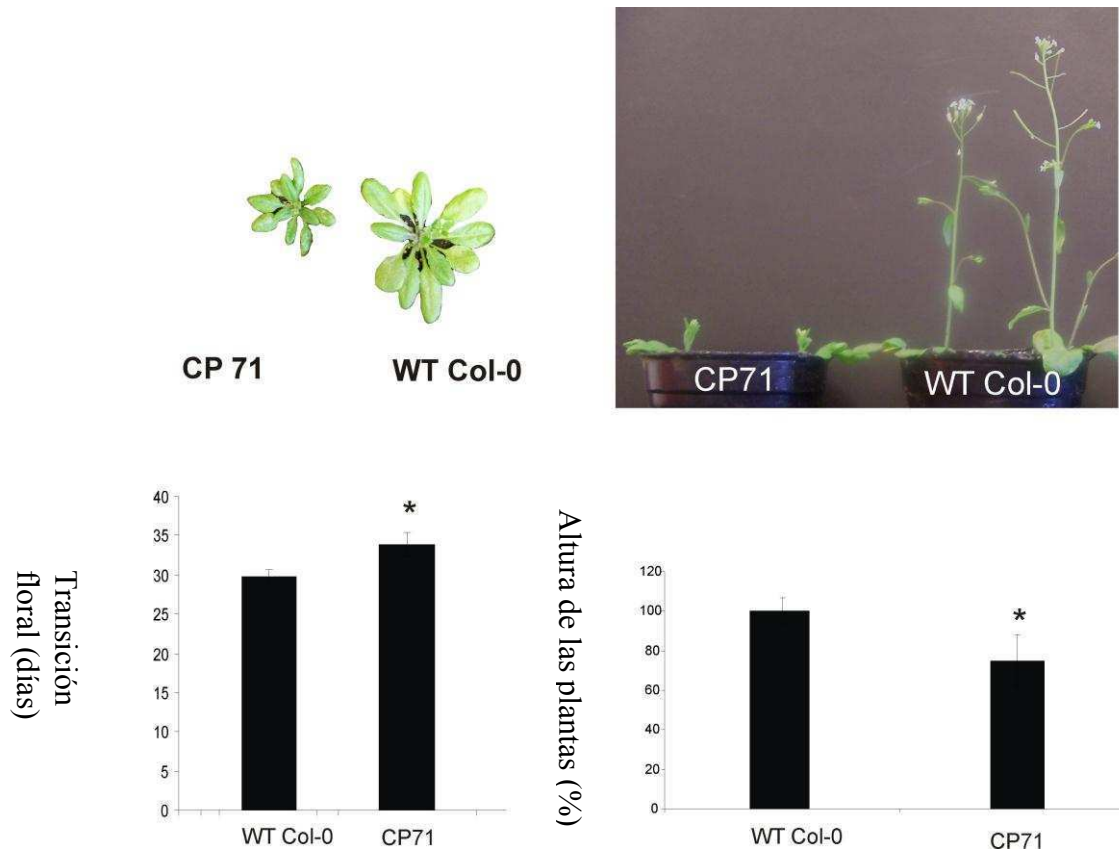


Figura 5.6: Análisis del efecto de la expresión de la CgCP en plantas de la línea CP#71. Las mediciones se realizaron en plantas de la línea CP# 71 y plantas salvajes (WT) A) Gráfico de barras mostrando la altura de las plantas a las seis semanas B) Transición floral (número de días en que aparece la primera flor). Cada columna representa la media de 25 plantas \pm ES. C) Fotografía representativa de plantas WT y CP#71 tomada a las 6 semanas de edad.

El análisis del fenotipo también se realizó en el estadio de plántula en plantas de la línea CP#72. En este ensayo, se observó una importante reducción del crecimiento de las partes aéreas en las plantas inducidas respecto del fenotipo observado en las plantas no inducidas (Figuras 5.7). Plantas no transgénicas también fueron usadas como control (plantas salvajes, WT). No se observaron diferencias de crecimiento entre plantas no transgénicas tratadas con el inductor y no tratadas. Por lo tanto, CgCP también altera el crecimiento de *Arabidopsis* cuando es expresada desde un estadio temprano de desarrollo (Figura 5.7).

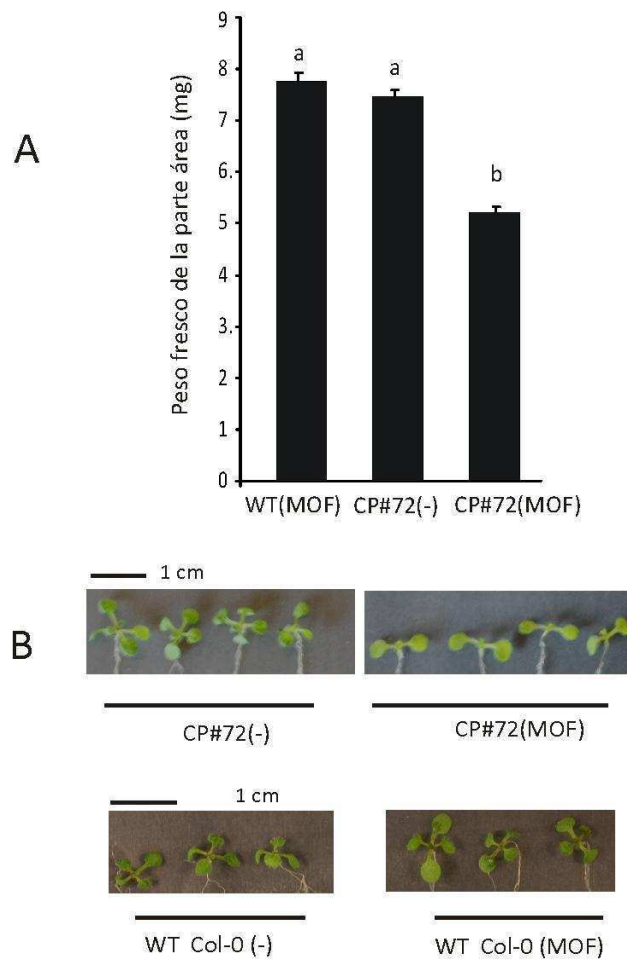


Figura 5.7 Análisis del fenotipo de plantas de la línea CP#72 en el estadio de plántula. Las mediciones se realizaron en plantas salvajes (WT) tratadas con MOF y en plantas de la línea CP#72 tratada con MOF. La línea CP#72 tratada con agua fue usada como control. A) Gráfico de barras que muestra el valor promedio de el peso fresco de plántulas de 10 días de edad WT Col-0 y plántulas de la línea CP#72 crecidas en presencia de agua(-) o MOF. Cada columna representa el valor medio de 18 plantas \pm ES. B) Fotografía representativa de plántulas de 10 días de edad crecidas en presencia de MOF (MOF) o agua (-) durante 7 días. Resultados similares fueron obtenidos en dos experimentos independientes. Letras distintas sobre las barras indican que hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, p -valor ≤ 0.05 .

5.5 La proteína CgCp estabiliza a las proteínas DELLAs en plantas transgénicas que expresan la CgCP bajo un promotor inducible

El atraso en el crecimiento observado en las plantas que expresan la CgCP y la similitud de los patrones de expresión génica de las plantas que acumulan la CgCP y de las plantas que tienen alterados los niveles de las proteínas DELLAs, llevó a estudiar los niveles de acumulación de estas proteínas durante la expresión de CgCP por medio de la técnica de microscopia confocal. Con este propósito, se cruzaron plantas transgénicas de la línea CP#72 con plantas transgénicas que expresan a la proteína DELLA RGA fusionada a la proteína verde fluorescente (pRGA::GFP-RGA)(CP#72/pRGA::GFP-RGA). Estas líneas fueron llevadas a homocigosis y mediante la técnica de PCR se analizó la presencia de ambos transgenes.

Usando la línea homocigota que porta ambos transgenes, se evaluaron los niveles de RGA-GFP en plántulas tratadas con el inductor (MOF) o plántulas tratadas con agua en presencia de GA₃ (GA₃) (10 μM). La detección de RGA-GFP fue realizada en el estadio de plántulas debido a que es en este estadio en el cual la acumulación de RGA en los núcleos puede ser fácilmente detectada por medio del uso de microscopia confocal (Navarro et al., 2008). Por medio de este ensayo se observó la degradación de la proteína RGA-GFP luego del tratamiento con GA en plantas CP#72/pRGA::GFP-RGA no inducidas (Figura 5.8 A). Mientras que las plantas que expresaban la CgCP mostraron un atraso en la degradación de la proteína RGA-GFP mediada por GA (Figura 5.8 A).

Con el objetivo de cuantificar la cantidad de proteína GFP-RGA que se acumulaba en los núcleos de las células de Arabidopsis, se procedió a analizar la intensidad de fluorescencia de veinte núcleos tomados al azar de cinco plantas diferentes. Este análisis fue realizado por medio del programa Image J. La metodología empleada para la cuantificación se detallada en MyM. Este análisis mostró que no hay diferencias estadísticamente significativas en los niveles de acumulación de GFP-RGA entre plantas CP#72/RGA::GFP-RGA tratadas con MOF y plantas CP#72/RGA::GFP-RGA tratadas con agua, previo al agregado de GA₃. Luego del agregado GA₃, la fluorescencia de GFP-RGA disminuyó significativamente en los núcleos de las plantas transgénicas CP#72/RGA::GFP-RGA tratadas con agua (Figura 5.8 B). En contraste, en las plantas CP#72/RGA::GFP-RGA tratadas con MOF, la fluorescencia de GFP-RGA no se redujo luego del agregado de GA₃.(10 μM) (Figura 5.8 B). En conclusión, estos experimentos demuestran que la proteína CgCP estabiliza a las proteínas DELLA y en consecuencia altera la expresión de genes blancos de DELLA.

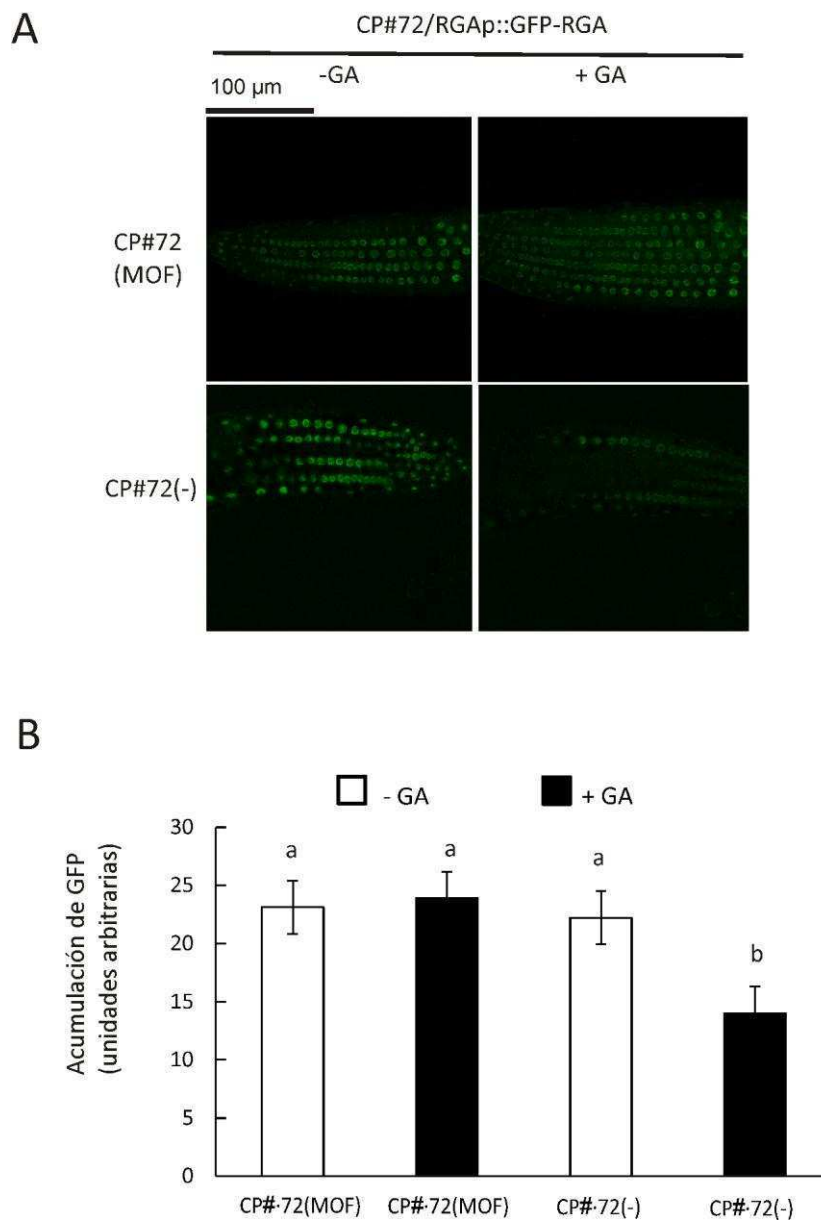


Figura 5.8. A) La expresión de la CgCP estabiliza a las proteínas DELLAs Fluorescencia de GFP observada en raíces de plántulas de la línea CP#72/RGAp::GFP-RGA tratadas con MOF (MOF) y tratadas con agua (-). Luego de tres días del tratamiento con el inductor, las plántulas fueron tratadas con 10 μ MGA₃ (+GA) o con agua (-GA) por 1 h. El experimento fue repetido dos veces con resultados similares. B) El gráfico de barras muestra los niveles de acumulación de GFP presentes en los núcleos de *A. thaliana*. La metodología empleada para la cuantificación se describe en MyM.

5.6 La infección con TMV-Cg estabiliza a las proteínas DELLA en el hospedante *N. benthamiana*

Basados en los resultados obtenidos en las plantas transgénicas que expresan la proteína de CgCP bajo un promotor inducible, se procedió a estudiar el efecto del virus TMV-Cg sobre la estabilización de las proteínas DELLA. Para este experimento, plantas de *Nicotiana benthamiana* fueron inoculadas con el virus TMV-Cg o con buffer (mock-inoculadas). Luego de 6 días post infección, las hojas superiores fueron agroinfiltradas con una construcción que expresa la proteína DELLA GAI fusionada a YFP (cedida por el Dr. Gallego-Bartolomé; Gallego-Bartolomé et al., 2011). La especie *N. benthamiana* fue empleada para este ensayo debido a que plantas de esta especie muestran una buena expresión de la proteína YFP-GAI y una fácil detección usando un microscopio de fluorescencia (Lozano-Durán et al., 2011). Tres días luego de la agroinfiltración, la acumulación de YFP-GAI fue detectada tanto en plantas de *N. benthamiana* infectadas con el virus TMV-Cg como en plantas mock-inoculadas. Ambos set de plantas fueron tratadas con una solución de GA₃ (100 μM) y una hora más tarde fueron observadas bajo el microscopio de fluorescencia. En ambos casos, los niveles de fluorescencia decrecieron luego del tratamiento con GA₃, pero la reducción fue mayor en plantas mock inoculadas que en plantas infectadas con TMV-Cg (Figura 5.9 A).

Para cuantificar la cantidad de proteína YFP-GAI que se acumulaba en los núcleos de células de *N. benthamiana*, se analizó la intensidad de la fluorescencia de YFP-GAI en veinte núcleos tomados al azar en cinco plantas diferentes para cada tratamiento usando el programa ImageJ Software (para más detalles ver la sección de Materiales y Métodos). La intensidad de la fluorescencia acumulada en los núcleos de células infectadas con el virus TMV-Cg no presentó diferencias estadísticamente significativas respecto de la intensidad de la fluorescencia detectada en los núcleos de células inoculadas con buffer (Figura 5.9 B). Como era esperable, el tratamiento con GA₃ produjo una reducción en los niveles de intensidad de fluorescencia en los núcleos de células provenientes de plantas inoculadas con buffer, respecto de los niveles de acumulación de fluorescencia detectados en los núcleos provenientes de plantas inoculadas con buffer, previo al tratamiento con GA₃ (Figura 5.9 B). Por el contrario, el tratamiento con GA₃ no alteró significativamente los niveles de intensidad de fluorescencia de YFP-GAI detectados en

núcleos provenientes de plantas infectadas con el virus TMV-Cg, respecto de los niveles de la intensidad detectados en los núcleos de plantas infectadas previo al tratamiento con GA₃ (Figura 5.9B). En resumen, estos resultados muestran claramente que la infección con el virus TMV-Cg atrasa la degradación de las proteínas DELLAs mediada por GA en el hospedante *N. benthamiana*.

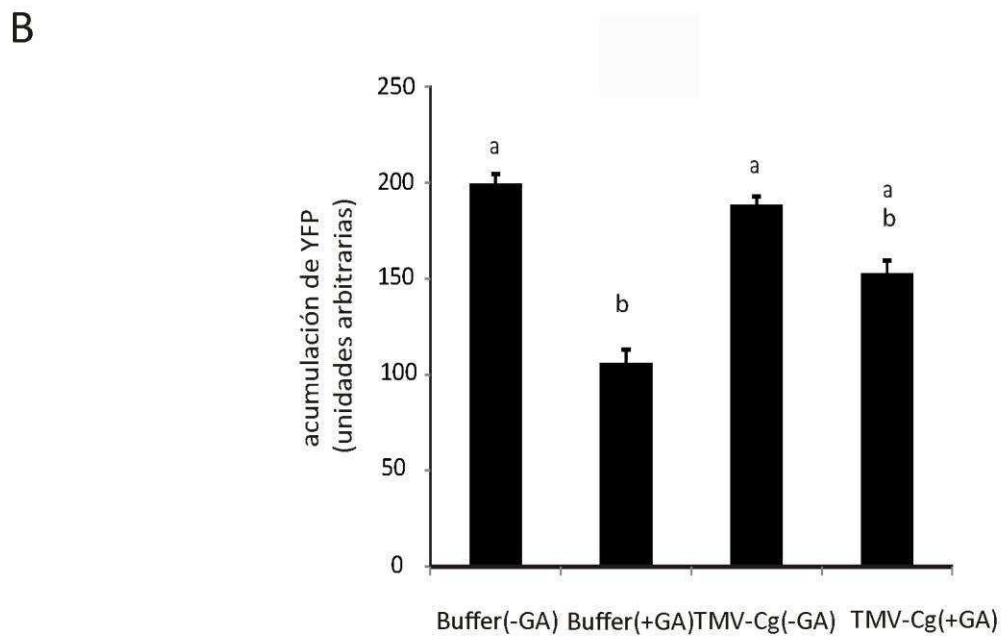
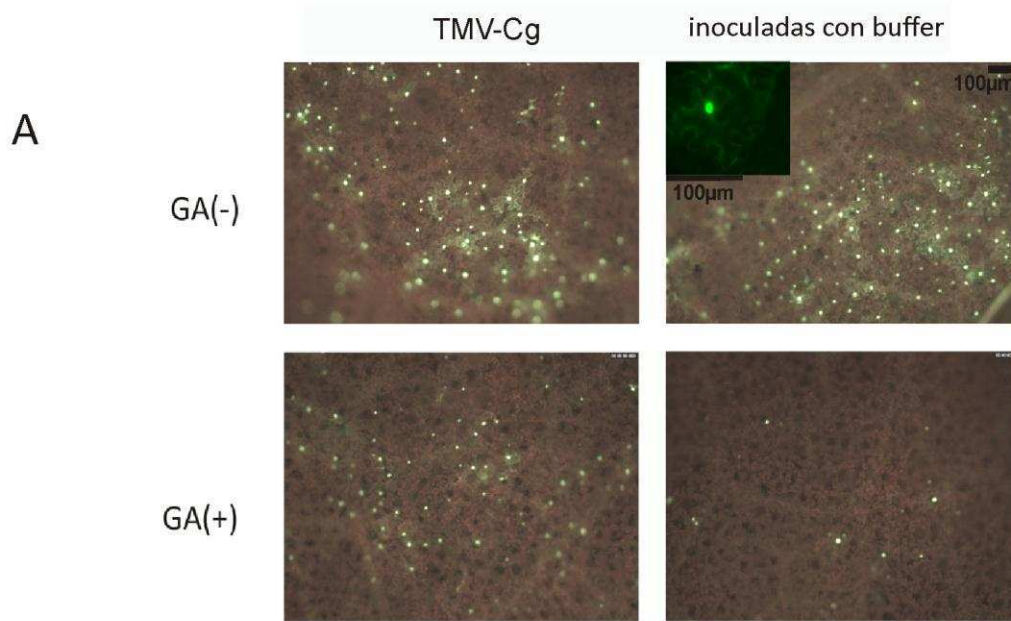


Figura 5.9. Las proteínas DELLAs son estabilizadas durante la infección con el virus TMV-Cg. A) Acumulación de YFP-GAI observada en el núcleo de células de *N. benthamiana* por medio del microscopio de fluorescencia. Plantas de *N. benthamiana* infectadas con el virus TMV-Cg y plantas mock-inoculadas fueron agroinfiltradas con una solución de *Agrobacterium* portando un plásmido que codifica para la proteína YFP-GAI. Luego de 72 hs post-agroinfiltración, las hojas fueron tratadas con una solución de 100uMGA₃ (GA+) o con agua (GA-) y seguidamente fueron observadas al microscopio una hora más tarde. Este experimento fue repetido tres veces con resultados similares. B) El gráfico de barras muestra los niveles de acumulación de YFP presentes en los núcleos de células de *N. benthamiana*. La metodología empleada para el análisis cuantitativo se describe en MyM.

En paralelo, se analizaron los síntomas producidos por el virus TMV-Cg durante la infección de plantas de *Arabidopsis thaliana*. Para ello, se cuantificaron la altura (medida a las seis semanas de edad) y el tiempo de transición floral. Las plantas infectadas con el virus TMV-Cg presentaron menor altura y un atraso en la transición floral (Figura 5.10). Este fenotipo concuerda con la estabilización de las proteínas DELLA observada en *N. benthamiana*.

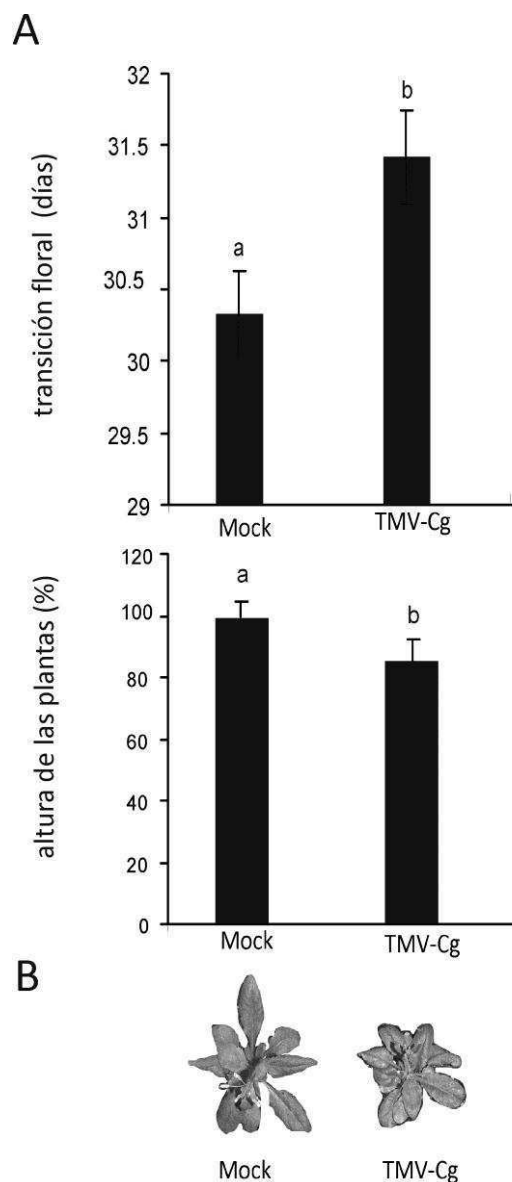


Figura 5.10 La infección con el virus TMV-Cg reduce el crecimiento y atrasa el tiempo de transición floral. La tercera hoja de plantas Col-0 no transgénicas (en el estadio 1.08) fue inoculada con el virus TMV-cg. Las mediciones fueron realizadas en plantas infectadas con el virus TMV-Cg y en plantas inoculadas con buffer. La determinación de la altura de las plantas fue realizada a las seis semanas de edad C) Fotografía representativa de plantas infectadas con el virus TMV-Cg y plantas mock-inoculadas de seis semanas de edad.

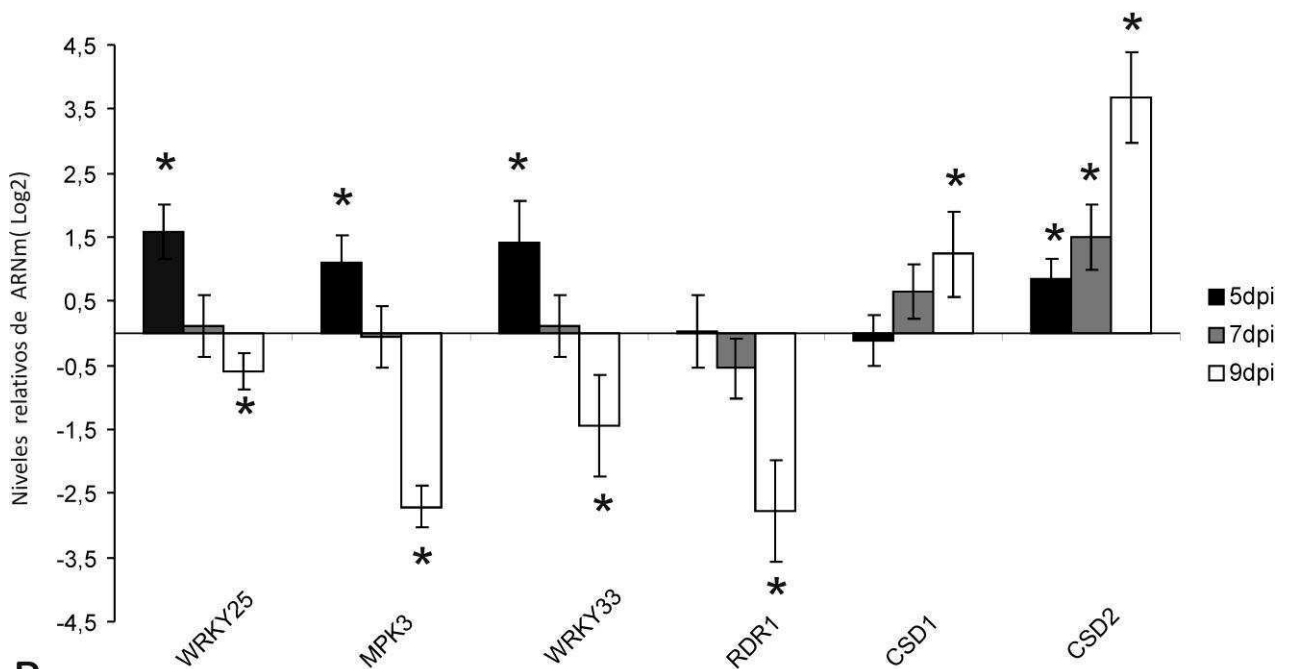
5.7 Las proteínas DELLAs modulan la expresión de genes durante la infección con el virus TMV-Cg

La estabilización de las proteínas DELLAs durante la infección del virus TMV-Cg llevó a indagar si estas proteínas modulaban la expresión de genes durante las infecciones virales. Para ello, plantas no mutantes de *Arabidopsis thaliana* fueron infectadas con el virus TMV-Cg, luego se tomaron muestras a los 5, 7 y 9 dpi y se cuantificaron los niveles de acumulación de un set de transcritos cuya expresión es dependiente de los niveles de DELLA (transcritos blancos de DELLA) por medio de la técnica de RT-qPCR. Como se muestra en la figura 5.11 A, los niveles de los transcritos codificados por los genes *WRKY25*, *WRKY33*, *MPK3* se incrementaron en plantas infectadas con el virus TMV-Cg a los de 5 días post infección respecto a los niveles de plantas no infectadas (Figura 5.11A). Sin embargo, a 7 dpi no se observaron diferencias en los niveles de expresión de los transcritos analizados en plantas infectadas versus plantas inoculadas con buffer. A 9 dpi, los niveles de estos transcritos mostraron una reducción en las plantas infectadas respecto de los niveles acumulados en las plantas inoculadas con buffer. (Figura 5.11 A). Por otra parte, el nivel del transcrito codificado por *RDR1* no presentó diferencias significativas, a 5 y 7 dpi, en las plantas infectadas con el virus TMV-Cg, respecto de los niveles detectados en las plantas inoculadas con buffer. Mientras que a 9 dpi, el transcrito codificado por *RDR1* mostró una fuerte reducción en los niveles de expresión en las plantas infectadas con el virus TMV-Cg respecto de los niveles acumulados en las plantas inoculadas con buffer.

En paralelo, se procedió a analizar la expresión de otros dos genes blancos de DELLA, *CSD1* y *CSD2*, durante el progreso de la infección viral. El transcrito codificado por *CSD1* no mostró un incremento de su expresión a 5 dpi, pero su abundancia fue incrementada a 7 y 9 dpi. Por otro lado, el transcrito codificado por *CSD2* mostró un pequeño incremento a 5 dpi y un mayor incremento a 7 y 9 dpi (Figura 5.11 A). Ambos transcritos, *CSD1* y *CSD2*, son regulados por DELLA como lo muestran publicaciones previas (Achard et al., 2008). Estos resultados sugieren que las proteínas DELLA modulan los perfiles transcripcionales a medida que la infección con el virus TMV-Cg progresa. Por otra parte, cuando las plantas cuádruple mutantes de DELLA fueron inoculadas con el virus TMV-Cg los niveles de expresión de *WRKY25*, *WRKY33* y *MPK3 RDR1* no fueron alterados comparados con los niveles detectados en las plantas cuádruple mutantes inoculadas con buffer a 7 y 9 dpi (Figura 5.11 B). Además, los niveles de los transcritos *CSD1* y *CSD2* permanecieron inalterados en las plantas cuádruple mutantes infectadas

con el virus TMV-Cg respecto de los niveles detectados en plantas cuádruple mutantes inoculadas con buffer (Figura 5.11 B). En resumen, la reducción de la expresión de *WRKY25*, *WRKY33*, *MPK3* and *RDR1* y el incremento de la expresión de los transcritos codificados por *CSD1* y *CSD2*, observada a tiempos tardíos de la infección viral en las plantas salvajes, sugiere que a medida que progresa la infección viral las proteínas DELLA modulan los perfiles transcripcionales. Por otra parte, el ensayo realizado empleando plantas cuádruple mutantes de DELLA confirma que la modulación la expresión génica observada a tiempos tardíos de la infección viral es dependiente de las proteínas DELLAs.

A



B

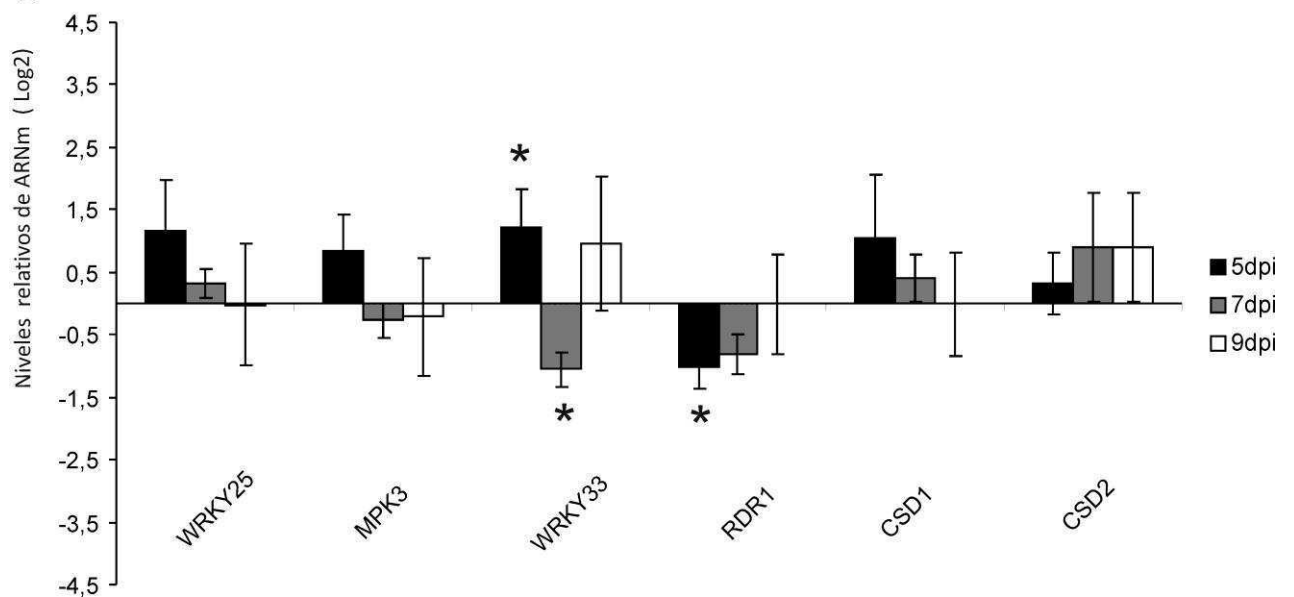


Figura 5.11. Las proteínas DELLAs modulan el perfil de expresión génica durante la infección con el virus TMV-Cg. A) Los niveles relativos de mRNA de WRKY25, WRKY33, MPK3, RDR1, CSD1, y CSD2 fueron determinados por medio de la técnica de RT-qPCR en plantas TMV-Cg infectadas WT Ler y comparadas con los niveles en plantas WT Ler mock-inoculadas a 5, 7 y 9 dpi. Los niveles de expresión en plantas mock inoculadas fue fijado arbitrariamente en uno ($\text{Log}_2(1)=0$). B) Los niveles de expresión de WRKY25, WRKY33, MPK3, RDR1, CSD1 y CSD2, fueron determinados en plantas cuádruple DELLA mutantes infectadas con el virus TMV-Cg y comparados con los niveles en plantas cuádruple DELLA mutantes mock-inoculadas a 5, 7 y 9 dpi. Los niveles de expresión en plantas cuádruple DELLA mutantes mock inoculadas fue fijado arbitrariamente en uno ($\text{Log}_2(1)=0$). A) y B) Se muestra el valor medio \pm ES de cinco réplicas biológicas. Este experimento fue repetido dos veces con resultados similares.

5.8 La estabilización de las proteínas DELLAs atenúa la respuesta de defensa frente al virus TMV-Cg

Para determinar si las proteínas DELLAs tienen un rol en la modulación de los niveles del virus TMV-Cg, se procedió a analizar los niveles de acumulación viral en plantas cuádruple mutantes de DELLAs y en las plantas *gai-1* mutantes y compararlos con los niveles de acumulación viral en plantas no mutantes del cultivar Ler. Este análisis fue realizado empleando la técnica de RT-qPCR a 5 y 7 dpi. Por medio de dicho análisis, se observó una reducción de la acumulación viral en las plantas cuádruple mutantes a 5 y 7 dpi con respecto a las plantas no mutantes (más de 100 veces de reducción) (Figura 5.12). Sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles de acumulación viral entre las plantas *gai-1* y plantas no mutantes (Figura 5.12). Estos resultados sugieren que la modulación de vías de defensa por parte de las proteínas DELLA sería responsable de la reducción de la acumulación viral en las plantas cuádruple mutantes versus las plantas no mutantes.

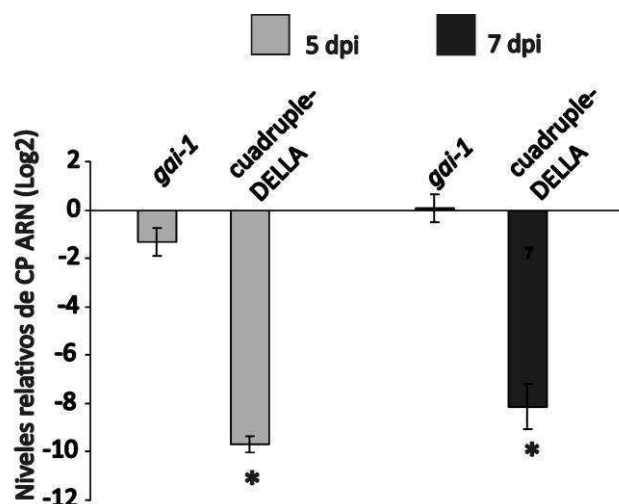


Figura 5.12. Las proteínas DELLAs reducen la acumulación del virus TMV-Cg Niveles relativos de CgCP determinados por la técnica de RT-qPCR en gai-1 y cuádruple-DELLA mutantes a 5 y 7 dpi comparados con los niveles de acumulación del virus TMV-Cg en plantas salvajes. Se muestra el valor medio \pm ES de 7 réplicas biológicas para cada tratamiento. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas (* = P valor < 0.05).

Discusión

5.1 La expresión de la proteína CgCP altera el desarrollo de *A. thaliana*

En los últimos años se han caracterizado, por medio del empleo de plantas transgénicas, el efecto de las proteínas virales individuales en la producción de síntomas (Conti et al., 2012)(Pallas and García, 2011). Por ejemplo, se ha observado que la proteína P2 del virus del enanismo del arroz (*Rice dwarf virus*, RDV) interactúa con una enzima implicada en la biosíntesis de giberelinas, lo que ocasiona una menor acumulación de los niveles de GA₁ y produce el síntoma de enanismo en las plantas de arroz. En este capítulo se estudió el efecto de la expresión de la CgCP sobre el desarrollo de *A. thaliana*. Por medio del empleo de las líneas transgénicas CP#72 y CP#71 se encontró que la CgCP atrasa el crecimiento y el tiempo de la transición floral. Estos cambios en el desarrollo no habían sido previamente reportados en un trabajo previo realizado con esta línea transgénica (Koo et al., 2004), probablemente debido a diferencias en las condiciones experimentales. En el estudio realizado por Koo, el tratamiento con el inductor fue

realizado en un tiempo de desarrollo más tardío (a las 5/6 semanas de edad), a *posteriori* de la transición vegetativo/reproductivo donde la emergencia de las inflorescencias ya ha ocurrido (Boyes et al., 2001). En cambio, en los ensayos presentados en este capítulo la aplicación del inductor se realizó en el estadio de plántulas y en plantas del estadio 1.08, previo a la aparición del tallo caulinar.

El rol de la hormona GA y de las proteínas DELLAs sobre el desarrollo está ampliamente reportado (Bolle, 2004) (Claeys et al., 2012). Frente a cambios ambientales, tanto los niveles de GA y los niveles de las proteínas DELLAs se encuentran altamente regulados (Dubois et al., 2013) (Achard et al., 2008). En particular, se ha observado que la infección de plantas del género *Citrus* con el viroide de la exocortis de los cítricos, produce la reducción de una enzima implicada en la síntesis de GA, reduciendo los niveles de GA₁, una de las giberelinas bioactivas (Vidal et al., 2003). Por otra parte, la información por medio del ensayo de microarreglos presentada en el capítulo cuarto muestra que la CgCP altera la expresión de un conjunto de genes que también son regulados por las proteínas DELLAs (Figura 5.1). Además, se ha reportado que las proteínas DELLAs modulan negativamente la expresión de genes de respuesta a SA (Navarro et al., 2008), lo que podría explicar el efecto de la CgCP sobre la modulación negativa de la vía de SA. En conjunto, estas evidencias llevaron a caracterizar el rol de las proteínas DELLAs durante la expresión de la CgCP.

5.2 La proteína CgCp estabiliza a las proteínas DELLAs

En este capítulo se demostró que la CgCP retrasa la degradación de la proteína GFP-RGA mediada por GA (Figura 5.8 A y 5.8 B). Además, se observó un incremento de la expresión de genes blancos de DELLA en plantas que expresan la CgCP (Figura 5.3). Recientemente, se ha sugerido que los virus podrían inactivar a las enzimas E3 ligasas para proteger a las proteínas que son inestables (Alcaide-Loridan and Jupin, 2012). Por otra parte, se ha demostrado que la proteína C2/L2 de un geminivirus interactúa con un componente del signalosoma (complejo CSN), el componente COP9, comprometiendo la actividad del complejo CSN sobre un subgrupo de E3 ubiquitín ligasas, denominadas SCF-ubiquitín ligasas o ligasas que portan la subunidad CUL-1 (Lozano-Durán et al., 2011). En consecuencia, este subgrupo de ligasas se encuentra alterado en las plantas que

expresan la proteína viral C2/L2. Dado que estas ligasas están implicadas en la regulación de varios factores regulatorios de vías hormonales, las plantas que expresan la proteína C2 tienen alteradas varias vías de señalización hormonal, entre ellas la vía de respuesta a la hormona GA.

Basados en las evidencias previas, es posible suponer que la proteína de CgCP estabiliza a las proteínas DELLAs por medio de la alteración de un componente de la maquinaria del proteasoma. Alternativamente, el efecto de la proteína CgCP sobre la estabilización de DELLA podría ser explicada por medio de la alteración de un componente específico de la vía de señalización de GA. Por ejemplo, en ensayos realizados con plantas de arroz infectadas con el virus RDV se observó que la proteína P2 del virus RDV interactúa con una enzima tipo ent-kaurene oxidasa que está implicada en la biosíntesis de las giberellinas. Como consecuencia, las plantas infectadas muestran una reducción de los niveles de GA₁ respecto de los niveles detectado en plantas no inoculadas (Zhu et al., 2005). Además, los niveles de GA reducidos en las plantas de arroz infectadas con RDV ocasionan una reducción en la altura de las plantas respecto de la altura de plantas no infectadas (Zhu et al., 2005). Estas evidencias muestran que los cambios en los niveles de la hormona GA, o bien la alteración de un componente implicado en la señalización de GA, son responsables de algunos de los síntomas observados durante las infecciones virales. En esta misma línea, en el presente capítulo se demostró que la CgCP reduce el crecimiento de las plantas tanto en el estadio de plántula, como en plantas adultas (Figuras 5.5, 5.6 y 5.7). En conjunto, la proteína CgCP estabiliza a las proteínas DELLAs, altera la expresión de genes dependientes de DELLA y como resultado, reduce el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*.

5.3 El rol de las proteínas DELLAs en la modulación de la defensa antiviral

El rol de las proteínas DELLAs en la modulación de la respuesta de defensa frente a patógenos bacterianos ha sido previamente caracterizada por Navarro et al (Navarro et al., 2008). Sin embargo, el rol de estas proteínas sobre la modulación de vías de señalización antiviral no había sido caracterizado previo al desarrollo de este trabajo. El estudio del rol de las proteínas DELLAs sobre las vías de defensa antivirales es de importancia ya que los virus poseen componentes específicos involucrados en la vía de

defensa mediada por la hormona SA. Uno de estos componentes, el gen *RDR1*, codifica para una proteína implicada en el mecanismo de silenciamiento de RNA. *RDR1* es requerido para el mantenimiento de la resistencia basal contra varios virus de RNA, incluyendo el virus TMV (Xie et al., 2001). Además, al infectar plantas *rdr1* mutantes con el virus TMV-Cg se observa una mayor acumulación viral tanto en las hojas inoculadas como en las hojas sistémicas (Yu et al., 2003c). Aparte del rol directo de la proteína RDR1 en la resistencia viral, esta proteína también jugaría un rol indirecto en la regulación de la expresión de otros genes de defensa en *N. tabacum* (Rakhshandehroo et al., 2009) Particularmente, se ha observado que los niveles de expresión del gen *AOX1A* son incrementados en plantas salvajes luego de la infección con el virus PVY, mientras que los niveles de expresión de *AOX1A* no se incrementan en plantas *rdr1* mutantes luego de la infección con el virus PVY. La regulación de la expresión de *AOX1A* por parte de la proteína RDR1 es muy relevante ya que se ha propuesto que *AOX1A* está involucrado en la resistencia antiviral mediada por SA en plantas de tabaco susceptibles (Chivasa et al., 1997).

En el presente capítulo se estudió la expresión de los genes *RDR1* y *AOX1A* en plantas cuádruple mutantes de *DELLA* y en plantas *gai-1* mutantes. Se observaron niveles reducidos de expresión de *AOX1A* y de *RDR1* genes en plantas *gai-1* mutantes comparadas con plantas non-mutantes del cultivar Ler (Figura 5.4). En contraste, las plantas cuádruple mutantes mostraron niveles superiores de expresión de *AOX1A* y *RDR1* que las plantas no mutantes (Figura 5.4). Varios reportes han mostrado que las especies reactivas de oxígeno (ROS) están involucradas en eventos de señalización de vías de defensa y que además potencian la señalización mediada por SA (Noshi et al., 2012) (Manacorda et al., 2013). Particularmente, se ha mostrado que niveles altos de ROS incrementan la inducción de *RDR1* mediada por SA (Liao et al., 2013). Además, tanto SA como el peróxido de hidrógeno están involucrados en la inducción de *AOX1A* (Wagner, 1995) (Maxwell et al., 2002). Las proteínas *DELLA* incrementan la expresión de genes de detoxificación de ROS y en consecuencia los niveles de ROS son reducidos (Achard et al., 2008). Basados en estos resultados, es posible sugerir que las proteínas *DELLA* podrían estar atenuando la expresión de *RDR1* y *AOX1A* por medio de la alteración de los niveles de ROS. Por otro lado, el rol de las proteínas *DELLA* en la regulación negativa de la expresión de genes involucrados en defensa antiviral sugiere que la estabilización de las

proteínas DELLAs durante la infección con el virus TMV-Cg contribuiría a incrementar la susceptibilidad frente a este virus.

5.4 El rol de las proteínas DELLAs durante la infección con el virus TMV-Cg

Las proteínas DELLA son estabilizadas durante varios estreses, bióticos y abióticos (Navarro et al., 2008; Dubois et al., 2013), y durante la expresión de proteínas virales (Lozano-Durán et al., 2011). Sin embargo, el rol de las proteínas DELLAs durante las infecciones virales no había sido descrito antes de la realización de esta tesis. En este capítulo se observó que el virus TMV-Cg atrasa la degradación de las proteínas DELLA mediada por GA en plantas de *N. benthamiana* (Figura 5.9A y 5.9 B). Además, se observó que el virus TMV-Cg produce un atraso de la transición floral y una reducción en la altura de las plantas a en *Arabidopsis thaliana* (Figura 5.10). Estos resultados están de acuerdo con un impacto en la actividad de las proteínas DELLAs durante las respuestas de estrés. La estabilización de las proteínas DELLA durante las infecciones con virus TMV-Cg, sugiere que la alteración de los niveles de esta proteínas DELLA alteraría la expresión de genes durante la infección con el este virus. El análisis de la expresión de genes regulados por DELLA en plantas salvajes mostró que a medida que la infección con el virus TMV-Cg progresaba se producía una reducción en los niveles de expresión de genes de respuesta a SA (Figura 5.11 A), mientras que en las plantas cuádruple mutantes de DELLA infectadas con el virus TMV-Cg no se producía la reducción de la expresión de los genes de respuesta a SA (Figura 5.11 B). En paralelo, se observó que a medida que la infección con el virus TMV-Cg progresaba, se incrementaban los niveles de dos genes blancos de las proteínas DELLAs, *CSD1* y *CSD2* (Figura 5.11 A). Contrariamente, los niveles de expresión de estos genes no se alteraron en plantas DELLA cuádruple mutantes infectadas con el virus TMV-Cg en comparación de los niveles observados en plantas cuádruple mutantes no infectadas (Figura 5.11 B). Basados en estos resultados, se propuso un modelo para explicar el rol de las proteínas DELLAs en la modulación de la respuesta de genes de SA durante la infección con el virus TMV- Cg (Figura 5.13). Este modelo propone que a medida que la infección viral progresa, la proteína CgCP estabiliza a las proteínas DELLA. A su vez, las proteínas DELLA incrementan los niveles de expresión de los genes de detoxificación de ROS, reduciendo los niveles de estas moléculas señalizadoras. En

consecuencia, niveles reducidos de ROS atenúan la respuesta de genes de respuesta a SA.

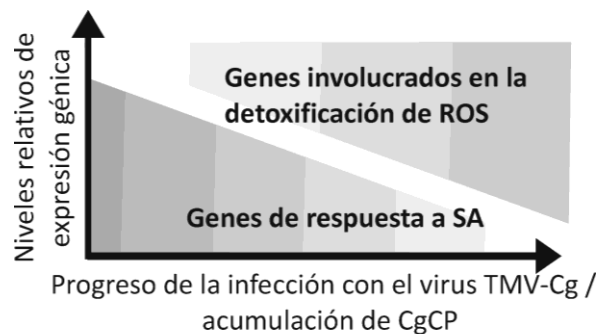


Figura 5.13: **Modelo propuesto para explicar el rol de las proteínas DELLAs sobre la modulación de la expresión de genes de respuesta a SA durante la infección con el virus TMV-Cg.** A medida que la infección viral progresa, la acumulación de la CgCP estabiliza a las proteínas DELLAs incrementando genes de detoxificación de ROS. En paralelo, la estabilización de las proteínas DELLAs regula negativamente la expresión de genes de respuesta a SA.

En base a los resultados obtenidos se puede sugerir que la CgCP produce un incremento de la susceptibilidad del hospedante por medio de la atenuación de la expresión de los genes de respuesta a SA regulados por DELLA. De acuerdo con esta hipótesis, se observó que las plantas cuádruple-DELLA mutantes (en las cuales los genes de defensa están sobre-representados) acumulaban aproximadamente 100 veces menos de la proteína de cápside que las plantas no mutantes infectadas. Sin embargo, los niveles de acumulación de la cápside no mostraron diferencias significativas en las plantas *gai-1* mutantes en comparación con los niveles detectados en plantas no mutantes infectadas (Figura 5.12). De igual modo, experimentos realizados por otros grupos han mostrado que plantas transgénicas deficientes en la acumulación de la hormona SA e inoculadas con el virus ORMV (un virus muy similar al virus TMV-Cg) son igualmente susceptibles que las plantas salvajes (Huang et al., 2005). En el trabajo de Huang et al., se sugiere que los virus podrían estar contrarrestando las defensas mediadas por SA durante las infecciones compatibles y en consecuencia, el grado de susceptibilidad frente a la infección viral de plantas salvajes sería similar al grado de susceptibilidad de plantas deficientes en la acumulación de SA (Huang et al., 2005). La modulación negativa de las vías de defensa

mediadas por SA observada en plantas salvajes infectadas con el virus TMV-Cg avala esta hipótesis.

En resumen, los resultados presentados en este capítulo muestran que las proteínas DELLAs modulan negativamente la expresión de genes involucrados en vías de defensa antiviral y, por consiguiente, la ausencia de estas proteínas produce una reducción del grado de susceptibilidad del hospedante frente al virus TMV-Cg.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente capítulo permiten concluir que:

- La expresión de la proteína CgCP estabiliza a las proteínas DELLAs y atrasa el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*
- Las proteínas DELLAs actúan modulando negativamente las defensas antivirales.
- El virus TMV-Cg estabiliza a las proteínas DELLAs que a su vez, atenúa la inducción de vías de señalización de defensa a medida que progresa la infección viral.
- La atenuación de vías de defensa promueve la susceptibilidad del hospedante frente al virus TMV-Cg.

CAPÍTULO 6: DISCUSIÓN GENERAL

El estudio de la alteración de la expresión génica durante las infecciones virales es de gran importancia para entender los mecanismos involucrados en la defensa frente a esta clase de patógenos y, de este modo, poder contribuir a desarrollar estrategias, o bien mejorar las estrategias existentes, con el objetivo de disminuir las pérdidas económicas ocasionadas por los virus.

En la presente tesis se estudió el rol de una de las proteínas virales del virus TMV-Cg, la proteína CgCP, sobre la modulación de la expresión génica del hospedante *A. thaliana*. Los resultados obtenidos en el tercer capítulo de este trabajo de investigación permiten concluir que la proteína CP del virus TMV-Cg disminuye la expresión de genes de la vía de señalización de la hormona SA, entre ellos el gen *RDR1*. En un trabajo previo realizado por Conti et al (2012), ya se había reportado el rol de la proteína de cápside de otro Tobamovirus, el virus TMV, en la modulación negativa de la expresión de genes de respuesta a SA. De modo que los resultados presentados en esta tesis confirman y amplían las evidencias previas sobre el rol de la CP en la modulación negativa de la vía de señalización mediada por la hormona SA.

El análisis del rol de la CgCP sobre la expresión génica de *A. thaliana* fue completado empleando un perfil de expresión realizado en plantas que expresan la CgCP bajo un promotor inducible (capítulo cuarto). El análisis de este ensayo permitió determinar un grupo de genes cuya expresión es alterada por la CgCP. Por medio de un análisis de bioinformático, se clasificaron a estos genes en categorías GO y se determinaron las categorías GO sobre-representadas. Interesantemente, al analizar las categorías GO sobre-representadas dentro del grupo de genes de cuya expresión disminuye durante la expresión de la CP, se encontró un grupo de genes involucrados en vías de defensa. Con el objetivo de estudiar si estos genes integran una vía de señalización común, se procedió en primera instancia a realizar un análisis de co-expresión. Este análisis mostró que estos genes integran una red de co-expresión lo que sugiere que podrían estar involucrados en una misma vía de señalización. Este análisis fue completado con la búsqueda de elementos regulatorios en las regiones promotoras de los genes-coexpresados. Dicho análisis permitió encontrar un módulo, presente dentro de la red de co-expresión, integrado por genes que comparten los motivos regulatorios TL1ATSAR y

W-NPR1BOX los cuales están presentes en genes regulados por NPR1 y en el promotor de NPR1 respectivamente (Wang et al, 2005; Yu et al, 2001). Por medio de la técnica de RT-qPCR, se estudió la expresión de un subgrupo de estos genes en plantas que expresan la CgCP, observándose menores niveles de expresión de estos genes respecto de los niveles de expresión en plantas que no expresan la CgCP. En conjunto, estos resultados apoyan las evidencias previas sobre el rol de la CP en la modulación negativa de la vía de señalización mediada por la hormona SA y sugieren que la CgCp alteraría la expresión de genes dependientes de los factores W-BOX y NPR1.

Por otra parte, en el capítulo cuarto se procedió a analizar la expresión de los genes que presentan los motivos TL1ATSAR y W-NPR1BOX en sus regiones promotoras en plantas infectadas con el virus TMV-Cg. Por medio de este ensayo se observó que este conjunto de genes incrementa su expresión a tiempos tempranos de la infección con el virus TMV-Cg, mientras que a tiempos tardíos la expresión de estos genes disminuye. Considerando que a medida que progresa la infección viral los niveles de acumulación de CgCP son mayores y la que CgCP disminuye la expresión de genes que presentan los motivos TL1ATSAR y W-NPR1BOX, es posible suponer la CgCP estaría involucrada en la regulación negativa de la expresión de estos genes a tiempos tardíos de la infección viral.

En el quinto capítulo se analizó el efecto de la CgCP sobre la estabilidad de las proteínas DELLAs. Como se mencionó previamente, la estabilización de las proteínas DELLAs modula negativamente de la vía de SA (Navarro et al., 2008), generando una mayor susceptibilidad frente a los patógenos biotrofos. En el caso de los patógenos virales el rol de las proteínas DELLAs durante las infecciones virales no había sido analizado hasta el desarrollo de la presente tesis. Por medio de ensayos de microscopia de fluorescencia, se demostró que la CgCP retrasa la degradación de la proteína GFP-RGA mediada por GA. Además, se observó que el virus TMV-Cg retrasa, a su vez, la degradación de la proteína GFP-RGA. Los resultados obtenidos en el capítulo quinto llevaron a proponer un modelo que explica el impacto de estabilización de las proteínas DELLAs durante el desarrollo de infección viral. Este modelo plantea que a medida que progresa la infección viral se acumulan mayores niveles de la proteína de cápside lo que produce la estabilización de las proteínas DELLAs y, en consecuencia, disminuyen los niveles de expresión de genes de respuesta a SA (Figura 5.13). La estabilización de las proteínas DELLAs también tiene un impacto en los niveles de acumulación del virus TMV-Cg. Las plantas cuádruple mutantes

de DELLA acumulan menores niveles del virus TMV-Cg que las plantas salvajes, lo que implica que la ausencia de las proteínas DELLAs produce un incremento de la tolerancia frente al virus TMV-Cg.

En conjunto, los resultados presentados en esta tesis muestran que la CgCP modula la expresión génica del hospedante *A. thaliana*, disminuyendo la expresión de genes implicados de la vía del SA. Entre los genes de la vía de SA cuya expresión es disminuída por la CgCP, se encuentra un subgrupo de genes que poseen los motivos TL1ATSAR y W-NPR1BOX en sus regiones promotoras. Para finalizar, se propone que la estabilización de las proteínas DELLAs durante la expresión de la CgCP contribuiría a modular negativamente la vía de señalización mediada por SA.

APÉNDICE A: Selección de genes de referencia para los análisis de expresión génica mediante RT-qPCR

Con el objetivo de obtener datos de expresión relativa confiables y de alta repetibilidad es de vital importancia seleccionar genes de referencia endógenos, cuya expresión permanezca estable en las condiciones experimentales empleadas para ser usados como controles internos en la normalización de los datos.

En este trabajo se seleccionaron tres genes de referencia para realizar el análisis de estabilidad: el factor de elongación 1 alfa, ubiquitina y gliceraldehído fosfato deshidrogenasa. Se obtuvieron oligonucleótidos para cada uno de los genes candidatos y se llevaron a cabo tres reacciones de RT-qPCR diferentes (una para cada gen candidato) a partir de cinco réplicas biológicas de todas las líneas transgénicas y de las plantas salvajes. Los datos de fluorescencia fueron procesados mediante el software LinRegPCR y los valores de CT fueron utilizados para analizar la estabilidad de expresión mediante dos métodos diferentes.

El *Normfinder* (Andersen et al. 2004) analiza la estabilidad de expresión mediante un modelo matemático que considera las variaciones intra e intergrupos de los datos. Este análisis consideró al gen UBIQ5 como el transcripto más estable (valor de estabilidad= 0,13) seguido de EF-1 alfa (Valor de estabilidad=0,65). GAPDH fue el menos estable de los tres con un valor de estabilidad de= 14,24).

La aplicación del *Bestkeeper* (Pfaffl et al, 2004) analiza la variabilidad de expresión mediante la estimación del desvío estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV) de cada gen y luego realiza comparaciones de a pares considerando un gen de referencia ideal que denomina *bestkeeper*. Esta aplicación mostró valores de estabilidad muy similares para el EF1 alfa (SD=0,46) y el gen UBIQ5 (SD= 0,50), siendo el EF-1 alfa un poco más estable. Por otra parte, consideró que el transcripto menos estable es GAPDH.

En resumen, los genes más estables resultaron ser *UBQ5* y EF-1-alfa. Se procedió a seleccionar el gen *UBQ5* dado que presentó una mayor estabilidad que el EF-1-alfa por medio del programa Normfinder y una estabilidad muy similar al EF-1-alfa por medio del programa Bestkeeper.

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

El empleo de las reglas MIQE (Bustin *et al.*, 2010) tiene objetivo asegurar que los protocolos de RT-qPCR sean presentados de manera detallada en la literatura para que puedan ser reproducidos por otros investigadores. Uno de los puntos más importantes a detallarse en estos protocolos es la información sobre las muestras biológicas. Se debe brindar información sobre el material de partida, en particular el tejido empleado y las condiciones de almacenamiento. También se debe analizar la calidad de extracción del ARNm por medio de alguna técnica que permita corroborar la integridad del mismo. En nuestro laboratorio dicha integridad es analizada por medio de la técnica de electroforesis, analizando las bandas correspondientes a los ARN ribosomales. Además, se debe detallar los números de acceso de los genes analizados y las secuencias de los oligos empleados.

La información previa fue resumida en la Tabla 1 siguiendo los requerimientos MIQE (Bustin *et al.*, 2010).

Tabla 1. Condiciones experimentales utilizadas para el análisis de expresión de genes mediante RT-qPCR de acuerdo a los requerimientos MIQE

Diseño experimental

Controles	CP#72 plantas tratadas con agua/ plantas inoculadas con buffer
Tratamientos	CP#72 tratadas con MOF /Plantas infectadas con el virus TMV-Cg
Muestras	
Tipo de muestra	Hojas de Arabidopsis
Procesamiento	Homogenización con nitrógeno líquido
Condiciones de congelamiento	-80°C
Extracción de RNA	
Procedimiento	Extracción fenol-ácido
Reactivos	TRIzol (Invitrogen®)
Detalles del tratamiento con DNAsa	DNase I Amp Grade (Invitrogen), 15 min a temperatura ambiente
Determinación de contaminaciones	<3%
Cuantificación de ácidos nucleicos	Absorbancia a 260 nm
Instrumento	NanoDrop ND-1000; NanoDrop® Technologies

Pureza (A260/ A 280)	>1.8
Integridad del RNA	Análisis mediante electroforesis en geles de agarosa
Transcripción reversa	
Condiciones	De acuerdo a las instrucciones del fabricante Invitrogen
Cantidad de RNA y volumen de reacción	1µg de ARN total en 20 µl de reacción
Oligonucleotidos utilizados	oligo d(T)20 de (Invitrogen®) y oligonucleótidos al azar.
Transcriptasa reversa	MMLVI (Invitrogen®).
Temperatura y tiempo	50 min a 37°C, luego 15 min a 70°C
Protocolo para RT-qPCR	
Condiciones para la reacción	5 min a 95 °C, 40 ciclos de 30 seg a 95°C y 1 min 60 °C
Volumen de reacción y cantidad de cDNA	20µl reacción, 20-200 ng de ARN
Primers, Mg dè y concentración de dNTPs	3 mM Mg2+, 200 nM oligos, 0,2 mM de dNTPs
Polymerasa	<i>Taq Platinum</i> (Invitrogen ®)
<i>Buffer</i>	20 mM Tris-HCL (pH 8,4) y 50 mM KCl
Fabricante del equipo de qPCR	ABI 7500, <i>Applied Biosystems</i>
Validación de Qpcr	
Especificidad	Análisis mediante geles de agarosa y curvas de disociación en cada corrida de qPCR
Método para determinación de eficiencia de las PCRs	Eficiencia media por amplicón calculada mediante el programa LingRegPCR (Ramakers <i>et al</i> , 2003).
Análisis de datos	
Programa para análisis de qPCR	LinRegPCR
Método para determinación de Ct	LinRegPCR
Identificación de datos espúreos	LinRegPCR
Criterios de selección de genes de referencia	Se evaluaron 3 genes de referencia (<i>EF1α</i> , <i>UBQ5</i> , <i>GAPC1</i>) para ensayos de estabilidad mediante tres algoritmos (ver ítem 2.3.2). Se seleccionó UBQ5 como control interno.
Descripción de método de normalización	Pfaffl, 2001)
	$R = \frac{E_{target}^{(control\ Ct\ mean - sample\ Ct\ mean)_{target}}}{E_{reference}^{(control\ Ct\ mean - sample\ Ct\ mean)_{reference}}}$
	Implementado mediante la interface multivariada fgStatistics

Número de réplicas técnicas	2
Método de análisis estadístico	Prueba de permutaciones de a pares (5000)
Programa	Fg Statistics
Repetibilidad (variación intra-ensayo), error estándar de Ct, error standart	0.8

APÉNDICE C: Lista de oligonucleótidos utilizados

Primers usados en el Capítulo 3

óNúmero de accesoión	Gen	Secuencia
At3g22370	<i>AOX1A</i>	CCGACGATTGGAGGTATGAGATT CCGGTGGATTTCGTTCTCTGTTT
At3g56400	<i>WRKY70</i>	CACCAACGCAGAAACTCCCA TTCTCCGTGGACGAACCATG
At1g14790	<i>RDR1</i>	TGGAATTGGGATGAGGAAACTG TCGTCCTTGCGGAGAATGC
NM-116090	<i>UBQ5</i>	CGGACCAGCAGCGATTGATT ACGGAGGACGAGATGAAGCG
D38444	TMV-Cg CP	TGTCGCAATCGTATCAAAC CTGTATCTGGAAACCGCTG

Primers usados en el Capítulo 4

At2g40970	MYBC1	CTTAGATGGGAAGAAGAGCT CCGAGATGATGATTAGGACT
At3g10500	ANAC053	GGTCGTGGCTCAGTAACATC CGGTAACAGAGATAGCATCG
At5g46910	JumonjiF	CTACAGACCAACAAAGGAGGA TCTCTTTCATCAACACAGCG
At1g01250	AP2	GAAGCTATCATCACCACCAGT TTTCCCCATCGGCGTTTGCG
At4g23690	DRP	TTTTACTCTTCTCCGATAC GAGGTTGCGTTTGCTACATTCG
At4g36410	UBC17	GGCAAACCAATCCTCCTTCT TTGGCGTAAAGAGTTCCTGG
At1g19640	JMT	TGGAGGTAATGCGAGTTCT CGTCCATTACTCTTCTGCC
At5g23820		GCCTATGCTACTCCTCCTCG GGTCCGTAATCGTTTCCAT
At1g07350	SR45a	AGAAGGCACAGGTCGGTATCG TCCGAGACTTGCTTCTGCTCTC
At3g60530	GATA4	GAGCACCAGCACCTTCCGTA CCGTAACCGATTCAGCGTTG
At5g15230	GASA4	GTACCCAATGCCATCGGA GCACACAGAGACACTTCTGCA

At1g55020	LOX1	ACCTTGAAGCCGTTGGTGATAG GCCAACTGCCATAGCGAGTC
At1g01720	ATAF1	G TTCAGAGCGAGCCCAAGTG ATCCACGGTGGCATCAATGT
At3g45140	LOX2	TGAAGTGCGGAACATAGGCC GCTGCATGGTGACCTGAGGT
At5g59320	LTP3	ATGGCTTTCGCTTTGAGGTTCT ATGGAGCCAAGCTACCTGCC
At5g57050	ABI2	TGTTCCATTTCAGACCATTCA CGTCGCCAGAACAAGAACT
AT1G02205	CER1	AAGGATGGGAAATGCATGAG TGATGTGGAAGGAGGAGAGG
At3g45640	MPK3	TACACGGATTTTCCGGCGGTGGA TCGGAGGACGATACTTAGA
At5g26920	CBP60g	CGCACCAAGCCGTTGAAACGATG CTGGCTCTTGAGATCCCA
At2g30250	WRKY25	ATGTCTTCCACTTCTTTCACC GTACCCACCAAAGCTCGAC
At3g56400	WRKY70	CACCAACGCAGAAACTCCCA TTCTCCGTGGACGAACCATG
At1g72920	TIR-NBS	ATGTCTTCTGCTACTGCGA CCTTCCAACAAGTTCTTTGT
At4g35770	SEN1	GAATTGGAAACTGGTCATCG TTGTTGTCGTTGCTTTCCTC
AT5G20250	DARKIND10F	GGAGCAGCACAGAGAGAAAAA GCACAGTCTCCATTCCAGGT
At5g06600	UBP12	CTATGATGACTCCGCCTCCCGTT TCGCAGCAGTCTCGGGTTGG
At1g80920	ATJ8	AATCAGATGGAAGGGACGGAGGA CCATCCATCCATTCTTCCCA
At4g39400	BRI	GCGTCCCTTGCTGGTAGTGTG GCCTCTTCTTTCTCCGTCTCTTC
NM-116090	UBQ5	CGGACCAGCAGCGATTGATT ACGGAGGACGAGATGAAGCG
D38444	TMV-Cg CP	TGTCGCAATCGTATCAAAC CTGTATCTGGAAACCGCTG

Primers usados en el Capitulo 5

Número de accession	Gen	Secuencia
At3g22370	<i>AOX1A</i>	CCGACGATTGGAGGTATGAGATT CCGGTGGATTCGTTCTCTGTTT
At3g45640	<i>MPK3</i>	TACACGGATTTTCCGGCGGTGGA TCGGAGGACGATACTTAGA
At5g26920	<i>CBP60g</i>	CGCACCAAGCCGTTGAAACGATG

		CTGGCTCTTGGAGATCCCA
At2g38470	<i>WRKY33</i>	GTTTCAGTCCCTCTCTTTTT GTTCTTGTCTCCTTCATTTA
At2g30250	<i>WRKY25</i>	ATGTCTTCCACTTCTTTTCACC GTACCCACCAAAACTCGAC
At3g56400	<i>WRKY70</i>	CACCAACGCAGAAACTCCCA TTCTCCGTGGACGAACCATG
At1g14790	<i>RDR1</i>	TGGAATTGGGATGAGGAAACTG TCGTCCTTGGGAGAATGC
At1g08830	<i>CSD1</i>	CAAAGAGAGACGAAGCA GCCTTTCTGATCTCAGGA
At2g28190	<i>CSD2</i>	GCTCCAGAAGATGAGTGCCGTCA CCACCCTTTCCGAGGTCATCCTT
NM-116090	<i>UBQ5</i>	CGGACCAGCAGCGATTGATT ACGGAGGACGAGATGAAGCG
At3g63010	<i>GID1b</i>	CAGCTTCACTCATTCTCCGCCA GCGTTCATCCATCGTCGTAAGC
At4g36410	<i>UBC17</i>	GGCAAACCAATCCTCCTTCT TTGGCGTAAAGAGTTCCTGG
At5g50915	<i>bHLH137</i>	TCGAGCTAGAAGAGGCCAAGC TCACAGCCCGGAACAAGGT
At4g23060	<i>IQD22</i>	TTCCTCATACCCATCGTACCG TCCTCATCCTCCACATCG
D38444	Replicase TMV-Cg	GAAGTTCACTTAGAAGAGTTGC AACGGCCTCATCTAACTG
D38444	TMV-Cg CP	TGTCGCAATCGTATCAAAC CTGTATCTGGAAACCGCTG

APÉNDICE D: Lista de genes co-expresados obtenida por medio del programa ATTED-II

Gen	Descripción
At2g26190	Proteína de unión a calmodulina
At5g25440	Proteína perteneciente a familia de quinasas
At4g27490	Factor de seguimiento de manganeso mitocondrial
At1g11330	Proteína quinasa de unión a lectinas
At1g42990	Proteína con un motivo de cierre de leucinas
At3g50950	Proteína de resistencia HOPZ1
At5g47230	Factor de respuesta a etileno 5
At2g40270	Proteína perteneciente a familia de quinasas
At1g69730	Proteína quinasa asociada a pared
At2g27730	proteína de tolerancia a salinidad con motivo dedos de zinc
At2g25735	
At4g21380	Proteína quinasa 3
At3g56710	Proteína de unión a factor sigma
At5g45340	Polipetido 3 perteneciente a la familia 707, subfamilia A de citocromo p450
At3g51890	Proteína perteneciente a la cadena livina de clatrin
At5g60900	Proteína tipo receptor con motivo de proteína quinasas 1
At5g54490	Proteína de unión a PINOID
At3g55980	Proteína inducible por sal con motivo dedos de zinc
At2g23680	Proteína de aclimatación a frío WCOR413
At2g20142	Proteína de resistencia con motivo TIR (Toll-interleukin resistance)
At2g46400	Factor de transcripción WRKY46
At5g52760	Proteína de transporte de cobre
At4g23180	Proteína rica en cisteínas tipo proteína quinasa
At4g27280	Proteína de unión a calcio con motivo EF-hand
At2g22880	Proteína que contiene un motivo VQ
At3g09870	Proteína SAUR de respuesta a auxinas
At2g26440	Invertasa / inhibidor de pectin-metylesteraes
At3g50930	Proteína de síntesis de citocromo BC1
At5g43450	
At2g41730	
At3g05650	Proteína tipo receptor 32
At5g51190	Proteína tipo integrasa con motivo de unión a ADN
At4g26090	Proteína de resistencia con un motivo NB-ARC
At5g19240	Precursor de glico-proteína de unclaje a membrana
At2g31880	Proteína quinasa con motivo de repetición de leucinas
At1g05575	Proteína desconocida
At5g18490	Proteína de función desconocida (DUF946)
At1g29240	Proteína de función desconocida (DUF688)
At4g23130	Proteína tipo receptora con motivo quinasa
At4g14365	XB3
At5g02290	Proteína perteneciente a la familia de quinasas
At1g66880	Proteína perteneciente a la familia de quinasas
At1g11050	Proteína perteneciente a la familia de quinasas
At5g61210	Factor ATSNAP33
At4g36550	Proteína con repetición ARM
At2g40140	Proteína con motivo de unión a zinc

At2g41090	Proteína de unión a calcio con motivo EF-hand
At3g52430	Proteína hidrolasa
At5g52750	Proteína de transporte de metales pesados
At1g72940	Proteína con motivo TIR (Toll-interleukin resistance)
At1g10170	Proteína tipo NF-X 1
At3g16720	Proteína Toxicos en levaduras2
At4g37370	Polipeptido 8, perteneciente a la subfamilia D de citocromo p450
At1g80840	Factor de transcripción WRKY40
At4g18880	Proteína de shock termico A4A
At2g03760	Sulfotransferasa 12
At4g26070	Proteína tipo MAPK quinasa
At1g76700	Proteína de shock termico que contiene un motivo DNAj
At1g16670	Proteína perteneciente a la familia quinasa
At3g27560	Proteína perteneciente a la familia quinasa
At5g27420	Proteína relacionada a la insensibilidad a la relación carbono/ nitrógeno 1
At1g74440	Proteína de función desconocida (DUF962)
At4g05020	NAD(P)H deshidrogenasa B2
At1g32870	Proteína con motivo NAC 13
At2g26530	Proteína de función desconocida (DUF1645)
At1g21270	Proteína quinasa asociada a pared celular 2
At3g46600	Factor de transcripción tipo GRAS
At4g17490	Factor de transcripción EFR6
At5g39670	Proteína de unión a calcio con motivo EF-hand
At4g33050	Proteína de unión a calmodulina
At3g50910	Proteína desconocida
At1g22280	Proteína fosfatasa tipo 2C asociada a fitocromo
At4g28400	Proteína fosfatasa 2C
At1g59590	ZCF37
At1g10340	Proteína con repeticiones ankyrin
At1g07000	Subunidad del exocisto Exo70
At3g50060	Proteína con motivo myb 77
At1g72900	Proteína con motivo TIR (Toll-interleukin resistance)
At3g44260	Ribonucleasa tipo H
At3g13430	Proteína RING/U-box
At4g29780	
At1g21250	Proteína asociada a pared celular
At2g23200	Proteína quinasa
At5g61600	Factor de respuesta a etileno 104
At4g24570	Transportador dicarboxílico 2
At5g48380	Proteína tipo quinasa que interactúa con BAK1

REFERENCIAS

- Achard P, Baghour M, Chapple A, Hedden P, Van Der Straeten D, Genschik P, Moritz T, Harberd NP** (2007) The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 6484–9
- Achard P, Renou J-P, Berthomé R, Harberd NP, Genschik P** (2008) Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Curr Biol* **18**: 656–60
- Agrios, G.N.** (2005) *Plant Pathology*. Fifth ed. San Diego, CA, USA: Elsevier Academic Press.
- Alamillo JM, Saénz P, García JA** (2006) Salicylic acid-mediated and RNA-silencing defense mechanisms cooperate in the restriction of systemic spread of plum pox virus in tobacco. *Plant J* **48**: 217–27
- Alcaide-Loridan C, Jupin I** (2012) Ubiquitin and plant viruses, let's play together! *Plant Physiol* **160**: 72–82
- Allan a C, Lapidot M, Culver JN, Fluhr R** (2001) An early tobacco mosaic virus-induced oxidative burst in tobacco indicates extracellular perception of the virus coat protein. *Plant Physiol* **126**: 97–108
- Andersen, C.L., Jensen J. L., Orntoft, T.F.** (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64(15):5245-5250.
- Aoki K, Ogata Y, Shibata D** (2007) Approaches for extracting practical information from gene co-expression networks in plant biology. *Plant Cell Physiol* **48**: 381–90
- Attaran E, Zeier TE, Griebel T, Zeier J** (2009) Methyl salicylate production and jasmonate signaling are not essential for systemic acquired resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**: 954–71
- Bailey TL** (2008) "Discovering Sequence Motifs." *Methods Mol Biol Bioinforma*. doi: 10.1007/978-1-60327-159-2
- Bailey TL, Boden M, Buske F a, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW, Noble WS** (2009) MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res* **37**: W202–8
- Baulcombe DC** (1996) Mechanisms of Pathogen-Derived Resistance to Viruses in Transgenic Plants. *Plant Cell* **8**: 1833–1844

- Baxter A, Mittler R, Suzuki N** (2014) ROS as key players in plant stress signalling. *J Exp Bot* **65**: 1229–40
- Bazzini AA, Hopp HE, Beachy RN, Asurmendi S** (2007) Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 12157–12162
- Beachy RN** (1999) Coat-protein-mediated resistance to tobacco mosaic virus : discovery mechanisms and exploitation. *Phil Trans R Soc Lond B* **354**: 659–664
- Becker F, Buschfeld E, Schell J, Bachmair A** (1992) Altered response to viral infection by tobacco plants perturbed in ubiquitin system. **3**: 875–881
- Bertani, G** (1952) Studies on Lysogenesis. I. The mode of phage liberation by λ lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriology*, 62:293-300
- Behringer FJ, Cosgrove DJ, Reid JB, Davies PJ** (1990) Physical basis for altered stem elongation rates in internode length mutants of *Pisum*. *Plant Physiol* **94**: 166–173
- Bleecker B., Kende H** (2000) ETHYLENE: A Gaseous Signal Molecule in Plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 1–18
- Bolle C** (2004) The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* **218**: 683–692
- Boyes DC, Zayed a M, Ascenzi R, McCaskill a J, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J** (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* **13**: 1499–510
- Brodersen P, Sakvarelidze-Achard, L. Bruun-Rasmussen, M. Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L, Voinnet O** (2008) Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* (80-) **320**: 1185–1190
- Bustin S a** (2010) Why the need for qPCR publication guidelines?--The case for MIQE. *Methods* **50**: 217–26
- Callaway A, Gillock ET, Sit TL, Lommel SA** (2001) The Multifunctional Capsid proteins of Plant RNA Viruses. *Annu Rev Phytopathol* **39**: 419–60
- Carr JP, Lewsey MG, Palukaitis P** (2010) Chapter 3 - Signaling in Induced Resistance, 1st ed. *Nat Eng Resist to plant viruses, Part B* **76**: 57–121
- Carrington JC, Kasschau KD, Mahajan SK, Schaad MC** (1996) Cell-to-Cell and Long-Distance Transport of Viruses in Plants. *Plant Cell* **8**: 1669–1681
- Cecchini E, Gong Z, Geri C, Covey SN, Milner JJ** (1997) Transgenic *Arabidopsis* lines expressing gene VI from cauliflower mosaic virus variants exhibit a range of

symptom-like phenotypes and accumulate inclusion bodies. *Mol Plant Microbe Interact* **10**: 1094–101

Chanda B, Xia Y, Mandal MK, Yu K, Sekine K-T, Gao Q-M, Selote D, Hu Y, Stromberg A, Navarre D, et al (2011) Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. *Nat Genet* **43**: 421–427

Chang C, Bleecker AB (2004) Ethylene Biology . More Than a Gas. **136**: 2895–2899

Chapman EJ, Carrington JC (2007) Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat Rev Genet* **8**: 884–96

Chen L, Zhang L, Li D, Wang F, Yu D (2013) WRKY8 transcription factor functions in the TMV-cg defense response by mediating both abscisic acid and ethylene signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: E1963–71

Chivasa S, Murphy a. M, Naylor M, Carr JP (1997) Salicylic Acid Interferes with Tobacco Mosaic Virus Replication via a Novel Salicylhydroxamic Acid-Sensitive Mechanism. *Plant Cell* **9**: 547–557

Claeys H, De Bodt S, Inzé D (2014) Gibberellins and DELLAs: central nodes in growth regulatory networks. *Trends Plant Sci* **19**: 231–9

Claeys H, Skirycz A, Maleux K, Inzé D (2012) DELLA signaling mediates stress-induced cell differentiation in Arabidopsis leaves through modulation of anaphase-promoting complex/cyclosome activity. *Plant Physiol* **159**: 739–47

Clouse, S., and Sasse, J. (1998). Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49,427–451

Conti G, Rodriguez MC, Manacorda C a, Asurmendi S (2012) 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* **25**: 1370–84

Cuozzo M, O'Connell K, Kaniewski W, Fang R, Chua N, Tumer N (1988) Viral protection in transgenic plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. *Biotechnology* **6**: 549–557

Dat J, Cotte B Van De, Montillet J, Chamnongpol S, Ruste C, Breusegem F Van, Triantaphylide C, Agnel J, Battesti C, Inze D (2005) Fatty Acid Hydroperoxides and H₂O₂ in the Execution of Hypersensitive Cell Death in Tobacco Leaves 1 [w]. **138**: 1516–1526

Davies, P. J. (2004) *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*(3er ed). Dordrecht, The Netherlands: Springer.

- Dawson W** (1992) MINIREVIEW Tobamovirus-Plant Interactions. *interactions* **367**: 359–367
- Dawson, W. O, Bubrick, P and Grantham GL** (1988) Modifications of the Tobacco Mosaic virus Coat Protein Gene affecting Replication, Movement, and Symptomatology. *Phytopatology* **78**: 783–789
- Dellaporta, S. L., Wood, J. & Hicks, J. B.** (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Report.* **1**, 19–21.
- Devoto A, Turner JG** (2003) Regulation of jasmonate-mediated plant responses in arabidopsis. *Ann Bot* **92**: 329–37
- Dill a, Jung HS, Sun TP** (2001) The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 14162–7
- Dill A, Thomas SG, Hu J, Steber CM, Sun TP** (2004) Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 blancos gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell* **16**: 1392–1405
- Dohondt S, Geoffroy P, Stelmach BA, Legrand M, Heiz T** (2000) Soluble phospholipase A₂ activity is induced before oxylipin accumulation in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves and is contributed by patatin-like enzymes. *Plant J.*; **23** :431-440
- Donofrio NM, Delaney TP** (2001) Abnormal Callose Response Phenotype and Hypersusceptibility to *Peronospora parasitica* in Defense-Compromised Arabidopsis nim1-1 and Salicylate Hydroxylase-Expressing Plants. **14**: 439–450
- Dorokhov YL** (2007) Gene silencing in plants. *Mol Biol* **41**: 519–530
- Doumayrou J, Leblaye S, Froissart R, Michalakakis Y** (2013) Reduction of leaf area and symptom severity as proxies of disease-induced plant mortality: the example of the Cauliflower mosaic virus infecting two Brassicaceae hosts. *Virus Res* **176**: 91–100
- Draper J** (1997) Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defense. *Trends Plant Sci* **2**: 162–165
- Dreher K, Callis J** (2007) Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. *Ann Bot* **99**: 787–822
- Dubois M, Skirycz A, Claeys H, Maleux K, Dhondt S, De Bodt S, Vanden Bossche R, De Milde L, Yoshizumi T, Matsui M, et al** (2013) ETHYLENE RESPONSE FACTOR6 Acts as a Central Regulator of Leaf Growth under Water-Limiting Conditions in Arabidopsis. *Plant Physiol* **162**: 319–32

- Espinoza C, Medina C, Somerville S, Arce-Johnson P** (2007) Senescence-associated genes induced during compatible viral interactions with grapevine and Arabidopsis. *J Exp Bot* **58**: 3197–212
- Eulgem T, Rushton P, Robatzek S, Somssich I** (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* **5**: 199–206
- Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA** (2005) *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses; 8th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 1273
- Fernández Valiela M V.** (1995) *Los virus patógenos de las plantas y su control*, 4ta ed. 701
- Fire A** (1999) RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet* **15**: 358–363
- Frith MC** (2011) A new repeat-masking method enables specific detection of homologous sequences. *Nucleic Acids Res* **39**: e23
- Fu XD, Richards DE, Fleck B, Xie DX, Burton N, Harberd NP** (2004) The Arabidopsis mutant *sleepy1(gar2-1)* protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCF^{SLY1} E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *Plant Cell* **16**: 1406–1418
- Fujioka S, Yamane H, Spray CR, Katsumi M, Phinney BO, Gaskin P, Macmillan J, Takahashi N** (1988) The dominant non-gibberellin-responding dwarf mutant (D8) of maize accumulates native gibberellins. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 9031–9035
- Gallego-Bartolomé J, Arana M V, Vandebussche F, Zádňíková P, Minguet EG, Guardiola V, Van Der Straeten D, Benkova E, Alabadí D, Blázquez M a** (2011) Hierarchy of hormone action controlling apical hook development in Arabidopsis. *Plant J* **67**: 622–34
- Gallego-Bartolomé J, Mingueta EG, Grau-Enguixa F, Abbasa M, Locascio A, Thomas SG, Alabadía D, Blázquez MA** (2012) Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in Arabidopsis. *PNAS* **109**(33) 13446–13451.
- Gergerich R, Dolja V** (2006) Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. *Plant Heal Instr.* doi: DOI: 10.1094/PHI-I-2006-0414-01
- Gilliland A, Singh DP, Hayward JM, Moore CA, Murphy AM, York CJ, Slator J, Carr JP** (2003) Genetic Modification of Alternative Respiration Has Differential Effects on Antimycin A-Induced versus Salicylic Acid-Induced Resistance to Tobacco mosaic virus 1. *Plant Cell* **15**: 1518–1528
- Glickman MH, Ciechanover A** (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* **82**: 373–428

- Göhre V, Robatzek S** (2008) Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu Rev Phytopathol* **46**: 189–215
- Golem S, Culver JN** (2003) Tobacco mosaic virus induced alterations in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 681–8
- Gómez-Gómez L, Boller T** (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell* **5**: 1003–11
- Gonsalves D, Street A, Ferreira S** (2004) Transgenic Virus Resistant Papaya : From Hope to Reality for Controlling Papaya Ringspot Virus in Hawaii APSnet Feature July 2004 APSnet Feature July 2004.
- Grant MR, Jones JDG** (2009) Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease. *Science* **324**: 750–2
- Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang ZL, Powers SJ, Gong F, Phillips AL, Hedden P, Sun TP, et al** (2006) Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 3399–3414
- Gruner K, Griebel T, Návarová H, Attaran E, Zeier J** (2013) Reprogramming of plants during systemic acquired resistance. *Front Plant Sci* **4**: 252
- Gulledge AA, Roberts AD, Vora H, Patel K, Loraine AE**. Mining *Arabidopsis thaliana* RNA-SEQ data with integrated genome browser reveals stress-induced alternative splicing of the putative splicing regulator SR45a. *American Journal of Botany* 99(2): 219–231. 2012.
- Hammond RW, Zhao Y** (2009) Modification of tobacco plant development by sense and antisense expression of the tomato viroid-induced AGC VIIIa protein kinase PKV suggests involvement in gibberellin signaling. *BMC Plant Biol*. doi: doi:10.1186/1471-2229-9-108
- Hemenway C, Fang RX, Kaniewski K. W, Chua NH, Tumer NE** (1988) Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. *EMBO J* **7**: 1273–1280
- Heo JB, Sung S, Sarah M** (2012) Ca²⁺-dependent GTPase , Extra-large G Protein 2 (XLG2), Promotes Activation of DNA-binding Protein Related to Vernalization 1 (RTV1), Leading to Activation of Floral Integrator Genes and Early Flowering in *Arabidopsis* * □. doi: 10.1074/jbc.M111.317412
- Hipper C, Brault V, Ziegler-Graff V, Revers F** (2013) Viral and cellular factors involved in Phloem transport of plant viruses. *Front Plant Sci* **4**: 154
- Hisamatsu T, King RW, Helliwell CA, Koshioka M** (2005) The Involvement of Gibberellin 20-Oxidase Genes in Phytochrome-Regulated Petiole Elongation of *Arabidopsis*. **138**: 1106–1116

- Hou X, Lee LYC, Xia K, Yan Y, Yu H** (2010) DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Dev Cell* **19**: 884–94
- Huang Z, Yeakley JM, Garcia EW, Holdridge JD, Fan J, Whitham SA** (2005) Salicylic Acid-Dependent Expression of Host Genes in Compatible Arabidopsis-Virus Interactions 1 [w]. *Plant Physiol* **137**: 1147–1159
- Hull R** (2002) *Matthews' Plant Virology*, 4th Editio. Academic Press, San Diego, CA
- Ihmels J, Levy R, Barkai N** (2004) Principles of transcriptional control in the metabolic network of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* **22**: 86–92
- Ikeda A, Ueguchi--Tanaka M, Sonoda Y, Kitano H, Koshioka M, Futsuhara Y, Matsuoka M, Yamaguchi J** (2001) slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height--regulating gene GAI/RGA/RHT/D8. *Plant Cell* **13**:
- Jakubowicz M, Gałgańska H, Nowak W, Sadowski J** (2010) Exogenously induced expression of ethylene biosynthesis, ethylene perception, phospholipase D, and Rboh-oxidase genes in broccoli seedlings. *J Exp Bot* **61**: 3475–91
- Jensen MK, Lindemose S, de Masi F, Reimer JJ, Nielsen M, Perera V, Workman CT, Turck F, Grant MR, Mundy J, et al** (2013) ATAF1 transcription factor directly regulates abscisic acid biosynthetic gene NCED3 in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Open Bio* **3**: 321–7
- Ji LH, Ding SW** (2001) The suppressor of transgene RNA silencing encoded by *Cucumber mosaic virus* interferes with salicylic acid-mediated virus resistance. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 715–24
- Jing L, Gunter B, Tarja K, Palva ET** (2006) WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *Plant J* **46**: 477–491
- Jones JDG, Dangl JL** (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323–9
- Joshua-Tor L** (2006) The Argonautes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **71**: 67–72
- Jung HW, Tschaplinski TJ, Wang L, Glazebrook J, Greenberg JT** (2009) Priming in systemic plant immunity. *Science* **324**: 89–91
- Kachroo P, Yoshioka K, Shah J, Dooner HK, Klessig DF.**(2000)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.
- Kazan K, Manners JM** (2009) **Linking development to defense: auxin in plant–pathogen interactions.** *Trends Plant Sci* **14**(7) **373-382.**

- Kharchenko P, Church GM, Vitkup D** (2005) Expression dynamics of a cellular metabolic network. *Mol Syst Biol* **1**: 2005.0016
- Kim, SY, Kim, BH, Lim, CJ, Lim, CO, and Nam, KH**(2010).Constitutive activation of stress-inducible genes in a brassinosteroidinsensitive 1 (*bri1*) mutant results in higher tolerance to cold. *Physiol.Plant.* 138: 191–204.
- Koo JC, Asurmendi S, Bick J, Woodford-Thomas T, Beachy RN** (2004) Ecdysone agonist-inducible expression of a coat protein gene from tobacco mosaic virus confers viral resistance in transgenic Arabidopsis. *Plant J* **37**: 439–448
- Koornneef M, Elgersma A, Hanhart, C. J., Vanloenenmartinet EP, Vanriijn L, Zeevaart JAD** (1985) A gibberellin insensitive mutant of Arabidopsis thaliana. *Physiol Plant* **65**: 33–39.
- Koornneef A, Pieterse CM** (2008) Cross talk in defence signaling. *Plant Physiol* **146**:839–844. doi:10.1104/pp.107.112029.
- Kovač M, Müller A, Jarh DM, Milavec M, Düchting P, Ravnikar M** (2009) Multiple hormone analysis indicates involvement of jasmonic signaling in the early defence of potato to potato virus YNTN. *Biol. Plant.* ;**53**:195-199.
- Lamb C, Dixon R** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 251–275
- Lee S, Seo PJ, Lee H-J, Park C-M** (2012) A NAC transcription factor NTL4 promotes reactive oxygen species production during drought-induced leaf senescence in Arabidopsis. *Plant J* **70**: 831–844
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann J a** (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**: 973–83
- Leon J, Lawton M a., Raskin I** (1995) Hydrogen Peroxide Stimulates Salicylic Acid Biosynthesis in Tobacco. *Plant Physiol* **108**: 1673–1678
- Leon-Reyes A, Van der Does D, De Lange ES, Delker C, Wasternack C, • Saskia C. M. Van Wees, Ritsema T, M. J. Pieterse CM** (2010). Salicylate-mediated suppression of jasmonate-responsive gene expression in Arabidopsis is targeted downstream of the jasmonate biosynthesis pathway. **232**:1423–1432
- Lewsey M, Surette M, Robertson FC, Ziebell H, Choi SH, Ryu KH, Canto T, Palukaitis P, Payne T, Walsh J a, et al** (2009) The role of the Cucumber mosaic virus 2b protein in viral movement and symptom induction. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 642–54
- Li G, Meng X, Wang R, Mao G, Han L, Liu Y, Zhang S** (2012) Dual-Level Regulation of ACC Synthase Activity by MPK3/MPK6 Cascade and Its Downstream WRKY Transcription Factor during Ethylene Induction in Arabidopsis. *PLoS Genet* **8**: e1002767

- Li S, Fu Q, Chen L, Huang W, Yu D** (2011) *Arabidopsis thaliana* WRKY25, WRKY26 and WRKY53 coordinate induction of plant thermotolerance. *PLanta* **233** (6):1237–1252
- Liao Y-W-K, Sun Z-H, Zhou Y-H, Shi K, Li X, Zhang G-Q, Xia X-J, Chen Z-X, Yu J-Q** (2013) The Role of Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide in the Induction of Plant-Encoded RNA-Dependent RNA Polymerase 1 in the Basal Defense against Tobacco Mosaic Virus. *PLoS One* **8**: e76090
- Lippok B, Birkenbihl RP, Rivory G, Brümmer J, Schmelzer E, Logemann E, Somssich IE** (2007) Expression of AtWRKY33 encoding a pathogen- or PAMP-responsive WRKY transcription factor is regulated by a composite DNA motif containing W box elements. *Mol Plant Microbe Interact* **20**: 420–9
- Loebenstein, G.** (2010) *Plant Virus Diseases: Economic Aspects*, in *Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology* B.W.J. Mahy and M.H.V. van Regenmortel, Editors. Elsevier Academic Press: San Diego, CA, USA.
- Loesch-Fries L, Merlo D, Zinnen T, Burhop L, Hill K, Krahn K, Jarvis N, Nelson S, Halk E** (1987) Expression of Alfalfa Mosaic Virus RNA 4 in transgenic plants confers virus resistance. *EMBO J* **6**: 1845–1851
- Löfke C, Zwiewka M, Heilmann I, Van Montagu MCE, Teichmann T, Friml J** (2013) Asymmetric gibberellin signaling regulates vacuolar trafficking of PIN auxin transporters during root gravitropism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 3627–32
- Love AJ, Geri C, Laird J, Carr C, Yun B-W, Loake GJ, Tada Y, Sadanandom A, Milner JJ** (2012) Cauliflower mosaic virus protein P6 inhibits signaling responses to salicylic acid and regulates innate immunity. *PLoS One* **7**: e47535
- Love AJ, Laird J, Holt J, Hamilton AJ, Sadanandom A, Milner JJ** (2007) Cauliflower mosaic virus protein P6 is a suppressor of RNA silencing. *J Gen Virol* **88**: 3439–44
- Love AJ, Yun BW, Laval V, Loake GJ, Milner JJ** (2005) Cauliflower mosaic virus , a Compatible Pathogen of *Arabidopsis* , Engages Three Distinct Defense-Signaling Pathways and Activates Rapid Systemic Generation of Reactive Oxygen Species 1. **139**: 935–948
- Lozano-Durán R, Rosas-Díaz T, Gusmaroli G, Luna AP, Taconnat L, Deng XW, Bejarano ER** (2011) Geminiviruses Subvert Ubiquitination by Altering CSN-Mediated Derubylation of SCF E3 Ligase Complexes and Inhibit Jasmonate Signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **23**: 1014–1032
- Luo X-M, Lin W-H, Zhu S, Zhu J-Y, Sun Y, Fan X-Y, Cheng M, Hao Y, Oh E, Tian M, et al** (2010) Integration of light and brassinosteroid signaling pathways by a GATA transcription factor in *Arabidopsis*. *Dev Cell* **19**: 872–883
- Maekawa S, Sato T, Asada Y** (2012) The *Arabidopsis* ubiquitin ligases ATL31 and ATL6 control the defense response as well as the carbon / nitrogen response. 217–227

- Mahony S, Benos P V** (2007) STAMP: a web tool for exploring DNA-binding motif similarities. *Nucleic Acids Res* **35**: W253–8
- Manacorda CA, C. M, H.J D, Zavallo D, Sánchez F, Ponz F, Asurmendi S** (2013) Salicylic acid determines differential senescence produced by two Turnip mosaic virus strains involving reactive oxygen species and early transcriptomic changes. *Mol Plant Microbe Interact* **26**: 1486–1498
- Mandadi KK, Scholthof K-BG** (2013) Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease? *Plant Cell* **25**: 1489–505
- Maramorosch K** (1957) Reversal of virus-caused stunting in plants by gibberellic acid. *Science (80-)* **126**: 651–652
- Mark E. Hilf and Willam O. Dawson** (1993) The Tobamovirus capsid protein functions as a host-specific determinant a long-distance movement. *Virology* **193**: 106–114
- Maule, A. J., Caranta, C., and Boulton, M. I. (2007).** Sources of natural resistance to plant viruses: Status and prospects. *Mol. Plant Pathol.* **8**:223–231.
- Maule A, Leh V, Lederer C** (2002) The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. 1–6
- Maxwell DP, Nickels R, McIntosh L** (2002) Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence. *Plant J* **29**: 269–79
- McGinnis KM, Thomas SG, Soule JD, Strader LC, Zale JM, Sun TP, Steber CM** (2003) The Arabidopsis SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell* **15**: 1120–1130
- Métraux JP, Signer H, Ryals J, Ward E, Gaudin J, Schmid E, Blum W, Inverardi B** (1990) Increase in Salicylic Acid at the Onset of Systemic Acquired Resistance in Cucumber. *Science (80-)* **250**: 1004–1006
- Mishina TE, Zeier J** (2006) The Arabidopsis flavin-dependent monooxygenase FMO1 is an essential component of biologically induced systemic acquired. *Plant Physiol* **141**: 1666–1675
- Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7**: 405–410
- Moghaddam MRB, Van den Ende W** (2013) Sugars, the clock and transition to flowering *FPLS* **4**: 1-6
- Moffat CS, Ingle RA, Wathugala DL, Saunders NJ, Knight H, Knight MR** (2012) ERF5 and ERF6 Play Redundant Roles as Positive Regulators of JA / Et-Mediated Defense against *Botrytis cinerea* in Arabidopsis. **7**: 1–11

- Murase K, Yoshinori H, Tai-ping S, Hakoshima T** (2008) Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* **456**: 459–463
- Murashigue T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473–497
- Murphy AM, Gilliland A, York CJ, Hyman B, Carr JP** (2004) High-level expression of alternative oxidase protein sequences enhances the spread of viral vectors in resistant and susceptible plants. *J Gen Virol* **85**: 3777–86
- Nakajima M, Shimada A, Takashi Y, Kim YC, Park SH, Ueguchi---Tanaka M, Suzuki H, Katoh E, Iuchi S, Kobayashi M, et al** (2006) Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. *Plant J* **46**: 880–889
- Nandety RS, Caplan JL, Cavanaugh K, Perroud B, Wroblewski T, Michelmore RW, Meyers BC** (2013) The Role of TIR-NBS and TIR-X Proteins in Plant Basal Defense Responses. *Plant Physiology* **162**, 1459–1472.
- Návarová H, Bernsdorff F, Döring A-C, Zeier J** (2012) Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *Plant Cell* **24**: 5123–41
- Navarro L, Bari R, Achard P, Lisón P, Nemri A, Harberd NP, Jones JDG** (2008) DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr Biol* **18**: 650–5
- Nome SF, Lenardón SL, Raju BC, Laguna IG, Lowe SK, Docampo DM** (1981) Association of reovirus-like particles with “Enfermedad de Río Cuarto” of maize in Argentina. *Phytopathol Zhurnal* **101**: 7–15
- Noshi M, Maruta T, Shigeoka S** (2012) Relationship between chloroplastic H₂O₂ and the salicylic acid response. *Plant Signal Behav* **7**: 944–6
- Obayashi T, Hayashi S, Saeki M, Ohta H, Kinoshita K** (2009) ATTED-II provides coexpressed gene networks for Arabidopsis. *Nucleic Acids Res* **37**: D987–91
- Oka K, Kobayashi M, Mitsuhashi I, Seo S** (2013) Jasmonic acid negatively regulates resistance to Tobacco mosaic virus in tobacco. *Plant Cell Physiol* **54**: 1999–2010
- Pallas V, García JA** (2011) How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *J Gen Virol* **92**: 2691–705
- Palukaitis P, Carr JP** (2008) PLANT RESISTANCE RESPONSES TO VIRUSES. **90**: 153–171
- Park S-W, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF** (2007) Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* **318**: 113–6

- Peng J, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, Murphy GP, Harberd NP** (1997) The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* **11**: 3194–205
- Peng JR, Harberd NP** (1993) Derivative alleles of the Arabidopsis gibberellin-insensitive (Gai) mutation confer a wild-type phenotype. *Plant Cell* **5**: 351–360
- Petersen K, Qiu J-L, Lutje J, Fill BK, Hansen S, Mundy J and Petersen M** (2010) Arabidopsis MKS1 Is Involved in Basal Immunity and Requires an Intact N-terminal Domain for Proper Function. *Plos one* **5**(12):e14364.
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C. & Neuvians, T.P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* **26**(6):509-515.
- Phee B-K, Kim J-I, Shin DH, Yoo J, Park K-J, Han Y-J, Kwon Y-K, Cho M-H, Jeon J-S, Bhoo SH, et al** (2008) A novel protein phosphatase indirectly regulates phytochrome-interacting factor 3 via phytochrome. *Biochem J* **415**: 247–55
- Pieterse CMJ, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SCM** (2012) Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**: 489–521
- Pitzschke A, Schikora A, Hirt H** (2009) MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 421–6
- Polák J, Kumar J, Krska B, Ravelonandro M** (2012) *Biotech / GM Crops in Horticulture* : Plum cv . HoneySweet Resistant to Plum Pox Virus. **48**: 43–48
- Postnikova O a, Nemchinov LG** (2012) Comparative analysis of microarray data in Arabidopsis transcriptome during compatible interactions with plant viruses. *Virol J* **9**: 101
- Prasch CM, Sonnewald U** (2013) Simultaneous application of heat, drought, and virus to Arabidopsis plants reveals significant shifts in signaling networks. *Plant Physiol* **162**: 1849–66
- Qiu JL, Fiil BK, Petersen K, Nielsen HB, Botanga CJ, et al.** (2008) Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *EMBO J* **27**: 2214–2221.
- Qu F, Ye X, Morris TJ** (2008) in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *PNAS* **105**: 7–12

- Rakhshandehroo F, Takeshita M, Squires J, Palukaitis P** (2009) The influence of RNA-dependent RNA polymerase 1 on potato virus Y infection and on other antiviral response genes. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 1312–8
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL, Moorman AF.** (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* **339**: 62–66
- Randoux M, Jeauffre J, Thouroude T, Vasseur F, Hamama L, Marjorie J, Sakr S, Foucher F** (2012) Gibberellins regulate the transcription of the continuous flowering regulator, RoKSN, a rose TFL1 homologue. *J Exp Bot* **63**: 6543–6554
- Redman J.C, Haas B.J, Tanimoto J. Town C.D** (2004). Development and evaluation of an Arabidopsis whole genome Affymetrix probe array. *Plant J* **38**. 545-561.
- Ren X, Huang W, Li W, Yu D** (2010) Tobacco transcription factor WRKY4 is a modulator of leaf development and disease resistance. *Biol Plant* **54**: 684–690
- Riaño-Pachón DM, Ruzicic S, Dreyer I, Mueller-Roeber B** (2007) PlnTFDB: an integrative plant transcription factor database. *BMC Bioinformatics* **8**: 42
- Riedle-Bauer M** (2000) Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in systemic virus infections of plants. *J Phytopathol* **148**: 297–302
- Rieu I, Eriksson S, Powers SJ, Gong F, Griffiths J, Woolley L, Benlloch R, Nilsson O, Thomas SG, Hedden P, et al** (2008) Genetic analysis reveals that C19-GA 2-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 2420–36
- Rocha Peña M, Ocho-Corona FM, Martinez-Soriano JP, Roistacher CN, Lee RF** (1998) Citrus Tristeza Virus: Events that occur before, during and after disease epidemics. *Subtropical Plant Science*. **50**, 26-36.
- Ryu C-M, Murphy JF, Mysore KS, Kloepper JW** (2004) 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* **39**: 381–92
- Sagi M, Fluhr R** (2001) Superoxide production by plant homologues of the gp91(phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* **126**: 1281–90
- Sahana N, Kaur H, Basavaraj, Tena F, Jain RK, Palukaitis P, Canto T, Praveen S** (2012). Inhibition of the Host Proteasome Facilitates Papaya Ringspot Virus Accumulation and Proteosomal Catalytic Activity Is Modulated by Viral Factor HcPro. *PlosOne* 7(12): e52546. doi:10.1371/journal.pone.0052546

- Sasaki A, Itoh H, Gomi K, Ueguchi---Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Jeong DH, An G, Kitano H, Ashikari M, et al** (2003) Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science* (80) **299**: 1896–1898
- Sato T, Maekawa S, Yasuda S, Sonoda Y, Katoh E, Ichikawa T, Nakazawa M** (2009) CNI1 / ATL31, a RING-type ubiquitin ligase that functions in the carbon / nitrogen response for growth phase transition in Arabidopsis seedlings. 852–864
- Satoh K, Shimizu T, Kondoh H, Hiraguri A, Sasaya T, Choi I-R, Omura T, Kikuchi S** (2011) Relationship between symptoms and gene expression induced by the infection of three strains of Rice dwarf virus. *PLoS One* **6**: e18094
- Scholthof, KG.** (2000). Tobacco mosaic virus. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-1010-01
- Scholthof KG, Adkins S, Czosnek H, Palukaitis P, Jacquot E, Hohn T, Hohn B, Saunders K, Candresse T, Ahlquist P, et al** (2011) Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. **12**: 938–954
- Shang J, Xi D-H, Xu F, Wang S-D, Cao S, Xu M-Y, Zhao P-P, Wang J-H, Jia S-D, Zhang Z-W, et al** (2011) A broad-spectrum, efficient and nontransgenic approach to control plant viruses by application of salicylic acid and jasmonic acid. *Planta* **233**: 299–308
- Shani E, Weinstain R, Zhang Y, Castillejo C, Kaiserli E, Chory J** (2013) Gibberellins accumulate in the elongating endodermal cells of Arabidopsis root. 1–6
- Shimada A, Ueguchi---Tanaka M, Nakatsu T, Nakajima M, Naoe Y, Ohmiya H, Kato H, Matsuoka M** (2008) Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature* **456**: 520–523
- Shirasu K, Nakajima H, Rajasekhar VK, Dixon R a, Lamb C** (1997) Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell* **9**: 261–70
- Silverstone AL, Mak PY, Martinez EC, Sun TP** (1997) The new RGA locus encodes a negative regulator of gibberellin response in Arabidopsis thaliana. *Genetics* **146**: 1087–1099
- Spartz AK, Gray WM** (2008) Plant hormone receptors: new perceptions. *Genes Dev* **22**: 2139–48
- Spoel SH, Johnson JS, Dong X** (2007) Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 18842–7
- Staswick PE, Tiryaki I** (2004) The Oxylinin Signal Jasmonic Acid Is Activated by an Enzyme That Conjugates It to Isoleucine in Arabidopsis. **16**: 2117–2127

- Sticher L, Mauch-Mani B, Metraux J** (1997) Systemic acquired resistance. *Annu Re.iew Plant Pathol* **35**: 235–270
- Sun T-P, Gubler F** (2004) Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 197–223
- Takahashi H, Miller J, Nozaki Y, Takeda M, Shah J, Hase S, Ikegami M, Ehara Y, Dinesh-Kumar SP** (2002) RCY1, an Arabidopsis thaliana RPP8/ HRT family resistance gene, conferring resistance to cucumber mosaic virus requires salicylic acid, ethylene and a novel signal transduction mechanism. *Plant J* **32**: 655–667
- Taliansky M, Kim SH, Mayo M a, Kalinina NO, Fraser G, McGeachy KD, Barker H** (2004) Escape of a plant virus from amplicon-mediated RNA silencing is associated with biotic or abiotic stress. *Plant J* **39**: 194–205
- Taliansky M, Roberts IM, Kalinina N, Ryabov E V, Raj SK, Robinson DJ, Oparka KJ** (2003) An Umbraviral Protein , Involved in Long-Distance RNA Movement , Binds Viral RNA and Forms Unique , Protective Ribonucleoprotein Complexes. **77**: 3031–3040
- Tang G** (2005) siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends Biochem Sci* **30**: 106–14
- Thaler JS, Humphrey PT, Whiteman NK** (2012) Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends Plant Sci* **17**: 260–70
- Ton J, DeVos M, Robben C, Buchala A, Metraux J, Van Loon L, Pieterse C** (2002) Characterization of Arabidopsis enhanced disease susceptibility mutants that are affected in systemically induced resistance. *Plant Journal, The* **29**: 11–21
- Torres MA, Dangl JL** (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 397–403
- Torres MA, Jones JDG, Dangl JL** (2006) Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens 1. **141**: 373–378
- Turner JG, Ellis C, Devoto A** (2002) The Jasmonate Signal Pathway. *Signal Transduct* 153–164
- Ubeda-Tomás S, Federici F, Casimiro I, Beemster GTS, Bhalerao R, Swarup R, Doerner P, Haseloff J, Bennett MJ** (2009) Gibberellin signaling in the endodermis controls Arabidopsis root meristem size. *Curr Biol* **19**: 1194–9
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, Chow T-Y, Hsing Y, Kitano H, Yamaguchi I, et al** (2005) GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* **437**: 693–698

- Usadel B, Obayashi T, Mutwil M, Giorgi FM, Bassel GW, Tanimoto M, Chow A, Steinhauser D, Persson S, Provart NJ** (2009) Co-expression tools for plant biology: opportunities for hypothesis generation and caveats. *Plant Cell Environ* **32**: 1633–51
- Van Loon L, Gerritsen Y, Ritter C** (1987) Identification, purification, and characterization of pathogenesis-related proteins from virus-infected Samsun NN tobacco leaves. *Plant Mol Biol* **9**: 593–609
- Van Loon LC** (1997) Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology*. **103**: 753–765
- Van Verk MC, Bol JF, Linthorst HJM** (2011) WRKY transcription factors involved in activation of SA biosynthesis genes. *BMC Plant Biol* **11**: 89
- Vidal AM, Ben-Cheikh W, Talón M, García-Martínez JL** (2003) Regulation of gibberellin 20-oxidase gene expression and gibberellin content in citrus by temperature and citrus exocortis viroid. *Planta* **217**: 442–8
- Vlot A.C, Dempsey D´Maris Amick , Klessig DF** (2009). Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* **47**: 177-206.
- Voinnet O** (2008) Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends Plant Sci* **13**: 317–28
- Wagner A** (1995) A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in petunia hybrida cells. *FEBS Lett* **368**: 339–342
- Wang D, Weaver N, Kesarwani M, Dong X** (2005) Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science (80-)* **308**: 1036–1040
- Wang L, Tsuda K, Sato M, Cohen JD, Katagiri F, Glazebrook J** (2009a) Arabidopsis CaM binding protein CBP60g contributes to MAMP-induced SA accumulation and is involved in disease resistance against *Pseudomonas syringae*. *PLoS Pathog* **5**: e1000301
- Wang W, Ma X, Zhang Y, Luo M, Wang G, Bellizzi M** (2012) PAPP2C Interacts with the Atypical Disease Resistance Protein RPW8. 2 and Negatively Regulates Salicylic Acid-Dependent Defense Responses in Arabidopsis. 1–13
- Wang X, Goregaoker SP, Culver JN** (2009b) Interaction of the Tobacco mosaic virus replicase protein with a NAC domain transcription factor is associated with the suppression of systemic host defenses. *J Virol* **83**: 9720–30
- Whitham S a, Yang C, Goodin MM** (2006) Global impact: elucidating plant responses to viral infection. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 1207–15

- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM** (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**: 562–5
- Willige BC, Ghosh S, Nill C, Zourelidou M, Dohmann EM, Maier A, Schwechheimer C** (2007) The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 1209–1220
- Wise RP, Moscou MJ, Bogdanove AJ, Whitham S a** (2007) Transcript profiling in host-pathogen interactions. *Annu Rev Phytopathol* **45**: 329–69
- Wu Y, Deng Z, Lai J, Zhang Y, Yang C, Yin B, Zhao Q, Zhang L, Li Y, Yang C, et al** (2009) Dual function of Arabidopsis ATAF1 in abiotic and biotic stress responses. *Cell Res* **19**: 1279–90
- Wu Y, Zhang D, Chu JY, Boyle P, Wang Y, Brindle ID, De Luca V, Després C.**(2012) The Arabidopsis NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid. *Cell Reports*, 639-647.
- Xie Z, Fan B, Chen C, Chen Z** (2001) An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6516–21
- Yamanaka T, Komatani H, Meshi T, Naito S, Ishikawa M, Ohno T** (1998) Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of tobacco mosaic virus strain Cg. *Virus Genes* **16**: 173–6
- Yoshimura K, Mori T, Yokoyama K, Koike Y, Tanabe N, Sato N, Takahashi H, Maruta T, Shigeoka S** (2011) Identification of Alternative Splicing Events Regulated by an Arabidopsis Serine / Arginine-Like Protein , atSR45a , in Response to High-Light Stress using a Tiling Array. **52**: 1786–1805
- Yoshioka H, Sugie K, Park HJ, Maeda H, Tsuda N, Kawakita K, Doke N** (2001) Induction of plant gp91 phox homolog by fungal cell wall, arachidonic acid, and salicylic acid in potato. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 725–36
- Yu D, Chen C, Chen Z** (2001) Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. *Plant Cell* **13**: 1527–40
- Yu D, Fan B, MacFarlane S a, Chen Z** (2003a) Analysis of the involvement of an inducible Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase in antiviral defense. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 206–16
- Yu D, Fan B, MacFarlane S a, Chen Z** (2003b) Analysis of the involvement of an inducible Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase in antiviral defense. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 206–16
- Yu D, Fan B, MacFarlane S a, Chen Z** (2003c) Analysis of the involvement of an inducible Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase in antiviral defense. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 206–16

- Zentella R, Zhang Z-L, Park M, Thomas SG, Endo A, Murase K, Fleet CM, Jikumaru Y, Nambara E, Kamiya Y, et al (2007a)** Global analysis of DELLA direct interactors in early gibberellin signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 3037–57
- Zentella R, Zhang Z-L, Park M, Thomas SG, Endo A, Murase K, Fleet CM, Jikumaru Y, Nambara E, Kamiya Y, et al (2007b)** Global analysis of DELLA direct interactors in early gibberellin signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 3037–57
- Zhai Hong, Bai Xi, Zhu Yanming, Li Yong, Cai Hua, Ji Wei, Ji Zuojun, Liu Xiaofei, Liu Xin, Li Jing (2010)** A single-repeat R3-MYB transcription factor MYBC1 negatively regulates freezing tolerance in Arabidopsis. *Biochem Biophys Res Commun* **394**: 1018–1023
- Zhang X, R. YY, Pei Y, Lin SS, Tuschl T, Patel DJ, Chua NH (2006)** Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev* **20**: 3255–3268
- Zhang Y, Xu S, Ding P, Wang D, Cheng YT, He J, Gao M, Xu F, Li Y, Zhu Z, et al (2010)** Control of salicylic acid synthesis and systemic acquired resistance by two members of a plant-specific family of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 18220–5
- Zheng Z, Mosher SL, Fan B, Klessig DF, Chen Z (2007)** Functional analysis of Arabidopsis WRKY25 transcription factor in plant defense against *Pseudomonas syringae*. *BMC Plant Biol* **7**: 2
- Zheng Z, Qamar SA, Chen Z, Mengiste T (2006)** Arabidopsis WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Plant Journal, The* **48**: 592–605
- Zhou T, Murphy AM, Lewsey MG, Westwood JH, Zhang H, Gonzalez I, Canto T, Carr JP (2014)** Domains of the cucumber mosaic virus 2b silencing suppressor protein affecting inhibition of salicylic acid-induced resistance and priming of salicylic acid accumulation during infection. *J Gen Virol*. doi: 10.1099/vir.0.063461-0
- Zhu S, Gao F, Cao X, Chen M, Ye G, Wei C, Li Y (2005)** The Rice Dwarf Virus P2 Protein Interacts with ent-Kaurene Oxidases in Vivo , Leading to Reduced Biosynthesis of Gibberellins and. *Plant Physiol* **139**: 1935–1945
- Zhu H, Li G-J, Ding L, Cui X, Berg H, Assmann S.M and Xia Y. (2009)** Arabidopsis Extra Large G-Protein 2 (XLG2) Interacts with the G β Subunit of Heterotrimeric G Protein and Functions in Disease Resistance . *Mol Plant* **2**: 513-525.
- Zijlstra C, Scharer-Hernandez N, Gal S, Hohn T (1996)** Arabidopsis thaliana expressing the cauliflower mosaic virus ORF VI transgene has a late flowering phenotype. *Virus Genes* **13**: 5–17

- Zimmermann P, Hirsch-hoffmann M, Hennig L, Gruissem W** (2004) GENEVESTIGATOR . Arabidopsis Microarray Database and Analysis Toolbox 1 [w]. **136**: 2621–2632
- Zurbriggen MD, Hajirezaei M** (2010) ROS signaling in the hypersensitive response. 393–396
- Zvereva AS, Pooggin MM** (2012) Silencing and innate immunity in plant defense against viral and non-viral pathogens. *Viruses* **4**: 2578–97