



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

# Análisis molecular de la interacción entre el *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV) y sus hospedantes alternativos: plantas e insectos

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

**Lic. Luis Alejandro de Haro**

Directora de Tesis: Dra. Mariana del Vas  
Consejero de Estudios: Dr. Horacio Esteban Hopp

Instituto de Biotecnología  
Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas  
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA-Castelar)  
Marzo de 2016

## *Agradecimientos*

---

A todos los argentinos, por haber hecho posible que mi educación fuera gratuita en todos los niveles.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICET).

A los directivos del IB, CICVyA, INTA.

A TODOS los integrantes del Instituto de Biotecnología del INTA Castelar, en especial al grupo MRCV.

A Mariana, que aunque no le guste, lo merece.

A mi familia y amigos.

# Análisis molecular de la interacción entre el *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV) y sus hospedantes alternativos: plantas e insectos

## Resumen

El virus del Mal de Río Cuarto (MRCV) causa la principal enfermedad del maíz en nuestro país y es transmitido de manera persistente y propagativa por delfácidos. Diversas evidencias indican que los virus de este género se originaron de un virus de insectos ancestral y más recientemente adquirieron la capacidad de infectar plantas. La replicación viral está limitada al floema de gramíneas donde provoca síntomas severos, mientras que ocurre en diversos tejidos y es asintomática en los delfácidos vectores. El genoma del MRCV está formado por diez segmentos de RNA de doble cadena (dsRNA) que codifican para trece proteínas. El actual manejo de la enfermedad se realiza a través del monitoreo y control del principal insecto vector, *D. kuscheli*. Sin embargo, no se han desarrollado prácticas adecuadas ni existen cultivares resistentes en el caso de un eventual brote. El desarrollo de nuevas tecnologías de bajo impacto ambiental que permitan controlar efectivamente la virosis depende de la generación de conocimiento básico sobre la interacción hospedante-virus, particularmente sobre el ciclo viral y de los mecanismos de defensa de ambos hospedantes.

El silenciamiento génico mediado por RNA es un mecanismo de regulación génica específico de secuencia que a su vez funciona como sistema de defensa antiviral. Con el objetivo de caracterizar la respuesta diferencial en plantas e insectos infectados con MRCV, se realizó un ensayo de infección controlada utilizando el insecto vector *D. kuscheli* y plántulas de trigo como modelo hospedante. Se secuenciaron los RNAs pequeños de ambos hospedantes y se caracterizó el perfil de aquellos derivados del genoma viral (vsiRNAs). Se determinó que, mientras que la respuesta en plantas se caracteriza por la generación de “puntos calientes” muy marcados de vsiRNAs en prácticamente todos los segmentos, en insectos la acumulación resultó más homogéneamente distribuida. Por otro lado, la proporción de vsiRNAs derivados de ambas hebras fue prácticamente la misma en ambos hospedantes, por lo que se presume que la maquinaria de silenciamiento tiene acceso a todo el largo de los segmentos en algún momento del ciclo infectivo. Adicionalmente, en plantas se observó una acumulación preferencial de vsiRNAs en el primer tercio de gran parte de los segmentos genómicos, y una correlación inversa entre la acumulación de vsiRNAs y el largo de los segmentos. En *D. kuscheli*, se identificaron piRNAs por primera vez en esta especie y se descartó la participación directa de los mismos en el silenciamiento antiviral. Finalmente, el análisis del perfil mutacional del virus dentro de cada hospedante evidenció la presencia de sitios altamente variables que son únicos para cada hospedante y que dan lugar mayoritariamente a mutaciones no sinónimas que probablemente se deban a un proceso adaptativo.

Dentro de los mecanismos desencadenados por los virus durante el establecimiento de la infección se encuentra la modulación de la expresión de genes del hospedante. Esto puede conducir a cambios en la expresión de genes potencialmente involucrados en la producción de síntomas y/o que intervienen en mecanismos de defensa como el silenciamiento génico que restringen la replicación viral. Con el objetivo de identificar alteraciones en la acumulación de RNAs mensajeros ante la infección con MRCV, se realizó un RNAseq en plantas de trigo infectadas a dos etapas tempranas: 12 y 21 días post infección. Se realizó la anotación manual del genoma de trigo recientemente liberado (TGACv1) y se determinaron los genes diferencialmente expresados a cada tiempo utilizando dos métodos estadísticos. Estudios de enriquecimiento funcional revelaron que la infección con MRCV induce la sobreexpresión de genes que intervienen en la traducción, la biosíntesis de celulosa y la modificación de ácidos nucleicos. Dentro de las categorías de genes subexpresados se encuentran algunos relacionados con vías hormonales implicadas en el desarrollo y crecimiento de la planta: auxinas, citoquininas y brasinoesteroides.

El MRCV y la mayor parte de los fijivirus poseen tres segmentos bicistrónicos S5, S7 y S9, y se desconoce el mecanismo implicado en la traducción de los ORFs ubicados hacia el extremo 3'. El segmento S5 presenta un marco abierto de lectura (ORF5-2) parcialmente superpuesto al primero (P5-1). Estudios de genómica comparativa de secuencias del S5 de varias especies de fijivirus permitieron la identificación de una secuencia "UCU\_UUU\_CG" altamente conservada que podría funcionar como un sitio de deslizamiento ribosomal en la región superpuesta hacia el extremo 5' del ORF 5-2. En este trabajo de Tesis, se llevaron adelante experimentos de traducción *in vitro* del segmento S5 utilizando diferentes construcciones mutantes que comprobaron experimentalmente la existencia del *frameshift* que da lugar a una proteína de fusión P5-1/2.

Si bien aún resta ahondar en los mecanismos moleculares que ulteriormente determinan la sintomatología, los resultados contenidos en esta Tesis constituyen un insumo sumamente valioso para continuar avanzando en la comprensión del patosistema y poder eventualmente dar lugar a productos biotecnológicos que formen parte de un diseño racional, integrado y sustentable de estrategias de control de la enfermedad.

**Palabras clave:** *Mal de Río Cuarto virus*, reovirus, silenciamiento, RNAs pequeños virales, RNAseq, *frameshift*.

# Molecular analysis of the interaction between *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV) and its alternative hosts: plants and insects

## Abstract

*Mal de Río Cuarto Virus* (MRCV, Fijivirus, *Reoviridae*) causes the most important maize disease in Argentina and it is transmitted in a persistent and propagative manner by delphacids. Evidence indicates that viruses of this genus evolved from an ancestral insect virus that more recently acquired the ability to infect plants. Viral replication is limited to phloem tissue of grasses causing severe symptoms, whereas in insect vectors occurs in multiple tissues and is asymptomatic. MRCV genome consists of ten double-stranded RNA segments (dsRNA) coding for thirteen proteins. At present, there are no effective management strategies for controlling the disease. Development of new technologies with low environmental impact for virus control depends on basic knowledge about host-virus interaction, particularly on the replication cycle and the defense mechanisms of both hosts.

Post-transcriptional gene silencing is an antiviral defense mechanism widely spread among eukaryotes. In order to describe the silencing responses of plant and insects infected with MRCV and to characterize possible distinct features of both responses, a controlled infection experiment was performed using the insect *D. kuscheli* as a vector and wheat seedlings as a plant host model. Small RNAs from both hosts were sequenced and virus-derived siRNAs (vsiRNAs) profiles were characterized. We found that, while the response in plants showed conspicuous "hot spots" of vsiRNAs in nearly all genome segments, in insects vsiRNAs accumulation was homogeneously distributed. Furthermore, the proportion of vsiRNAs derived from + and - strands was practically the same in both hosts, indicating that the silencing machinery has access to full length segments at some point of the infective cycle. In addition, in plants, preferential accumulation of vsiRNAs within the upstream 30% region of most of the virus segments and an inverse correlation between the accumulation of vsiRNAs and the length of the segments were observed. In *D. kuscheli*, the piRNA pathway was shown to be active for the first time but not involved in the production of virus-derived piRNAs. Finally, the analysis of the virus mutational landscape evidenced the presence of a large number of distinct variable positions within each host, most of them causing non-synonymous mutations and possibly reflecting an adaptive process.

Virus infection induces changes in the modulation of host gene expression that could be potentially responsible of symptom development. In order to identify alterations in the mRNA profile upon early stages of MRCV infection, controlled wheat infections followed by RNAseq were performed at 12 and 21 dpi. Annotation of the new release of wheat genome (TGACv1) was done and

differentially expressed genes were identified using two statistical methods. Functional enrichment analysis revealed that MRCV infection induces overexpression of genes involved in translation, cellulose biosynthesis and nucleic acid modifications. In turn, subexpressed genes were enriched in categories related to perception and biosynthesis of diverse phytohormones (cytokinins, brassinosteroids and auxins), all of them involved in plant development.

S5, S7 and S9 MRCV segments are bicistronic and the mechanisms involved in the translation of 3' ORFs have not yet been determined. Segment S5 has two partially overlapping open reading frames (ORF5-1 and ORF5-2). The use of comparative genomics analysis has allowed the identification of a highly conserved sequence "UCU\_UUU\_CG" that could function as a slippery site for +1 ribosomal frameshifting rendering a P5-1/2 trans frame fusion protein. In this PhD work, *in vitro* translation experiments of different mutant constructs of S5 segment allowed to experimentally verify the existence of a +1 frameshift that gives rise to a fusion P5-1/2 protein.

Although further research on the molecular mechanisms involved in plants symptom-development upon MRCV infection is needed, the results obtained during this Thesis constitute an extremely valuable input for the understanding of the pathosystem, and eventually may give rise to knowledge-based biotechnological products that contribute to rational, integrated and sustainable strategies for disease control.

**Key words:** *Mal de Río Cuarto Virus*, reovirus, RNA silencing, small viral RNAs, RNAseq, frameshift.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>INTRODUCCION GENERAL</b>	<b>8</b>
El Mal de Río Cuarto y su impacto en el cultivo del maíz en Argentina	8
La familia Reoviridae	11
Los reovirus vegetales	14
El género Fijivirus	15
El virus de Mal de Río Cuarto y su caracterización molecular	16
El trigo como modelo experimental para el estudio del MRCV	22
Alteraciones citopáticas y fisiológicas producidas por el MRCV en plantas	23
La respuesta inmune antiviral en plantas	24
La respuesta inmune antiviral en insectos	27
Mecanismos de traducción no canónica en virus de RNA	29
<b>OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>34</b>
Obtención del material biológico	34
Extracción de RNA	35
Síntesis de cDNA para RT-qPCR	35
Síntesis de librerías y secuenciación de nueva generación	35
PCR cuantitativa en tiempo real	36
Técnicas clásicas de biología molecular	38
Obtención de mutantes del segmento S5	39
Extracción de proteínas de plantas, SDS-PAGE y detección por Western blot	40
Northern blot de mensajeros virales para la detección de mensajeros subgenómicos	41
Transcripción y traducción in vitro de las construcciones mutantes del S5	42
Procesamiento y análisis bioinformático	43
<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>44</b>

<b>Introducción</b>	<b>45</b>
<b>Resultados</b>	<b>47</b>
Obtención de plantas de trigo y delfácidos infectados con MRCV	47
Extracción de ARN enriquecido en ARNs pequeños de plantas e insectos	49
Secuenciación de los RNAs pequeños de plantas e insectos.	51
Lecturas obtenidas por librería y procesamiento por calidad	51
Mapeo de las lecturas al genoma del MRCV y reconstrucción del genoma de referencia	54
Análisis comparativo de los vsiRNAs de trigo y <i>D. kuscheli</i>	55
Estudio comparativo de la acumulación de vsiRNAs y RNA viral en ambos hospedantes	61
Análisis de la participación de piRNAs en el silenciamiento antiviral	62
Estudio comparativo del perfil mutacional del MRCV en plantas e insectos infectados.	63
<b>Discusión</b>	<b>65</b>
<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>71</b>
<b>Introducción</b>	<b>72</b>
<b>Resultados</b>	<b>73</b>
Construcción de las bibliotecas y obtención de secuencias	73
Elección de genoma de referencia y generación de archivo de anotación la versión TGACv1	74
Mapeo de las lecturas obtenidas al genoma TGACv1	76
Identificación de genes diferencialmente expresados ante la infección con MRCV	77
Validación de un conjunto de genes diferencialmente expresados por PCR en tiempo real	79
Estudio del enriquecimiento funcional de genes diferencialmente expresados a 21 dpi	79
<b>Discusión</b>	<b>82</b>
<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>90</b>
<b>Introducción</b>	<b>91</b>
<b>Resultados</b>	<b>93</b>
Evaluación de la presencia de mRNAs subgenómicos transcritos a partir de los segmentos bicistrónicos en el contexto de una infección con MRCV	93
Identificación de una proteína viral de alto peso molecular consistente con un desplazamiento del marco de lectura en el segmento S5 del MRCV	94
Diseño y obtención de mutantes del S5 para la evaluación in vitro de la existencia de un frameshift +1	95
Transcripción y traducción in vitro de las construcciones mutantes	96
Evaluación de la posible existencia de un frameshift transcripcional en S5 a partir de la secuenciación de RNAs pequeños virales de plantas e insectos	97



Discusión	98
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>102</b>
<i>Referencias</i>	<b>104</b>
<i>Material suplementario</i>	<b>119</b>

# INTRODUCCION GENERAL

## El Mal de Río Cuarto y su impacto en el cultivo del maíz en Argentina

El Mal de Río Cuarto es una de las enfermedades más importantes del maíz (*Zea mays*) en Argentina (Lenardon, March, Nome, & Ornaghi, 1998; Nome, 1981). Su agente causal es un virus denominado *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV) que pertenece al género *Fijivirus* de la familia *Reoviridae* (A J Distéfano, Hopp, & del Vas, 2005; A. J. Distéfano, Conci, Hidalgo, Guzmán, Hopp, del Vas, et al., 2002; Ana J. Distéfano et al., 2003; F A Guzmán et al., 2007). El virus es también capaz de replicar en diversas especies de chicharritas de la familia *Delphacidae*, principalmente *Delphacodes kuscheli* (Fennah), que actúan como vectores de la enfermedad (Mattio, Cassol, Remes Lenicov, & Truol, 2008; Remes Lenicov, 1985; Velázquez, 2010). El MRCV presenta un amplio rango de hospedantes vegetales, ya que además del maíz, es capaz de infectar muchas otras gramíneas (malezas u otros cultivos invernales como el trigo) que constituyen un reservorio natural del virus y favorecen el desarrollo poblacional del insecto vector.

Una vez que la planta de maíz es infectada, los síntomas aparecen luego de aproximadamente 30 días y su severidad depende del estado de desarrollo de la planta en el momento de la infección. Cuando la infección ocurre dentro de los primeros días de emergencia de la plántula, los síntomas son más severos e incluyen enanismo (plantas de 20-60 cm de altura, Figura 1A), espigas malformadas, acortamiento de entrenudos con tallos achatados (Figura 1B), hojas recortadas o reducidas, panojas atrofiadas y mazorcas múltiples (Figura 1C) con pocos o sin granos (Figura 1D). Adicionalmente, el síntoma distintivo de la enfermedad es la presencia de proliferaciones de tejido vascular en forma de verruga en el envés de las hojas, denominadas enaciones (Figura 1E). Si la infección ocurre en estadios más avanzados de desarrollo los síntomas son más leves, presentando enaciones y ligero enanismo.

La infección del MRCV en la chicharrita vectora (Figura 1F) es propagativa y circulativa, ya que el virus es capaz de replicar en los tejidos del insecto y llegar a las glándulas salivales de donde es transmitido, y persistente, ya que una vez infectado la enfermedad permanece durante toda la vida del insecto (L R Nault & Ammar, 1989). Sin embargo, la infección es asintomática y no afecta su fertilidad y longevidad (Joel D. Arneodo, Lorenzo, Laguna, Abdala, & Truol, 2002).

El primer reporte de plantas de maíz con síntomas de la enfermedad fue realizado en el año 1967 por miembros de la Agencia de Extensión Rural del INTA-Río Cuarto, Córdoba. Sin embargo, el Mal de Río Cuarto adquirió por primera vez características de epifitía durante la campaña agrícola

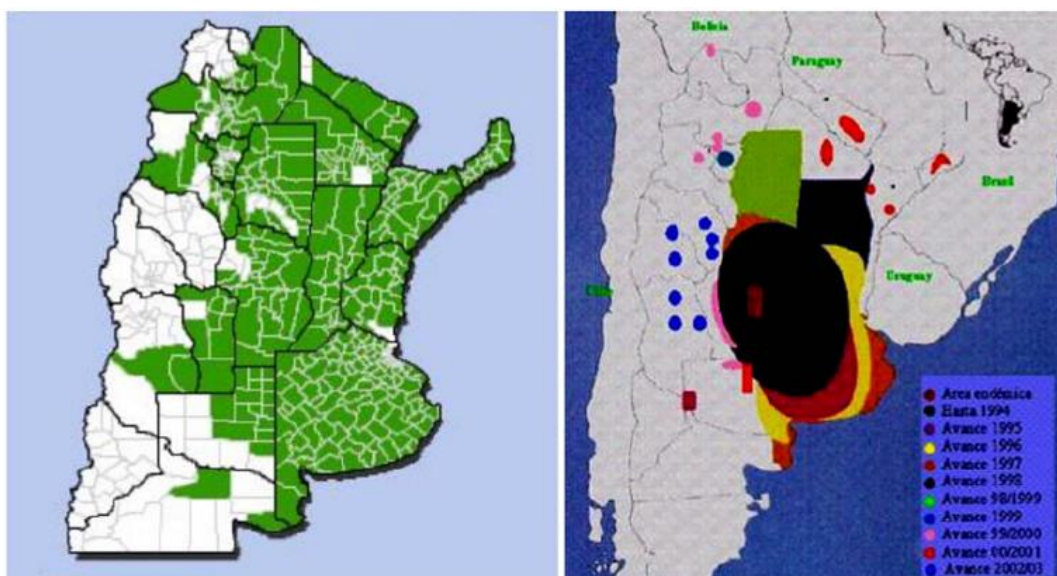
1976/77, extendiéndose gradualmente, hasta que en la campaña 1981/82 causó la pérdida de 55.000 de las 360.000 hectáreas de maíz en la localidad de Río Cuarto, Córdoba. En la campaña agrícola 1996/97, la enfermedad causó pérdidas de un 28,50% en la producción total de maíz, registrándose pérdidas del 32,47% en la provincia de Córdoba y del 22,62% en la provincia de Buenos Aires.



**Figura 1. Sintomatología del Mal de Río Cuarto en maíz e insecto vector. Algunos de los síntomas consisten en plantas de tamaño severamente reducido (A), tallos engrosados y chatos (B), plantas con espigas múltiples y pequeñas (C), mazorcas con deficiencia en la formación de granos (D) y enaciones sobre la nervadura en el envés de las hojas (E). Fotografía de una chicharrita *Delphacodes kuscheli* Fennah, vector del MRCV (F).**

Desde el punto de vista epidemiológico, la zona endémica establecida inicialmente cubre una extensa área del sur de la Provincia de Córdoba. Su distribución se incrementó después de la severa epidemia de la campaña 1996/97 (Lenardon et al., 1998) ya que los cambios climáticos producidos en los años siguientes fueron propicios para el desarrollo del insecto vector en otras zonas productoras de maíz del país (Laguna et al., 2000, 2002). Un relevamiento del avance de las zonas de incidencia de la enfermedad realizado en el Instituto de Fisiología y Fitopatología Vegetal (IFFIVE) del INTA del año 2004 demostró que el Mal de Río Cuarto causó la pérdida total de la cosecha en zonas del centro-oeste de la provincia de Buenos Aires (Trenque Lauquen, Bolívar y

General Villegas) y pérdidas severas en el norte de La Pampa, en el sur de Santa Fe y en el este-sudeste de la provincia de Córdoba (Figura 2). También fue detectada la presencia del virus en lotes de maíz de las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán, Catamarca, Formosa, Corrientes, Misiones y San Luis (Laguna et al., 2002). Finalmente, a pesar de que en las siguientes campañas la incidencia disminuyó hasta circunscribirse sólo a la zona endémica de Río Cuarto en donde se detectaron altos niveles de ataque en las siembras de noviembre de 2005, durante la campaña 2006/07 la enfermedad se volvió a expandir a casi todas las zonas maiceras. Lamentablemente no se cuenta con datos sobre las campañas posteriores al 2007.



*Figura 2. Zona de producción de maíz y distribución del Mal de Río Cuarto. Se muestra la distribución geográfica de la zona productora de maíz en la Argentina (izquierda, verde) según el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación, y el avance anual del Mal de Río Cuarto desde 1994 y hasta la campaña agrícola 2002/2003 (Laguna et al., 2002).*

La incidencia de la enfermedad es principalmente dependiente de la abundancia del insecto vector. Inviernos cálidos y con pocas lluvias favorecen las altas poblaciones de chicharritas y los vientos facilitan su dispersión masiva (Ornaghi et al., 2011). La cercanía de cereales de invierno y malezas hospedantes llegando al fin de su ciclo aumentan la probabilidad de que los cultivos de maíz, en su etapa más susceptible, reciban migraciones de insectos buscando plantas verdes para alimentarse. Las estrategias de manejo actuales se basan en el conocimiento de la fluctuación poblacional de los vectores, adelantando o retrasando las fechas de siembra si fuera necesario. Adicionalmente, las técnicas de control químico del insecto vector mediante el uso de insecticidas de cobertura total o curasemillas logran disminuir el inóculo inicial.

De manera complementaria se han desarrollado híbridos de maíz que exhiben diferentes grados de tolerancia al Mal de Río Cuarto y líneas endocriadas recombinantes (RILs) que permitieron el mapeo de QTLs de tolerancia (Bonamico et al., 2010, 2012; Rossi, Borghi, Renzo, & Bonamico,

2015). Sin embargo, la tolerancia se ve sobrepasada cuando cíclicamente ocurren epidemias asociadas con cambios de temperatura y precipitaciones en los meses de invierno, cada vez más frecuentes como consecuencia del cambio climático. Adicionalmente, la utilización de híbridos tolerantes y los cambios eventuales en las fechas de siembra producen pérdidas indirectas ya que ni los cultivares tolerantes son los más rendidores ni las fechas son las óptimas para alcanzar el rendimiento máximo potencial del cultivo.

Argentina es actualmente el tercer exportador mundial de maíz y a nivel nacional la producción de este cultivo pasó de 30,1 a 35,5 toneladas entre las campañas 2015-2016 y 2016-2017, ubicándose en segundo lugar debajo de la soja (Bolsa de Cereales de Rosario, Estimación Mensual Nacional N° ESP84, enero 2017). Se ha percibido un incremento mundial de la demanda de cereales y oleaginosas no sólo con fines alimenticios sino también para la producción fuentes de energía alternativas al petróleo como el bioetanol. A nivel local, el desarrollo de nuevas estrategias que minimicen el impacto de las variaciones eco-ambientales producto del cambio climático es una necesidad prioritaria. En este contexto, el estudio del MRCV y la comprensión de las interacciones que se generan entre el virus y sus hospedantes resultan de gran importancia para el desarrollo de productos biotecnológicos y la optimización prácticas agrícolas que controlen de forma integrada la enfermedad.

### *La familia Reoviridae*

---

De acuerdo al Noveno Reporte del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), la familia *Reoviridae* está compuesta por dos subfamilias que comprenden 15 géneros (King, Adams, Carsten, & Lefkowitz, 2012). Los virus pertenecientes a esta familia afectan a un amplio rango de hospedantes que incluye protozoos, hongos, insectos, plantas y vertebrados (Tabla 1). Sus miembros comparten características biológicas en el ciclo infectivo general y a menudo las proteínas virales de miembros de los distintos géneros de esta familia presentan equivalencias funcionales y variados grados de homología a nivel aminoacídico. Los virus pertenecientes a los géneros *Oryzavirus*, *Fijivirus* y *Phytoreovirus* son capaces de infectar tanto plantas como insectos.

El estudio de los reovirus que infectan animales está más avanzado que el de los reovirus vegetales, siendo los géneros *Rotavirus* (causante de diarrea infantil) y *Orbivirus* (con el miembro tipo *Bluetongue virus* o BTV, causante de enfermedades de rumiantes) los más ampliamente estudiado debido a su importancia sanitaria.

Familia	Subfamilia	Género	Especie tipo	Hospedante
<b>Reoviridae</b>	<i>Spinareovirinae</i>	<i>Orthoreovirus</i>	<i>Mammalian orthoreovirus</i>	Vertebrados
		<i>Aquareovirus</i>	<i>Aquareovirus A</i>	Insectos, Vertebrados
		<b><i>Oryzavirus</i></b>	<b><i>Rice ragged stunt virus</i></b>	<b>Insectos, Plantas</b>
		<b><i>Fijivirus</i></b>	<b><i>Fiji disease virus</i></b>	<b>Insectos, Plantas</b>
		<i>Mycoreovirus</i>	<i>Mycoreovirus 1</i>	Hongos
		<i>Cypovirus</i>	<i>Cypovirus 1</i>	Insectos
		<i>Idnoreovirus</i>	<i>Idnoreovirus 1</i>	Insectos
		<i>Dinovernavirus</i>	<i>Aedes pseudoscutellaris reovirus</i>	Insectos
		<i>Coltivirus</i>	<i>Colorado tick fever virus</i>	Insectos, Vertebrados
	<i>Sedoreovirinae</i>	<i>Orbivirus</i>	<i>Bluetongue virus</i>	Insectos, Vertebrados
		<i>Rotavirus</i>	<i>Rotavirus A</i>	Vertebrados
		<i>Seadornavirus</i>	<i>Banna virus</i>	Insectos, Vertebrados
		<b><i>Phytoreovirus</i></b>	<b><i>Wound tumor virus</i></b>	<b>Insectos, Plantas</b>
		<i>Cardoreovirus</i>	<i>Eriochair sinensis reovirus</i>	Insectos
		<i>Mimoreovirus</i>	<i>Micromonas pusilla reovirus</i>	Protozoos

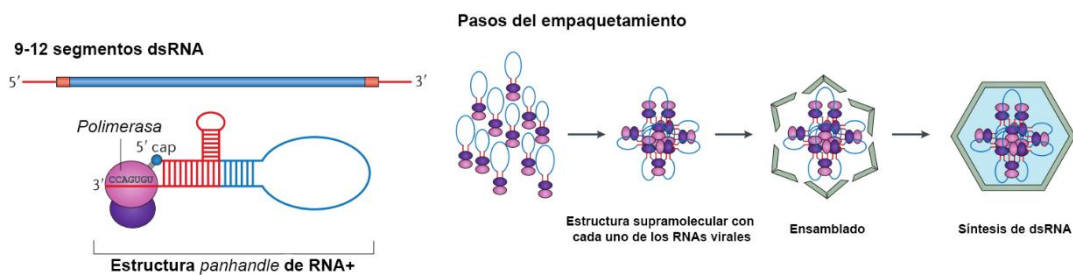
**Tabla 1.** Subfamilias y géneros pertenecientes a la familia *Reoviridae*. Se muestran las especies tipo para cada género y su rango de hospedantes. En negrita se resaltan los tres géneros que infectan plantas (ICTV, 2012).

Las partículas virales de la familia *Reoviridae* se caracterizan por poseer simetría icosaédrica y un diámetro de 60-80 nm. Según el género, poseen una, dos o tres cápsides proteicas concéntricas que rodean a los segmentos de RNA doble cadena lineales que constituyen el genoma viral. Las dos subfamilias se diferencian por la presencia (subfamilia *Spinareovirinae*) o ausencia (subfamilia *Sedoreovirinae*) de proyecciones proteicas denominadas espículas en los vértices del *core* viral. La capa más interna de las partículas virales o *core* rodea un número variable de segmentos genómicos de dsRNA. Entre las enzimas activas que forman parte del virión, se encuentran una polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRp por sus siglas en inglés) con funciones de transcriptasa (para la síntesis de RNA de cadena positiva utilizando como templado dsRNA) y de replicasa (para la síntesis de dsRNA sobre un templado de ssRNA), una guanilil transferasa que realiza el *capping* de los mRNA virales y una helicasa. Las espículas en los vértices de la partícula viral actuarían como conductos a través de los cuales el mRNAs son extruidos hacia el exterior (King et al., 2012).

En cuanto a los genomas de la familia, los reovirus pueden contener entre 9 y 12 segmentos genómicos de dsRNA lineal dependiendo del género. Dichos segmentos se denominan S1 a S12 según su movilidad electroforética, siendo S1 el segmento de menor movilidad y S12 el de mayor movilidad. Solo una de las dos cadenas del dsRNA es codificante y en general los segmentos son monocistrónicos, con algunas excepciones. La cadena positiva de cada

segmento contiene una estructura tipo *cap* en su extremo 5' (7mGpppN2'OmpNp...) y es probable que en algunos casos el extremo 5' terminal de la cadena negativa se encuentre fosforilado. Ambas cadenas de RNA poseen un grupo –OH en el extremo 3' y los mRNA virales carecen de cola de poli A.

Cada virión maduro posee solo una copia de cada segmento genómico. El mecanismo involucrado en el proceso de distribución precisa de los segmentos y ensamblado de las partículas se encuentra muy poco comprendido, pero no es al azar como ocurre en otros virus segmentados como *Infectious bursal disease virus* (Luque et al., 2009). Los datos disponibles para Rotavirus sugieren que este proceso comienza con moléculas de RNA simple cadena de polaridad positiva. Los extremos 5' y 3' no codificantes poseen secuencias complementarias entre sí, que permiten que los mensajeros se plieguen sobre sí mismos y formen estructuras de tipo mango de sartén o *Panhandle* seguidas por un *stem-loop* (Figura 3). Luego, secuencias únicas de cada segmento pero altamente conservadas entre miembros de un mismo grupo serían las responsables de la formación de un complejo supramolecular a través de interacciones RNA-RNA. En BTV, se ha descrito que este mecanismo comienza por el segmento más pequeño (S10) y continúa, a través de interacciones RNA-RNA, con los segmentos de mediano tamaño y largo tamaño consecutivamente. La formación de la cápside proteica ocurriría en forma coordinada y, finalmente, la síntesis de dsRNA sólo cuando las proteínas de la cápside interna se encuentran preensambladas (ver Figura 3) (Gridley & Patton, 2014).



**Figura 3. Modelo propuesto de plegado, distribución y empaquetamiento de los segmentos virales en Reovirus. Adaptado de** (McDonald, Nelson, Turner, & Patton, 2016). **En rojo se indican los nt que intervienen en la formación de estructuras de tipo mango de sartén (“panhandle”). Con un rectángulo se indica el ORF y con una línea las regiones 5' y 3' no codificantes. Los círculos rosa indican la RNA polimerasa y los círculos violetas la RNA helicasa viral**

Una característica destacable de los reovirus es que la replicación ocurre en “factorías virales” o viroplasmias, que son inclusiones citoplasmáticas electrodensas, principalmente compuestas por una matriz proteica de origen viral y material fibrilar. Se postula que todo el proceso de replicación y empaquetamiento ocurre sobre esta estructura.

### *Los reovirus vegetales*

Dentro de la familia *Reoviridae*, los géneros *Fijivirus*, *Phytoreovirus* y *Oryzavirus* son capaces de infectar plantas e insectos hemípteros que actúan como vectores. En la Tabla 2 se describen algunas características distintivas de cada uno de los tres géneros. Los reovirus vegetales son particularmente relevantes debido a que infectan cultivos económicamente importantes como el maíz y el arroz, causando pérdidas de producción en diversos países productores.

Desde el punto de vista biológico, todos los virus de estos géneros tienen la capacidad de replicar tanto en hospedantes vegetales como en insectos vectores. En cuanto a los primeros generalmente su rango de hospedante está limitado a monocotiledóneas donde replican sólo en tejido floemático y provocan síntomas muy severos. En cuanto a los vectores, se han reportado infecciones en insectos hemípteros de la familia *Delphacidae* (chicharritas o *planthoppers*) y *Cicadellidae* (cotorritas o *leafhoppers*). Contrariamente a lo que ocurre en plantas, en estos organismos la infección no posee tropismo definido de tejido y no produce síntomas detectables (C. C. Chen, Hsu, Chen, & Chiu, 1989; Hirumi, Granados, & Maramorosch, 1967).



**Reovirus vegetales**

<b>Género (Nº segmentos)</b>	<b>Especie (acrónimo)</b>	<b>Localización geográfica</b>	<b>Hospedante vegetal</b>	<b>Tejido en que replica</b>	<b>Insecto vector</b>
<b>Phytoreovirus (12)</b>	<b>Wound tumor virus (WTV)</b>	N. América	Dicotiledóneas	Floema	
	<b>Rice dwarf virus (RDV)</b>	S. E. Asiático		Todos	Cotorritas ("leafhoppers")
	<b>Rice gall dwarf virus (RGDV)</b>	S. E. Asiático			
<b>Fijivirus (10)</b>	<b>Fiji disease virus (FDV)</b>	Oceanía		Monocotiledóneas (gramíneas)	Floema
	<b>Maize rough dwarf virus (MRDV)</b>	Europa			
	<b>Mal de Río Cuarto virus (MRCV)</b>	S. América			
	<b>Oat sterile dwarf virus (ORDV)</b>	N. y centro de Europa			
	<b>Pangola stunt virus (PSTV)</b>	Centroamérica y Australia			
	<b>Rice black streaked dwarf virus (RBSDV)</b>	N. E. Asiático			
	<b>Southern rice black streaked dwarf virus (SRBSDV)</b>	S. E. Asiático			
<b>Oryzavirus (10)</b>	<b>Garlic dwarf virus (GDV)</b>	Europa	Monocotiledóneas (liliáceas)		
	<b>Rice ragged stunt virus (RRSV)</b>	S. E. Asiático	Monocotiledóneas (gramíneas)		
	<b>Echinochloa ragged stunt virus (EGSV)</b>	S. E. Asiático			

**Tabla 2. Géneros, especies y características biológicas generales de los reovirus vegetales. Extraído de (Llauger, 2015).**

### **El género Fijivirus**

Los miembros del género *Fijivirus* poseen genomas compuestos por 10 segmentos de dsRNA, viriones con doble capa proteica de simetría icosaédrica, un rango de hospedantes vegetales que abarca exclusivamente monocotiledóneas y son transmitidos por chicharritas o *planthoppers* de la familia *Delphacidae*. Su genoma está compuesto por 10 segmentos de dsRNA (S1 a S10). Todos los fijivirus secuenciados poseen 7 segmentos monocistrónicos y 3 bicistrónicos (S5, S7 y S9 en el caso del MRCV), con excepción del *Nilaparvata lugens reovirus*

(NLRV) que posee sólo 2 segmentos bicistrónicos. Dos de estos segmentos (MRCV S7 y S9) poseen dos ORFs no superpuestos separados por una región intergénica y el tercero (MRCV S5) contiene dos ORFs parcialmente superpuestos. Se desconoce el mecanismo de expresión de todos los segundos ORFs, y hasta el momento sólo fue detectado MRCV P7-2 en el contexto de una infección natural (Saavedra Pons, 2012). Llamativamente, P7-2 y P9-2 en RBSDV no fueron detectados a tiempos tardíos utilizando anticuerpos específicos (Isogai, Uyeda, & Lee, 1998). Por lo tanto, cabe la posibilidad que estas proteínas se expresen en muy bajos niveles o en tiempos muy tempranos postinfección.

Los fijivirus causan enfermedades económicamente relevantes en caña de azúcar (FDV en Australia), arroz (RBSDV y SRBSDV en China) y maíz (MRCV en Argentina y MRDV en España, Italia, Grecia e Israel). Los miembros de este género replican en células del floema de plantas de la familia *Gramineae* ó *Liliaceae* y (como ya se explicó para MRCV) el síntoma distintivo de las enfermedades es la hipertrofia de los tejidos floemáticos (que incluye expansión y multiplicación celular) en la cara abaxial de las hojas (enaciones). El NLRV replica únicamente en el insecto *Nilaparvata lugens* produciendo una infección asintomática, aunque el virus es también capaz de permanecer y circular (pero no replicar) en los tejidos vasculares de plantas de arroz, constituyendo un reservorio natural (Nakashima & Noda, 1995).

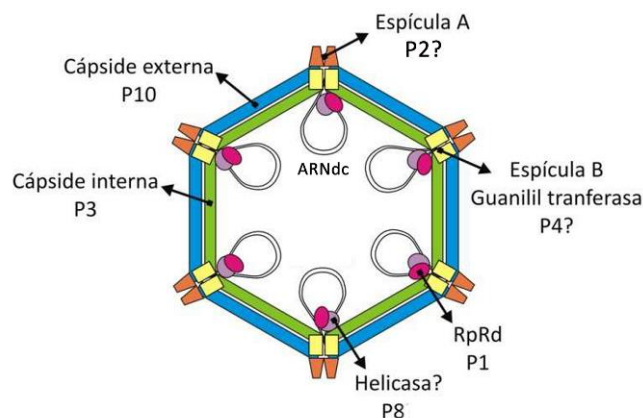
Se postula que los fijivirus se originaron a partir de un virus de insectos ancestral y más tarde en su historia evolutiva adquirieron la capacidad de multiplicar en plantas (L R Nault & Ammar, 1989). Entre las evidencias que fundamentan esta hipótesis, está la marcada diferencia en sintomatología que producen los miembros del género entre hospedantes, siendo prácticamente indetectable en insectos y muy severa en plantas. Adicionalmente, se han identificado genes no esenciales para la replicación del RDV en plantas (Y. Pu et al., 2011) mientras que no se han detectado genes no esenciales en insectos. Finalmente, como se mencionó, existe una especie de fijivirus capaz de replicar sólo en insectos. De manera interesante, ésta especie viral carece del segundo ORF en el segmento S7, por lo que se postula que este gen sería esencial para la replicación en plantas (V. C. Mongelli, 2010).

### *El virus de Mal de Río Cuarto y su caracterización molecular*

---

Nuestro grupo demostró que el MRCV constituye una especie independiente dentro del género *Fijivirus* y que su genoma está compuesto por 10 segmentos de dsRNA (S1 a S10) que codifican para un total de 13 proteínas (P1, P2, P3, P4, P5-1, P5-2, P6, P7-1, P7-2, P8, P9-1, P9-2 y P10). El estudio de las proteínas que componen las partículas virales demostró que el MRCV

codifica para al menos 5 proteínas estructurales: P1, P3, P4, P8 y P10 (Ana J Distéfano, 2004). El análisis de sus secuencias indicó que **P1** es la RpRd viral (Ana J. Distéfano et al., 2003), **P3** es la proteína mayoritaria de cápside interna ó *core* (Ana J. Distéfano et al., 2003; Ana J. Distéfano, Maldonado, Hopp, & Del Vas, 2009), **P4** sería una proteína minoritaria de cápside interna, probablemente la espícula de “tipo B” y además presenta un motivo típico de las guanilil transferasas (Ana J Distéfano, 2004; Supyani, Hillman, & Suzuki, 2007), **P8** podría tener función de helicasa (A. J. Distéfano, Conci, Hidalgo, Guzmán, Hopp, del Vas, et al., 2002) y **P10** constituye la proteína mayoritaria de cápside externa (A J Distéfano et al., 2005). La identidad de la P3 como constituyente mayoritario de proteína del *core* ha sido comprobada experimentalmente en ensayos de inmunolocalización en plantas infectadas (Ana J. Distéfano et al., 2009). También en este tipo de ensayos histoquímicos se pudo identificar a P4 ubicada en los vértices de las partículas virales extraídas de plantas de maíz infectadas (Ana J Distéfano, 2004). Mediante ensayos de *far-Western blot* se observó que P3 es capaz de interactuar con ella misma, con P1 y con P4 (Ana J Distéfano, 2004).



**Figura 4. Partícula viral, genoma y proteínas estructurales del MRCV. Esquema de la partícula viral del MRCV con la distribución de las proteínas estructurales y el genoma viral según lo descrito para reovirus animales. (Extraído de (V. C. Mongelli, 2010))**

La proteína **P2** ha sido inmunodetectada en extractos de plantas infectadas como una proteína de 90 kDa (lo que indica que sufriría un clivaje postraducciona l dado que su PM teórico es 134,4 kDa) e inmunolocalizada en viroplasm as de células de plantas infectadas. Esto, sumado a que el antisuero no reacciona contra proteínas de partículas virales, ha llevado a proponer que P2 sería una proteína no estructural (Ana J Distéfano, 2004). Sin embargo, dado que las partículas virales purificadas son muy inestables y normalmente pierden casi completamente la cápside externa, no se debe descartar la posibilidad de que P2 sea estructural y constituya la espícula “tipo A” del virión.

Si bien el conocimiento de la función de las proteínas no estructurales del MRCV es escaso, en los últimos años nuestro grupo llevó a cabo estudios funcionales y de localización subcelular de las proteínas de MRCV en plantas e insectos y determinó que las proteínas P5-1, P5-2, P6, P7-1, P7-2, P9-1 y P9-2 son no estructurales (NSPs) (Ana J Distéfano, 2004) y que su expresión es fundamental para el ciclo viral en hospedantes vegetales y de insectos (G. A. Maroniche, 2011; V. C. Mongelli, 2010).

**P5-1** presenta un motivo TKF en el extremo carboxilo terminal que podría funcionar como una señal no canónica de importación a peroxisomas. Cuando es fusionada a GFP y expresada en células de epidermis de cebolla se distribuye formando estructuras punteadas. La eliminación del TKF provoca una pérdida de este patrón, demostrando que dicho motivo es funcional y responsable del direccionamiento subcelular (V. C. Mongelli, 2010). En células de insecto, la fusión GFP:P5-1 se localiza en el citoplasma con un patrón granular fino que no colocaliza con peroxisomas y se pierde cuando se remueve el TKF (G. Maroniche, Mongelli, Peralta, Distéfano, Llauger, Taboga, Hopp, del Vas, et al., 2010).

**P5-2** es una proteína no estructural codificada por el segundo ORF del segmento S5 que tiene localización nuclear en células de insectos (G. A. Maroniche, 2011; G. Maroniche et al., 2012). El análisis de las secuencias disponibles de segmentos S5 de *Fijivirus* sugieren que el segundo ORF de dicho segmento se encuentra conservado y es codificante (A. E. Firth & Atkins, 2009). Se postula que el mecanismo de traducción de esta proteína sería un *frameshift* traduccional +1 que ocurriría en la secuencia UCU\_UUU\_CG[A/U] (A. E. Firth & Atkins, 2009; G. A. Maroniche, 2011) dando lugar a una proteína de fusión P5-1/P5-2 de aproximadamente 120 kDa. El estudio del mecanismo traduccional de esta proteína forma parte de la presente Tesis y se ampliará más adelante en la introducción y en el CAPÍTULO 3.

**P6** es una proteína no estructural de 90 kDa codificada por el segmento S6. Posee un extenso motivo *coiled-coil* con cierta similitud a la cola de la miosina o al brazo de las proteínas de segregación cromosómica (SMC, (V. C. Mongelli, 2010)). Al ser expresada en células de insecto Sf9, la fusión GFP:P6 se concentra en grandes estructuras perinucleares irregulares que no colocalizan con el aparato de Golgi, con el retículo endoplásmico ni con el citoesqueleto de actina, pero sí colocalizan parcialmente con tubulina (G. Maroniche et al., 2012; G. Maroniche, Mongelli, Peralta, Distéfano, Llauger, Taboga, Hopp, del Vas, et al., 2010). La proteína es capaz de interactuar con sí misma y con P9-1 en ensayos de doble híbrido de levaduras, y dicha interacción es dependiente del motivo *coiled-coil*. Interactúa también con una tiorredoxina celular (Llauger, 2015) y posee un motivo PEST (rico en prolina [P], ácido glutámico [E], serina [S], y treonina [T]) que está conservado y podría regular su degradación vía proteasoma (Llauger, de Haro, Alfonso, & del Vas, 2017;

Llauger, 2015). Se postula que esta proteína sería el componente minoritario del viroplasma (Llauger et al., 2017; G. A. Maroniche, 2011; G. Maroniche et al., 2012).

**P7-1** se encuentra distribuida homogéneamente tanto en el citoplasma como en el núcleo de células Sf9 de insecto (G. Maroniche et al., 2012).

**P7-2** expresada en el contexto de un vector PVX recombinante da lugar a síntomas más severos que los producidos por el virus salvaje en *N. benthamiana*, y su expresión es capaz de alterar los niveles de ARNm de transgenes expresados transitoriamente en plantas de *N. benthamiana*, mediante mecanismos postranscripcionales (V. C. Mongelli, 2010). Hasta la fecha sólo se ha logrado inmunodetectar por “Western blot” a la proteína P7-2 a partir de extractos proteicos crudos de hoja y raíz de maíces infectados con MRCV utilizando un antisuero policlonal obtenido de conejos inmunizados con la proteína recombinante (Saavedra Pons, 2012). Tanto en protoplastos de trigo como en células de insectos se encontró que P7-2 fusionada a GFP se localiza en el citoplasma y el núcleo (G. Maroniche et al., 2012; Saavedra Pons, 2012). Asimismo se determinó que P7-2 es activadora transcripcional en el sistema de doble híbrido de levaduras (Llauger, 2015). Finalmente, se determinó que P7-2 interactúa con la proteína SKP1 (*S-Phase Kinase Associated Protein 1*), componente del complejo E3 ligasa del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) (Llauger, 2015).

**P9-1** es capaz de autointeractuar de manera dependiente de los últimos 24 residuos denominados *C-arm* (Llauger et al., 2017), es capaz de interactuar con la proteína P6, tiene actividad ATPasa y capacidad de unir a ácidos nucleicos *in vitro* y da lugar a inclusiones citoplasmáticas cuando se la expresa transitoriamente en células de insecto (G. A. Maroniche, 2011; G. Maroniche et al., 2012; G. Maroniche, Mongelli, Peralta, Distéfano, Llauger, Taboga, Hopp, del Vas, et al., 2010). Estas características nos condujeron a proponer que P9-1 es el componente mayoritario del viroplasma (Llauger et al., 2017; G. Maroniche, Mongelli, Peralta, Distéfano, Llauger, Taboga, Hopp, del Vas, et al., 2010). Estudios de inmunohistoquímica demostraron que P9-1 se localiza en los viroplasmos de células de floema de trigo y en células de glándulas salivales de chicharritas (Fabiana A Guzmán et al., 2010). La proteína es capaz de interactuar también con una posible aldosa 1-epimerasa y una aciltransferasa (Llauger, 2015). Así como P6, esta proteína también posee un potencial motivo PEST de degradación vía proteasoma (Llauger et al., 2017; Llauger, 2015).

**P9-2** es una glicoproteína de membrana capaz de inducir la formación de filopodios que colocalizan con actina cuando es expresada en células de insecto, sugiriendo que esta proteína juega un rol en el transporte y/o movimiento viral de célula a célula en el insecto (G. A. Maroniche, 2011; G. Maroniche et al., 2012).

A modo de resumen, en la Tabla 3 se muestra una comparación entre los segmentos homólogos de MRCV, RBSDV, SRBSDV, MRDV, FDV (especie tipo) y NLRV (fijivirus de insectos) y las proteínas para las que codifican.

Segmento	MRCV				RBSDV			SRBSDV			FDV			NLRV							
	Tamaño del inserto (pb)	ORFs	Tamaño de la proteína (kDa)	Función	Segmento equivalente	% Ident.	Función	Segmento equivalente	% Ident. <sup>9</sup>	Función	Segmento equivalente	% Ident.	Función	Segmento equivalente	% Ident.	Función <sup>27</sup>					
P1	MRCV S1	4501	38-4432	168,4	RpRd <sup>1</sup>		RBSDV S1	77,9	RdRp <sup>17</sup>		SRBSDV S1	78,6	RdRp <sup>14</sup>		FDV S1	64,2	RdRp <sup>24</sup>		NLRV S1	32,3	RdRP
P2	MRCV S2	3617	34-3549	134,4	Componente de viroplasma <sup>2</sup>		RBSDV S4	56,8	Espícula "tipo B" <sup>17</sup>		SRBSDV S4	72,9	Espícula "tipo B" <sup>14</sup>		FDV S2	40,3	Mayoritaria de cápside interna <sup>26</sup>		NLRV S2	20,4	Espícula "tipo B"
P3	MRCV S3	3826	47-3727	141,7	Mayoritaria de cápside interna <sup>1,3</sup>		RBSDV S2	84,5	Mayoritaria de cápside interna <sup>17</sup>		SRBSDV S2	83,1	Mayoritaria de cápside interna <sup>9</sup>		FDV S3	57,6	Espícula "tipo B" <sup>24</sup>		NLRV S3	22,4	Mayoritaria de cápside interna
P4	MRCV S4	3566	16-3453	131,7	Espícula de "tipo B", guanilil transferasa <sup>4</sup>		RBSDV S3	72,6	Guanilil transferasa <sup>28</sup>		SRBSDV S3	56,8	Guanilil transferasa <sup>14</sup>		FDV S4	56	FD		NLRV S4	23	FD
P5-1 P5-2	MRCV S5	3162	16-2814	107	FD		RBSDV S5	62,8	NS, componente de viroplasma <sup>29</sup>		SRBSDV S5	59,1	Componente de viroplasma <sup>11,12</sup>		FDV S5	35,7	FD		NLRV S5	23	FD
			2366-3133	28,8	FD		RBSDV S5	56,4	FD		SRBSDV S5	50,5	FD		FDV S5	29,2	FD		NLRV S5	21,4	FD
P6	MRCV S6	2638	80-2446	90	FD		RBSDV S6	44,8	Supresor PTGS <sup>16</sup> , componente de viroplasma <sup>21</sup>		SRBSDV S6	42,5	Supresor PTGS <sup>14</sup> , componente de viroplasma <sup>11,12,13</sup>		FDV S6	27,4	FD		NLRV S6	ND	FD
P7-1 P7-2	MRCV S7	2186	41-1126	41,5	FD		RBSDV S7	61,3	Estructuras tubulares <sup>15</sup> , ¿MP? <sup>22</sup>		SRBSDV S7	61,7	Estructuras tubulares <sup>10</sup>		FDV S7	53,17	FD		NLRV S10	23,6	Estructuras tubulares?
			1176-2105	36,8	FD		RBSDV S7	45,2	FD		SRBSDV S7	42,3	FD		FDV S7	27,69	FD		NLRV S10		Este segmento no tiene 2do ORF
P8	MRCV S8	1931	25-1800	68,3	¿Helicasa? <sup>3</sup> , unión NTP <sup>4</sup>		RBSDV S8	53	Represor transcripcional <sup>19</sup> , unión NTP <sup>17</sup> , proteína del "core" <sup>17</sup>		SRBSDV S8	55,4	Proteína del "core" <sup>14</sup>		FDV S8	38	FD, unión NTP <sup>23</sup>		NLRV S7	22	FD, unión NTP
P9-1 P9-2	MRCV S9	1870	52-1065	39	Mayoritaria de viroplasma <sup>6</sup>		RBSDV S9	64,5	Mayoritaria de viroplasma <sup>15,20</sup>		SRBSDV S9	67,1	Mayoritaria de viroplasma <sup>11,13</sup>		FDV S9	37,3	Proteína estructural <sup>23</sup>		NLRV S9	ND	Mayoritaria de viroplasma
			1130-1756	24,7	¿MP en insectos? <sup>7</sup>		RBSDV S9	60,5	FD		SRBSDV S9	61,6	FD		FDV S9	35,3	Proteína no estructural <sup>23</sup>		NLRV S9	26,2	FD
P10	MRCV S10	1870	52-1065	39	Mayoritaria de cápside externa <sup>8</sup>		RBSDV S10	72,4	Mayoritaria de cápside externa <sup>17,18</sup>		SRBSDV S10	71,9	Mayoritaria de cápside externa <sup>14</sup>		FDV S10	49	Mayoritaria de cápside externa <sup>25</sup>		NLRV S8	21,7	Mayoritaria de cápside externa

**Tabla 3. Comparación entre los segmentos homólogos de MRCV, RBSDV, SRBSDV, FDV (miembro tipo) y NLRV (fijivirus de insectos) y las proteínas para las que codifican. % ident: porcentaje de identidad a nivel aminoacídico entre la proteína de MRCV y su homóloga correspondiente; FD: falta determinar. ND: No detectado. MP: proteína de movimiento. En amarillo se indican los segmentos que codifican para proteínas no estructurales y en verde aquellos que codifican para proteínas estructurales.** 1: (Ana J. Distéfano et al., 2003); 2: (Ana J. Distéfano, 2004); 3: (Ana J. Distéfano et al., 2009); 4: (V. C. Mongelli, 2010); 5: (A. J. Distéfano, Conci, Hidalgo, Guzmán, Hopp, del Vas, et al., 2002); 6: (G. Maroniche, Mongelli, Peralta, Distéfano, Llauger, Taboga, Hopp, del Vas, et al., 2010); 7: (G. A. Maroniche, 2011); 8: (A. J. Distéfano et al., 2005); 9: (Qiang Wang et al., 2010); 10: (Ying Liu et al., 2011); 11: (Mao et al., 2013); 12: (Jing Li et al., 2013); 13: (Jing Li et al., 2015); 14: (Qiang Wang et al., 2010); 15:; 16: (L. Zhang et al., 2005); 17: (H. M. Zhang, Chen, & Adams, 2001); 18: (L. Pu et al., 2012); 19: (Huijun Liu, Wei, Zhong, & Li, 2007); 20: (C. Zhang et al., 2008); 21: (Qian Wang et al., 2011); 22: (Z. Sun et al., 2012); 23: (Soo et al., 1998); 24: (Richard B McQualter, Smith, Dale, & Harding, 2003); 25: (R B McQualter, Burns, Smith, Dale, & Harding, 2004); 26: (Harding et al., 2006); 27: (Nakashima, Koizumi, Watanabe, & Noda, 1996); 28: (Supyani et al., 2007); 29: (Yang et al., 2014).

## *El trigo como modelo experimental para el estudio del MRCV*

---

Si bien el Mal de Río Cuarto no causa importantes pérdidas económicas para el cultivo del trigo, este cereal constituye un importante eslabón en la cadena epidemiológica de la enfermedad ya que funciona como reservorio del virus a campo en invierno (Ornaghi et al., 2011; Remes Lenicov, 1985). Los síntomas en plántulas de trigo afectadas bajo condiciones de campo aparecen a las 3-4 semanas a partir de la infección y son similares a los que ocurren en maíz: acortamiento de entrenudos y apariencia achaparrada, hojas cortas, erectas, de consistencia coriácea, nervaduras engrosadas y bordes recortados. Algunas hojas se enrollan en forma de tirabuzón (del V. Di Feo, Laguna, & Biderbost, 2010). En la Figura 5 se muestran los síntomas del MRCV en dos plantas de trigo a los 21 días post infección.

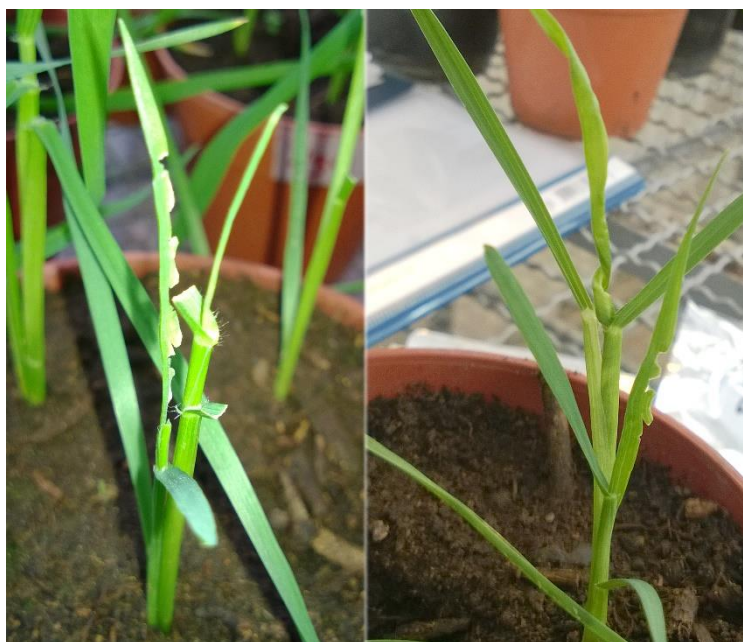
El trigo constituye en este momento el mejor modelo experimental para el estudio de la enfermedad debido a que su tasa de transmisión experimental es mayor con respecto al maíz (52% contra 14%;(Truol et al., 2001)). Además, el virus alcanza mayores concentraciones y el manejo en invernáculo es más sencillo por tratarse de una especie de menor porte (J D Arneodo, Guzman, Conci, Laguna, & Truol, 2002).

En cuanto a los recursos genómicos, tanto el mapeo físico como la secuenciación del genoma de trigo (*Triticum aestivum* cv *Chinese Spring*) se encuentran muy avanzados y a cargo de un consorcio internacional que tiene como objetivo lograr un recurso de calidad comparable al que existe en arroz (<http://www.wheatgenome.org>). Dado el gran tamaño de su genoma (17 Gpb, 125 veces el tamaño del genoma de *Arabidopsis thaliana*), el nivel de ploidía de adquisición relativamente reciente ( $2n=6x=42$ , hace menos de 10 mil años (Krasileva et al., 2017)) y el elevado número de secuencias repetitivas, la estrategia de secuenciación se basó en aislar los brazos cromosómicos por *flow sorting* (Vrána et al., 2000) y secuenciarlos independientemente. A medida que las tecnologías de secuenciación avanzan y se consiguen lecturas más largas y los ensambladores mejoran los algoritmos, se incorporan periódicamente nuevas versiones del genoma. La versión actual (TGACv1), depositada en la base de datos relacional *Ensembl plants* ((Kersey et al., 2016)<http://plants.ensembl.org/>) fue liberada en enero del 2016 y se considera que incluye más de 100 mil secuencias codificantes completas.

En cuanto a los recursos genéticos, en trigo existen enormes poblaciones secuenciadas de TILLING que permiten identificar mutaciones generadas sobre la secuencia de un gen específico en individuos de una población mutagenizada, tanto de trigo tetra como hexaploide (Krasileva et al., 2017). También está disponible la técnica de VIGS (silenciamiento génico inducido por virus) que permite el estudio funcional de genes por genética reversa(Godge, Purkayastha, Dasgupta, &



Kumar, 2008; Scofield, Huang, Brandt, & Gill, 2005). Finalmente, la transformación genética y el manejo posterior del material es más sencillo que en maíz (Dra. Dalia Lewi, comunicación personal).



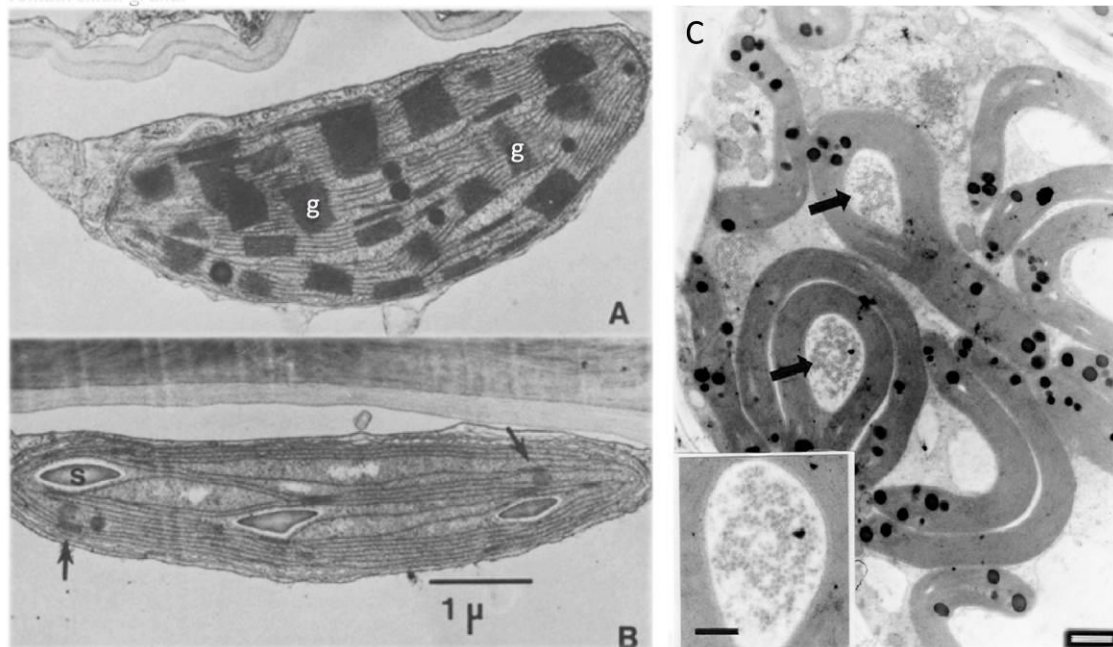
*Figura 5. Síntomas producidos por el MRCV en trigo a los 21 días post infección (dpi). Se observan plantas con marcada disminución del crecimiento, entrenudos acortados, hojas recortadas y enrolladas en forma de tirabuzón.*

### Alteraciones citopáticas y fisiológicas producidas por el MRCV en plantas

En la parte aérea de la planta, el virus se encuentra en bajas concentraciones en células del floema y en las enaciones (Joel D. Arneodo et al., 2002). En células infectadas se observa la formación de viroplasmos y ocasionalmente la aparición de arreglos cristalinos o estructuras tubulares que contienen partículas virales (*Viruses of plants. Descriptions and lists from the VIDE database.*, 1996). Se ha demostrado que los cloroplastos son las organelas más afectadas por la infección a nivel celular (Joel D. Arneodo et al., 2002): en células del parénquima del floema, los cloroplastos presentan alteraciones con una marcada desorganización del sistema de membranas de tilacoides, mientras que en células de parénquima de la vaina y de floema de maíz, los cloroplastos contienen gránulos de almidón y se encuentran curvados rodeando en ocasiones porciones del citoplasma con partículas virales (Figura 6C; Joel D. Arneodo et al., 2002)). El MRCV se acumula en mayor título en raíces produciendo alteraciones severas en el cilindro central, lignificación de dicha estructura y la endodermis y raíces laterales anormales con presencia de raíces abortivas (Giménez Pecci, M.P. Laguna et al., 1997; Tordable, Tavecchio, Lorenzo, & Abdala, 1991).

El acortamiento de entrenudos (enanismo), el retraso en el crecimiento, la pérdida de dominancia apical, así como la reducción del sistema radicular y foliar podrían estar relacionados con

alteraciones hormonales a nivel pleiotrópico. De hecho, se han reportado alteraciones en la concentración de ácido giberélico (Tordable et al., 1991), así como mayores niveles de JA en hojas y raíces (Vigliocco, Bonamico, Alemano, Miersch, & Abdala, 2002). Finalmente, se ha demostrado que plantas de trigo infectadas presentan un contenido de azúcares solubles superior al de plantas sanas y un aumento en la concentración de almidón en tejidos foliares (del V. Di Feo et al., 2010).



**Figura 6:** Alteraciones citopáticas causadas por el MRCV en enaciones de hojas de maíz. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de cloroplastos de células de mesófilo (A) y de células de la vaina (B) de maíz sano. g: grana, s: gránulo de almidón. Las flechas indican áreas en el cloroplasto de la vaina que parece contener granas pequeñas. C. Cloroplastos de una célula de la vaina de maíz infectado por MRCV. Los cloroplastos están agrandados, desorganizados y plegados, incluyendo en ocasiones porciones citoplasmáticas con partículas virales (flechas). En esta imagen los gránulos de almidón son de color negro oscuro (Barra= 1  $\mu$ m, barra detalle= 500 nm). A y B: Imágenes tomadas de (Smillie & Andersen, 1971). Imagen C tomada de (Joel D. Arneodo et al., 2002).

### *La respuesta inmune antiviral en plantas*

Las plantas están continuamente expuestas a un amplio espectro de patógenos. Cada uno de estos organismos establece una relación particular con la planta que se clasifica generalmente en biotrófica, hemibiotrófica o necrotrofica según el tipo de respuesta (Spoel & Dong, 2008; Spoel, Johnson, & Dong, 2007). Como primera línea defensiva, las plantas han desarrollado barreras estructurales y moléculas antimicrobianas que impiden la enfermedad. Además, han evolucionado diversos mecanismos celulares que limitan espacialmente la infección y evitan que el patógeno prosiga con su ciclo.

El silenciamiento por RNA es un mecanismo de regulación de la expresión génica cuyos componentes están conservados en eucariotas. En plantas controla procesos de crecimiento y desarrollo, estabilidad genómica, adaptación a condiciones de estrés y defensa frente a patógenos

(Chapman & Carrington, 2007). Existen varias vías que involucran silenciamiento por RNA todas ellas inducidas por cadenas dobles de RNA (dsRNAs) y controladas por distintas clases de pequeños RNAs (*small RNAs*, sRNAs). Los dsRNAs pueden tener varios orígenes y son el sustrato específico de una clase de RNAsas tipo III denominadas *Dicer-Like* (DCL) cuya actividad sobre los dsRNAs da lugar a la formación de sRNAs (Henderson et al., 2006; Margis et al., 2006). Los sRNAs actúan asociándose a los complejos efectores a través de su unión con las proteínas de tipo Argonauta (AGO) y les proporcionan especificidad dependiente de homología de secuencia (Vaucheret, 2008). La interacción de estos complejos con moléculas complementarias de RNAs conduce a una regulación post-transcripcional negativa a través del corte endonucleolítico de este RNA o de la represión de su traducción (Brodersen et al., 2008; Llave, Kasschau, Rector, & Carrington, 2002). La interacción con moléculas de DNA complementarias da lugar a su represión transcripcional a través de la modificación por metilación del DNA y/o las histonas (X. Zheng, Zhu, Kapoor, & Zhu, 2007; Zilberman, Cao, & Jacobsen, 2003).

Las distintas proteínas pertenecientes a los grupos DCL y AGO poseen funciones diferenciales y el número de genes varía entre organismos. El genoma de *Arabidopsis* contiene 4 genes DCL mientras que trigo y otras monocotiledóneas poseen al menos 5 (Margis et al., 2006). DCL4, DCL2 y DCL3 cortan dsRNAs produciendo sRNAs de 21, 22 y 24 nt respectivamente (Parent, Bouteiller, Elmayan, & Vaucheret, 2015). En cuanto a las proteínas AGO, en *Arabidopsis* y en arroz se han identificado 10 y 18 genes AGO respectivamente (Tolia & Joshua-Tor, 2007). Estudios bioquímicos utilizando proteínas de *Arabidopsis* demuestran que AGO1 y AGO7 tienen capacidad endonucleolítica sobre RNAs, mientras que AGO4 y AGO6 están implicadas en la metilación del DNA guiada por sRNAs (Mallory & Vaucheret, 2010).

El silenciamiento de RNA es una de las primeras capas de defensa celular antiviral en plantas. En su etapa de iniciación, el dsRNA viral generado a partir de complementariedad intra o inter molecular o de intermediarios replicativos es reconocido y procesado en sRNAs de 21-24 nt que al ser derivadas de secuencias virales adquieren el nombre de *virus-derived small RNAs* (vsiRNAs). Una de las cadenas de los vsiRNAs es cargada por proteínas AGO y ejerce su función efectora del silenciamiento formando complejos multienzimáticos denominados RISC (*RNA induced silencing complex*) que actúan sobre el RNA regulándolo a nivel post-transcripcional mediante clivaje endonucleolítico (Havecker et al., 2010; Vaucheret, 2008).

En una siguiente etapa, ocurre un proceso de amplificación del silenciamiento mediante vsiRNAs secundarios generados a partir de dsRNAs cuya síntesis es dependiente de la acción RNA polimerasas dependiente de RNA (*RNA-directed RNA polymerases* o RdRps) del hospedante (Wassenegger & Krczal, 2006). En *A. thaliana* se han identificado 6 genes que potencialmente codifican para proteínas RDRs, mientras que en monocotiledóneas 5 (Zong, Yao, Yin, Zhang, & Ma,

2009). Las actividades de las RDRs son estimuladas por RNAs que carecen de marcas de control de calidad, tales como *cap* o cola de poliA, características frecuentes en RNAs virales (Voinnet, 2008). Adicionalmente, los vsiRNAs retroalimentan positivamente la actividad de las RDRs generando nuevos RNAs que carecen de estas marcas por la actividad de RISC o que actúan como *primers* para la síntesis de dsRNA (Moissiard, Parizotto, Himber, & Voinnet, 2007). Finalmente, los vsRNAs secundarios participan en la dispersión sistémica del silenciamiento, que implica el transporte célula a célula y a través del floema de una señal del silenciamiento (Dunoyer, Brosnan, et al., 2010; Dunoyer, Schott, et al., 2010; Molnar et al., 2010).

Muchos virus de plantas poseen la facultad de interferir o bloquearla maquinaria de silenciamiento mediado por RNA mediante la acción de proteínas virales con capacidad supresora. Estas proteínas son muy diversas en cuanto a su secuencia, estructura y actividad y son capaces de interferir diversas etapas de las vías de silenciamiento (Pumplin & Voinnet, 2013). Una segunda capa defensiva actúa restringiendo el movimiento viral en el que intervienen las proteínas de resistencia R (Maule, Caranta, & Boulton, 2007; Palukaitis & Carr, 2008) y la producción de especies reactivas de oxígeno que en algunos casos culmina en la muerte celular programada (HR, respuesta hipersensible) en la zona de la invasión, aislando el patógeno del tejido circundante. El tipo de respuesta depende, en mayor medida, del balance hormonal que se establezca entre vías antagónicas: el ácido salicílico (SA) predomina en la resistencia contra patógenos biotróficos, mientras que las vías del etileno (Et) y del jasmónico (JA) prevalecen en mecanismos contra patógenos necrotrofos (Spoel et al., 2007).

Si bien el rol que juegan las vías antagónicas de SA y JA/Et ha sido profundamente estudiado en distintos patosistemas virus-planta, se ha identificado que las infecciones virales además provocan alteraciones en otras vías hormonales conocidas por su papel en el crecimiento y el desarrollo de las plantas tales como las de auxinas (Aux), brasinoesteroides (BR), citoquininas (CK) y ácido abscísico (ABA) (Denancé, 2013). Sin embargo, relativamente poco se conoce acerca de la función que cumple cada una de ellas en la modulación del *cross talk* hormonal e, especialmente en monocotiledóneas (Alazem & Lin, 2015).

Por todo lo mencionado, es esperable que una interacción viral compatible provoque enormes cambios en la homeostasis celular y en la fisiología general de la planta. Por un lado, la biogénesis y actividad de los vsiRNAs están gobernadas por los mismos componentes que controlan el silenciamiento endógeno, por lo que es esperable que al menos la cinética de esta vía se encuentre alterada. Simultáneamente, la acción de los supresores de silenciamiento virales genera efectos secundarios sobre diversas etapas de la biosíntesis de siRNAs endógenos. El direccionamiento de recursos hacia la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos virales, así como el incremento en las

especies reactivas de oxígeno y el desbalance hormonal que modula el tipo de respuesta pueden provocar, en forma coordinada o no, el desarrollo de síntomas.

### *La respuesta inmune antiviral en insectos*

---

Los insectos representan el grupo más vasto del reino Animalia, con más del 70% de las especies conocidas. Si bien la diversidad de las interacciones establecidas entre virus e insectos no ha sido estudiada en profundidad, resulta evidente postular que es inmensa y que comprende un amplio repertorio de mecanismos inmunes (Marques & Imler, 2016). Desde un punto de vista sanitario, varias enfermedades humanas, como el dengue y la fiebre amarilla, son causadas por virus transmitidos por insectos. Desde una perspectiva económica, los virus que infectan insectos benéficos, como abejas o gusanos de seda, pueden causar importantes pérdidas económicas. Finalmente, los virus (o la manipulación del sistema inmune del insecto) pueden usarse como agentes de control biológico contra insectos plagas.

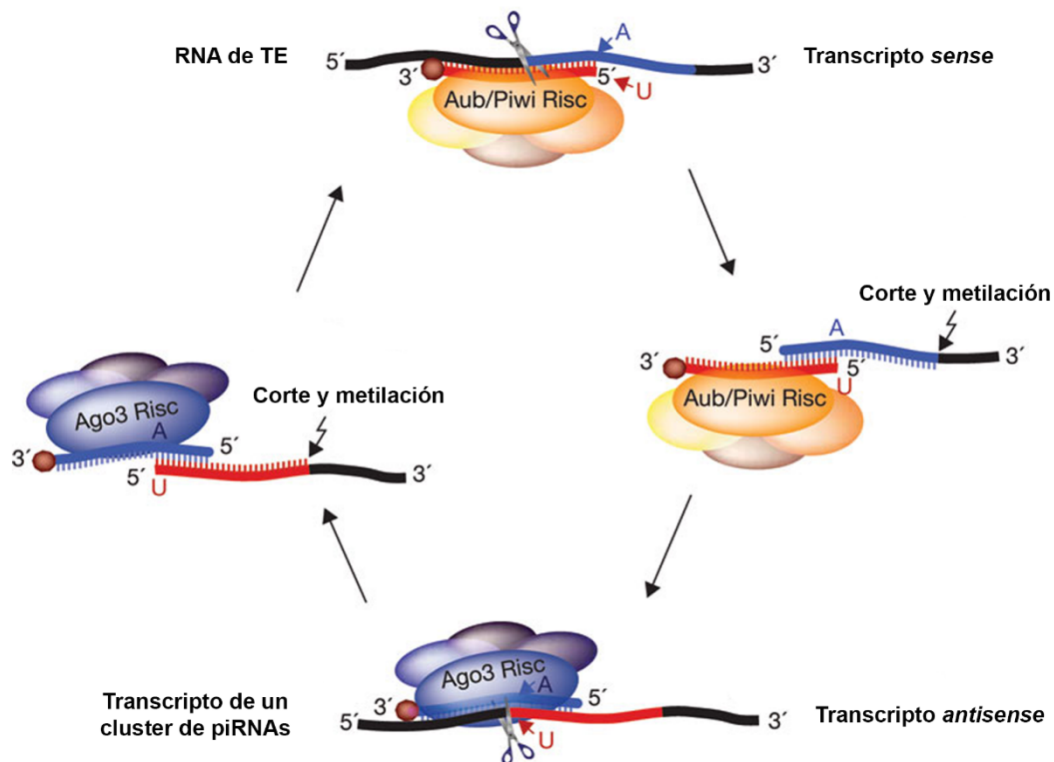
El silenciamiento mediado por RNA ha sido identificado en diversos grupos de insectos como mosquitos, moscas, abejas y lepidópteros (C. X. Li et al., 2015). La mayor parte del conocimiento sobre este sistema proviene de estudios en *Drosophila melanogaster* y mosquitos, donde se identificaron tres vías de generación de sRNAs: microRNAs (miRNAs), siRNAs y *PIWI-interacting RNAs* (piRNAs). Aunque todos ellos utilizan sRNAs de 21-30 nt para guiar el reconocimiento específico de secuencia unidos a proteínas AGO, los mismos difieren en su origen, biogénesis y función biológica (V. Mongelli & Saleh, 2016).

El mecanismo de silenciamiento mediado por RNA es también considerado una de las principales líneas defensivas contra virus en insectos. De manera similar a lo descrito para plantas en el apartado anterior, a través de la vía de los siRNAs el dsRNA viral es reconocido y procesado en el citoplasma por Dicer2 (DCR2) en fragmentos de 20-22 nt que luego son cargados en complejos RISC que contienen a la proteína efectora Argonaute2 (AGO2) (Gammon & Mello, 2015).

Hasta hace poco, sólo se conocía la contribución de la vía los siRNAs a la respuesta antiviral mediante la producción de vsiRNAs. Sin embargo, se han encontrado sRNAs derivados de virus con características de piRNAs utilizando secuenciación de nueva generación en mosquitos (Hess et al., 2011; Léger et al., 2012; Morazzani, Wiley, Murreddu, Adelman, & Myles, 2012; Vodovar et al., 2012). La biogénesis de piRNAs endógenos comienza con precursores de ssRNAs transcritos a partir de restos de secuencias de elementos transponibles (TEs). La endonucleasa Zucchini corta el precursor y el producto es cargado en proteínas PIWI o Aubergine (AUB) hasta su maduración, momento en el que presenta un enriquecimiento de secuencia de la base uracilo (U) en el extremo 5' (piRNAs primarios). Luego, por complementariedad de secuencia ocurre el clivaje del RNA derivado de un TE activo, iniciándose una segunda ronda de generación de piRNAs denominada

*ping-pong cycle* o *amplification cycle*, donde AGO3 es cargado con los productos de clivaje de AUB (complementarios al piRNA que inició el ciclo). Las proteínas AUB y AGO3 cargadas con piRNAs secundarios median el corte de más RNAs complementarios, generando nuevos piRNAs secundarios idénticos en secuencia a los piRNAs que iniciaron el ciclo. Dado que los piRNAs primarios se encuentran enriquecidos en U en el extremo 5' (U1), los secundarios complementarios suelen tener una superposición de 10 nt y contienen una adenina en la posición 10 (A10) (Czech & Hannon, 2016). Existen evidencias que indican que la vía de los piRNAs es principalmente activa en los tejidos de la línea germinal contribuyendo a mantener la estabilidad genómica durante la generación de gametas (Czech & Hannon, 2016).

Análisis funcionales demostraron que proteínas PIWI y AGO3 son necesarias para la producción de piRNAs derivados de virus en células de mosquito y que mutantes en estas vías producen un incremento en la replicación viral (Miesen, Girardi, & van Rij, 2015; Schnettler, Donald, et al., 2013). Sin embargo, restan realizar estudios funcionales *in vivo* y extender este análisis a otras especies para determinar si es un mecanismo generalizado. Curiosamente, en *D. melanogaster* no se han encontrado piRNAs derivados de virus, y la vía de piRNAs no parece ser necesaria para la defensa antiviral en esta especie (Petit et al., 2016).



**Figura 7.** Detalle del ciclo de ping-pong para la biogénesis de piRNAs. RISC incluyendo a Piwi o Aub y cargado con un piRNA, corta transcriptos sentido (sense) derivados de transposones integrados en el genoma dando lugar al extremo 5' del piRNA sense. Este piRNA es procesado en el extremo 3' por proteínas aún no identificadas. Ago3 carga el piRNA sense, guiando el corte 5' de los transcritos antisense, procedentes de los loci que contienen los clusters de piRNAs. Estos piRNAs antisense también se procesan en su extremo 3'. Este ciclo continúa cortando

*transcriptos sense y transposones complementarios, amplificando el silenciamiento. No se conoce cómo comienza el ciclo. Adaptado de (Seila & Sharp, 2008).*

## Mecanismos de traducción no canónica en virus de RNA

La síntesis de proteínas virales es completamente dependiente de la maquinaria de traducción de la célula hospedante. Muchos transcriptos virales poseen diferencias estructurales marcadas con los mRNAs celulares, como la ausencia de *cap* en 5' o la presencia de UTRs altamente estructurados conteniendo señales de replicación y/o empaquetamiento. Además, la extensa mayoría de los mensajeros celulares son monocistrónicos mientras que a menudo los virus de RNA expresan múltiples proteínas desde un mismo mRNA. Estas características han propiciado la evolución de múltiples mecanismos alternativos a los utilizados habitualmente por la célula, que maximizan el poder codificante del genoma viral a la vez que minimizan la competencia con los mRNAs endógenos para su traducción (revisados en Firth and Brierley, 2012). A continuación, se describirá brevemente algunos de estos mecanismos que se ilustran en la Figura 8.

Muchos mensajeros virales contienen sitios internos de entrada al ribosoma o *internal ribosome entry site* (IRES), formados por estructuras secundarias complejas de RNA que son reconocidas por los ribosomas como si se tratara de estructuras de tipo *cap* (Kieft, 2008). De esta forma, los ORFs internos dentro del genoma viral no dependen de su posición respecto al *cap* para ser traducidos.

*Ribosome shunt* es un mecanismo de iniciación de la traducción en el que los ribosomas se unen al mRNA en un modo dependiente del 5'*cap*, saltan la traducción de parte de la región 5' debido a la formación de estructuras secundarias y finalmente alcanzan codones de iniciación internos.

*Leaky scanning* es uno de los mecanismos más ampliamente distribuidos para la traducción de poliproteínas. Debido a que la eficiencia de la traducción desde un codón de iniciación depende de qué tan óptimo sea el contexto genético, cuando el primer AUG es subóptimo una proporción significativa de los ribosomas fallan en iniciar la traducción y continúan el "escaneo" hasta un codón de iniciación alternativo. Este mecanismo puede permitir la expresión de proteínas codificadas por ORFs superpuestos o no.

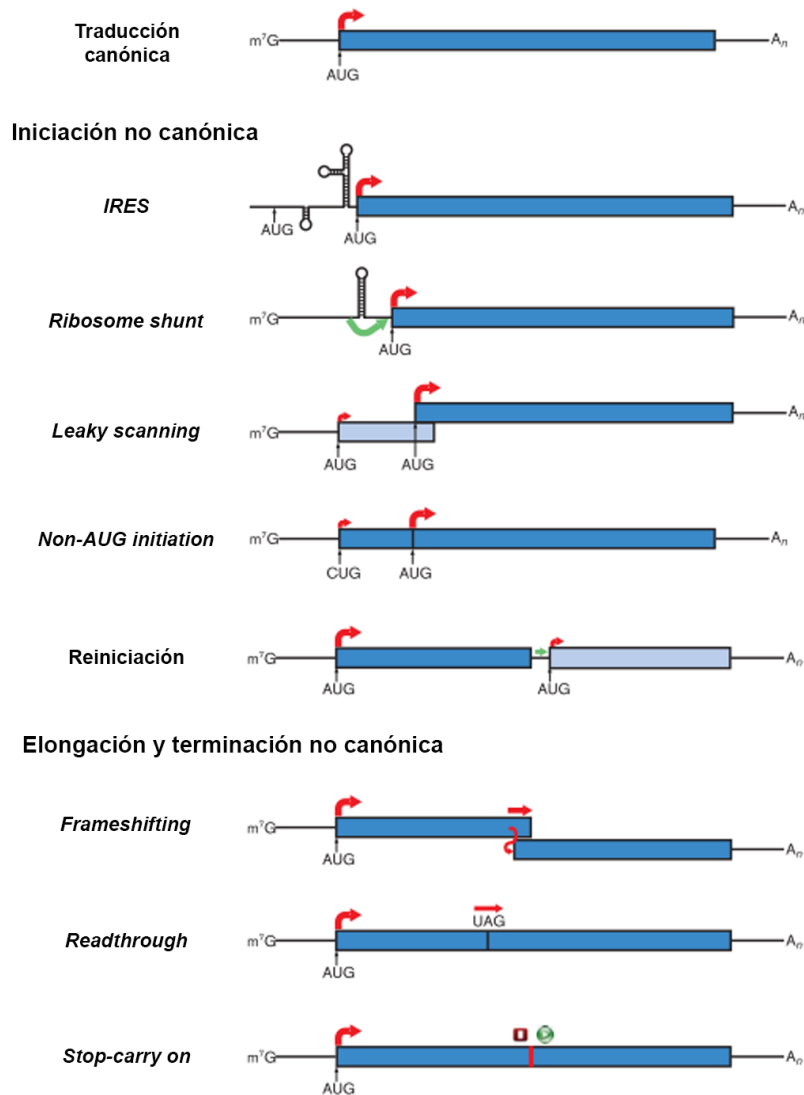
Bajo ciertas circunstancias y dentro de un contexto fuerte, la iniciación de la traducción puede ocurrir en codones distintos de AUG. Sin embargo, una proporción de ribosomas omite este sitio de iniciación infrecuente y prosigue hasta encontrar otro AUG río abajo. Por lo tanto, en estos casos ocurre conjuntamente el mecanismo de *leaky scanning* y *non-AUG initiation*. Otro mecanismo descrito es el de la reiniciación, que ocurre cuando el ribosoma permanece asociado al mRNA luego de traducir un ORF, y reinicia la traducción en un codón AUG río abajo.

Si bien la terminación de la traducción es generalmente un proceso altamente eficiente, también está influenciada por la naturaleza del codón de terminación presente y sus nucleótidos flanqueantes. El *STOP codon readthrough* es un mecanismo que ocurre cuando algunos contextos débiles permiten que el ribosoma en el codón STOP incorpore un aminoácido continuando con la traducción hasta el siguiente codón de terminación.

El curioso mecanismo de *stop-carry on* ocurre al impedirse la formación de un enlace peptídico entre una glicina y una prolina contiguas mientras que la traducción continúa. El resultado es la liberación la proteína naciente, independientemente de la existencia de un codón STOP, y la generación de una nueva proteína conteniendo la prolina como aminoácido N-terminal.

Cuando existen ORFs superpuestos, un mecanismo cada vez más descrito para la traducción del segundo ORF consiste en la existencia de un cambio de marco de lectura o *frameshift*. El *ribosomal frameshift* ocurre cuando el ribosoma se desplaza uno o dos nucleótidos hacia adelante o hacia atrás alterando el marco de lectura original y produciendo una proteína diferente. En los sistemas eucariotas, el *frameshift* mejor caracterizado es el desplazamiento “-1” cuya ocurrencia depende de una secuencia resbaladiza (*slippery site*) consenso “X\_XXY\_YYZ” (donde “XXX” normalmente representa tres nucleótidos idénticos; YYY representa AAA o UUU; Z representa A, C o U) y una estructura estimuladora de RNA río abajo. Por el contrario, los mecanismos implicados en el deslizamiento +1 (o -2) son más variados y con frecuencia poco caracterizados (A. E. Firth & Brierley, 2012).





**Figura 8.** Ejemplos de mecanismos de traducción elongación y terminación no canónicos utilizados por virus de RNA. La traducción del mRNA eucariótico canónico se muestra en el panel superior. Las flechas rojas indican la iniciación de la síntesis de proteínas (al inicio de un ORF) o la continuación de la traducción por ribosomas 80S, con flechas más gruesas indicando el camino predominante (no a escala). Las flechas verdes indican el movimiento probable de las subunidades 40S de una manera no canónica. Cuando se sintetizan dos polipéptidos distintos, los ORF se muestran en diferentes tonos de azul; cuando un evento de recodificación conduce incrementar el tamaño C-terminal de un polipéptido, los dos ORF se muestran del mismo color. En el mecanismo stop-carry on, tanto la terminación como los pasos de iniciación son no canónicos, como se indica por el cuadrado rojo y el círculo verde. Extraído de (A. E. Firth & Brierley, 2012).

En 2012, se identificó un nuevo gen del virus de la influenza A cuya expresión ocurre a través de un *frameshift* +1 en la secuencia “UCC\_UUU\_CGU” ( a E. Firth et al., 2012). Notoriamente, el segmento S5 de los *fijivirus* posee una secuencia conservada similar (“UCU\_UUU\_CG[A/U]”) en la región superpuesta entre dos ORFs, por los que se ha propuesto que este segmento es traducido a través de un *frameshift* +1 (A. E. Firth & Atkins, 2009). Si bien aún no se ha develado el mecanismo preciso por el cual ocurre el deslizamiento de tipo “+1”, se postula que depende tanto de secuencias

estimuladoras río abajo (que generen estructuras secundarias) como de la *slippery sequence* (que puede presentar un codón de baja frecuencia) que provocan que el ribosoma se detenga y produzca el cambio de marco (Koutmou et al., 2015).

Más recientemente se identificaron casos de *frameshifting* donde el cambio en el marco de lectura no ocurre durante la traducción, sino que lo hace durante la transcripción (*transcriptional frameshift*). Este mecanismo ha sido reportado en varios genes bacterianos y en algunos virus de RNA. Durante la transcripción, la polimerasa viral comete errores con una mayor frecuencia en un sitio definido insertando uno o más nucleótidos dentro de la secuencia codificante, y por ende modificando el marco de lectura original. En general, este tipo de “patinajes” durante la transcripción ocurre en secuencias prácticamente homopoliméricas de "A" o "U" y como consecuencia producen un pequeño porcentaje de la población de mRNAs que codifican para la proteína *frameshift* (Olspert, Chung, Atkins, Carr, & Firth, 2015).

# OBJETIVOS

- Comparar las respuestas de las maquinarias del silenciamiento de plantas e insectos ante la infección de MRCV. Para ello se analizaron las poblaciones de sRNAs en ambos hospedantes mediante *small RNAseq* (capítulo 1).
- Determinar el perfil mutacional del virus entre ambos hospedantes de manera comparativa. Para ello se analizó la frecuencia de mutaciones dentro de la población de sRNAs derivados del genoma viral (capítulo 1).
- Determinar la presencia de alteraciones en la abundancia de los transcriptos en plantas de trigo infectadas con MRCV e identificar cuáles de ellas podrían vincularse con la sintomatología. Para ello se secuenciaron los mRNAs de trigo mediante *RNAseq* y se analizaron las categorías funcionales enriquecidas en los genes alterados (capítulo 2).
- Determinar el mecanismo traduccional del segmento S5 del MRCV. Para ello se evaluó la existencia de un *frameshift* traduccional mediante la traducción *in vitro* de construcciones mutantes (capítulo 3).

# MATERIALES Y MÉTODOS

## *Obtención del material biológico*

---

La obtención del material biológico en condiciones controladas se hizo en colaboración con el grupo de la Dra. Graciela Truol (IPAVE, CIAP, INTA) teniendo en cuenta los datos publicados en (Truol et al., 2001). Brevemente, se permitió la reproducción de grupos de machos y hembras de *Delphacodes kusheli* sobre plantas de trigo sanas contenidas en recipientes de plástico. 24h luego de la oviposición, los adultos fueron removidos y las plantas fueron cultivadas en cámaras de cría bajo condiciones controladas de temperatura ( $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), humedad (50%) y fotoperiodo (16 h luz, 8 h oscuridad) para favorecer desarrollo de los huevos. Seis días después de la eclosión se obtuvieron ninfas correspondientes al segundo estadio, que fueron utilizadas para los ensayos de transmisión individual como se esquematiza en la Figura 10. Al menos 500 ninfas fueron depositadas sobre una planta de trigo infectada con MRCV durante 48 h para que adquirieran el virus (período de adquisición, Figura 10 paso 1). En paralelo se hizo lo mismo sobre una planta de trigo no infectada (grupo control). Posteriormente, los insectos fueron trasladados a cámaras que contenían plantas de trigo no infectadas durante 17 días (período de latencia, Figura 10, paso 2). A continuación, se realizaron ensayos de transmisión en una proporción 1:1 transfiriendo individualmente un insecto a una única plántula de trigo no infectada (cultivar susceptible Pro INTA Federal) con una sola hoja expandida (5 días de emergencia aproximadamente) (período de inoculación, Figura 10 paso 3). Después de 24 h, las chicharritas fueron clasificadas según su sexo y colocadas en tubos de 1,5 ml y congeladas en nitrógeno líquido para su conservación posterior en  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 10 paso 4). Finalmente, las plantas se cultivaron en invernadero en condiciones controladas de temperatura y riego. Con el objetivo de minimizar cualquier efecto posicional, las plantas fueron sometidas a rotaciones regulares al azar cambiando su ubicación dentro del invernadero. 12 y 21 días luego del período de inoculación, a la misma hora del día, la primera hoja completamente expandida (la anterior a la hoja bandera) fue recortada y congelada en nitrógeno líquido para su conservación en  $-80^{\circ}\text{C}$  (Figura 10 paso 5). Los síntomas de MRCV aparecieron cerca de 30 días después de del período de inoculación y a 50 dpi la infección por MRCV fue confirmada por DAS-ELISA (Figura 10 paso 6). Los insectos se clasificaron como transmisores o no transmisores, de acuerdo con si fueron capaces de infectar a las plántulas de trigo con MRCV. Se realizaron tres repeticiones biológicas independientes en invernáculos distintos en el mismo período de tiempo, dos de ellas conformadas por 165 transmisiones cada una y una tercera por 84 transmisiones. Adicionalmente en cada repetición se utilizaron 30 chicharritas sanas para picar individualmente plantas de trigo como control.

## *Extracción de RNA*

---

La extracción de RNA total se realizó con el reactivo Trizol (Invitrogen), de acuerdo a las indicaciones del fabricante, utilizando como material de partida 100 mg de tejido molido con N<sub>2</sub>. El RNA purificado fue resuspendido en 50 µl de agua libre de RNAsas y sometido a un paso extra de purificación, mediante precipitación con 150 µl de una solución de cloruro de litio 5M en una proporción 1:3. La concentración y pureza del RNA fue examinada con un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies, Estados Unidos) y su integridad fue controlada por electroforesis en gel de agarosa 1,5%.

Para las muestras que fueron secuenciadas por tecnologías de nueva generación, se extrajo RNA total enriquecido en RNAs pequeños utilizando el kit mirVana (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las condiciones del fabricante. Luego, la integridad fue controlada en primer lugar por electroforesis en gel de agarosa 1,5% y posteriormente por el equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) con el kit AgilentRNA 6000. Este último control es necesario ya que la preparación de librerías aptas para secuenciación requiere como material de partida RNA de muy alta calidad.

## *Síntesis de cDNA para RT-qPCR*

---

Se partió de 1 µg de RNA cuantificado por un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies, Estados Unidos) que fue tratado con DNAsa I para eliminar contaminantes de DNA. La síntesis de cDNA se realizó utilizando *random primers* y la enzima Superscript III de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Invitrogen).

## *Síntesis de librerías y secuenciación de nueva generación*

---

Tanto la síntesis de librerías como la secuenciación de sRNAs de plantas fue realizada por el servicio de secuenciación del INDEAR (Rosario, Argentina). Las librerías se realizaron utilizando el kit TruSeq *Small RNA Library Prep* (Illumina) y la secuenciación se llevó a cabo en un equipo HiSeq 1500 (Illumina).

La síntesis de librerías y secuenciación de sRNAs de *D. kuscheli* fue realizada por el grupo de la Dra. Carla Saleh (Institut Pasteur, Francia). Las librerías fueron realizadas utilizando el kit *NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep for Illumina* (New England Biolabs) y secuenciadas en un equipo NextSeq 500 (Illumina).

La síntesis de librerías para RNAseq de trigo fue realizada utilizando el mismo RNA que para las librerías de sRNAs mediante el kit *IlluminaTruSeq RNA sample prep* (Illumina), que purifica mRNAs

por unión a poliT. A continuación, se verificó la calidad y el tamaño promedio de los insertos mediante un equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), utilizando el kit *High Sensitivity DNA assay*. Finalmente, se realizó la secuenciación en dos *lanes* en corridas independientes en un equipo HiSeq3000 (Illumina) con lecturas de tipo *single end* de 50 pares de bases.

### *PCR cuantitativa en tiempo real*

---

Las reacciones de RT-qPCR para la cuantificación de la carga viral y la validación del RNAseq fueron realizadas utilizando una mix casera a base de SYBR Green (para 1 mL 2x mix: 805µL de ddH<sub>2</sub>O, 100µL de Buffer 10X, de 25µL dNTP mix (10mM c/u), 40µL ROX dye (25µM), 10µL de Taq Platinum Polymerase (Invitrogen, ~15 unidades), 5µL de cada *primer* (100µM), 10µL de SYBR Green II (100x)). Las reacciones se llevaron a cabo utilizando 10 µL de cDNA (0,1-2ng/µL) al menos por duplicado técnico y triplicado biológico (se indica el número exacto en cada experimento). Se utilizó un equipo StepOneReal Time PCR System (Applied Biosystems, Estados Unidos) con un programa de temperaturas estándar (30'' *annealing* 60 °C, 30'' elongación a 72 °C por 40 ciclos). Las reacciones de RT-qPCR para la cuantificación de los segmentos genómicos virales se llevaron a cabo utilizando el kit comercial *FastStart Universal SYBR Green Master* (Roche), siguiendo las indicaciones del fabricante en un equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Estados Unidos). En todos los casos se realizaron reacciones sin DNA como control negativo y se analizó la curva de disociación de los productos para comprobar que los *primers* amplificaran específicamente y que no hubiera contaminaciones.

Para el análisis, los resultados de cada corrida fueron exportados como datos crudos e introducidos en el software LinReg (Ruijter et al., 2009) para la determinación de la línea de base, el cálculo de la eficiencia de amplificación de cada par de *primers* y la determinación de los Cts. En el caso de análisis de expresión relativa, se utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Pfaffl, 2002) implementado por el programa FgStatistics (Di Rienzo, 2009) utilizando el gen *housekeeping* especificado en cada caso. Para la cuantificación absoluta de los segmentos virales, se utilizaron diferentes plásmidos que contienen secuencias completas o parciales de segmentos del MRCV (Ana J Distéfano, 2004; G. A. Maroniche, 2011; V. C. Mongelli, 2010) para la construcción de curvas estándar como se describió anteriormente (Argüello et al., 2013). Brevemente, se utilizaron diluciones seriadas al décimo conteniendo entre  $10^{-3}$  y  $10^{-6}$  ng de plásmido purificado como templado para las reacciones. Se llevaron a cabo las reacciones tal como fue descrito y se generó una curva estándar graficando el valor de Ct vs el logaritmo del número de copias inicial de cada dilución. Se realizó la regresión lineal verificando que el coeficiente de correlación lineal ( $R^2$ ) fuera muy cercano a 1 y se interpolaron los valores utilizando la ecuación de ajuste. Finalmente, los datos fueron expresados como número de copias por µg de RNA utilizado para el cDNA.

El diseño de *primers* en todos los casos se realizó utilizando el software Primer3 (Untergasser et al., 2012), maximizando las características deseables para qPCR según las reglas MIQE (Bustin et al., 2009). La lista de los oligonucleótidos utilizados para la cuantificación absoluta de los segmentos virales se describe en la Tabla 4, mientras que los utilizados para la cuantificación relativa de genes de trigo se encuentra en la Tabla 5.

Nombre del primer	Secuencia (5' -> 3')
qMRCV-S1_F	TCGTCGTGCGAGAGTAATTG
qMRCV-S1_R	AGGATACATCTCCGGTCGTG
qMRCV-S2_F	CTGGATTCCCCTCATTTCAA
qMRCV-S2_R	ATGTTGTCAGGTGTGCCAAA
qMRCV-S3_F	AGGCCACCTCAAACAATCAG
qMRCV-S3_R	ATTGTTGGGCACTGTCATCA
qMRCV-S4_F	GAGAAAATTCCAACCGACGA
qMRCV-S4_R	ACACTGGGGAATTCAACTGC
qMRCV-S5_F	CACGAAGGTTTCATCCCTGTT
qMRCV-S5_R	TGCAAGTCAGCGATTTGAAC
qMRCV-S6_F	AAACTAAGCGCCAAGAGCAA
qMRCV-S6_R	CGCTGTTCTCTCAACCATGA
qMRCV-S7_F	GTTTGGCAACTCCTCAGCTC
qMRCV-S7_R	ATAAAAGCGTCACCCATTGC
qMRCV-S8_F	GCAGACAAGCATGAGATGGA
qMRCV-S8_R	GTGATGTGTTCCGGTGCAATC
qMRCV-S9_F	GACGGCATTTCCTGACCTGAT
qMRCV-S9_R	TCACGCTCAAGTGTGGAAG
qMRCV-S10_F	AACGGAACAAGTCGAAATGG
qMRCV-S10_R	AGTACGTCGCCGATTTTACG

**Tabla 4.** Lista de oligonucleótidos utilizados para la cuantificación absoluta de los segmentos genómicos del MRCV.

Nombre del primer	Secuencia (5' -> 3')
qTraes_2DL_9A5C1871B.1_fw	AGGCTTTTGTGCGAGTTGAT
qTraes_2DL_9A5C1871B.1_rv	GGATGGATGGAAAGCAAAGA
qTraes_7DS_B46EB1CDE.1_fw	GGAAGAAGGTGCTGAACGAC
qTraes_7DS_B46EB1CDE.1_rv	AGGTGACGAGGACGTAGTGG
qTraes_7BL_95CF78A1C.2_fw	TATGATGCCAACGGAAACAA
qTraes_7BL_95CF78A1C.2_rv	AGGCAGCTTGTTCAATTGCT
qTraes_4AL_C9F401064.1_fw	TGGCTTCCTTTTCTCTTGGA
qTraes_4AL_C9F401064.1_rv	TAGCCCTGTCATCAACACCA
qTraes_7AS_4DEF89578.1_fw	GAAGACAAGAGGGCCATCAC
qTraes_7AS_4DEF89578.1_rv	CTGGGCGGACTTGTAGGATA
qTraes_4DL_B3E978E9F.1_fw	TGGTCCAACGGAAGAGAGAC
qTraes_4DL_B3E978E9F.1_rv	TACCGGAGGAACATCTCGAC
qTraes_4BL_C01E043B6.1_fw	GCCCTAACTGTGCAAAAAGC
qTraes_4BL_C01E043B6.1_rv	GTGGCCAAGCCACAAGTATT

qTraes_4BL_0726DD6EC.1_fw	AGCGTACGTGTTTCGTCACTG
qTraes_4BL_0726DD6EC.1_rv	CACTGCACATGCAACACATC
qTraes_6BL_FE7A0A2BD.2_fw	GCTGAAGATGTTCGATGAGCA
qTraes_6BL_FE7A0A2BD.2_rv	CTGTATGCAGGCAGTGGAGA
qTraes_5DS_E8892706A.1_fw	CTTTCCTTTGCCAGAGTTGC
qTraes_5DS_E8892706A.1_rv	CGCCTACCAGAGACTTCGTC
qTraes_5DS_A281EFAB4.1_fw	TACATGGGCACGTACCAAGA
qTraes_5DS_A281EFAB4.1_rv	GTGCCGCGATATCTACCATT
qTraes_2BL_740D59BE4.1_fw	CCTTGGGGTTGGGAGTATTT
qTraes_2BL_740D59BE4.1_rv	TCTGTTTTGGAGCGTACGTG
qTraes_2BL_F22336B90.2_fw	CGTGTACTGGAGCTGGAACA
qTraes_2BL_F22336B90.2_rv	GAGATGGGTGGGAGATCAGA
qTraes_5AL_8D5A83BF8.1_fw	CCCATACCAGTGCACCTTCT
qTraes_5AL_8D5A83BF8.1_rv	CCAGGCATCATGTTTCATCTG
qTraes_6DL_BAD5B9DD2.1_fw	TCGGATGAGACGACTGTCTG
qTraes_6DL_BAD5B9DD2.1_rv	ACAGCCTACAAGCCATCCAC
qTraes_7AS_BD45B6DF6.1_fw	CCAAGGAAGGCCAAGACATA
qTraes_7AS_BD45B6DF6.1_rv	GCAGAACATGACCCAAGGAT
qTraes_5BS_DF2486215.1_fw	CAAGGTCATGTCCCTTCACC
qTraes_5BS_DF2486215.1_rv	TCTACAAAACCCCTCCCATGC
qTraes_5BL_C452655D8.1_fw	CCCAACTTATGCCAGCATTT
qTraes_5BL_C452655D8.1_rv	TTGTAGCAGAAGTGGCGATG
qTraes_7BS_FE8BE43F9.1_fw	TCATCGCTGCTGTTATCTGG
qTraes_7BS_FE8BE43F9.1_rv	ATACCAGCCCAGTGGACAAG

Tabla 5. Lista de oligonucleótidos utilizados para la cuantificación relativa de los genes de trigo posiblemente alterados ante la infección con MRCV.

## Técnicas clásicas de biología molecular

Las técnicas de extracción de DNA plasmídico, digestión con enzimas de restricción, ligación de DNA, obtención de células *Escherichia coli* o *Agrobacterium tumefaciens* químicamente competentes o electrocompetentes y su transformación, electroforesis de DNA en geles de agarosa y de PCR se realizaron según protocolos clásicos (Sambrook & Russell, 2001). Todas las enzimas de restricción y modificantes fueron obtenidas de New England Biolabs (Estados Unidos) a menos que se indique lo contrario, y se utilizaron según las especificaciones del fabricante. Los reactivos y enzimas para PCR fueron obtenidos en Invitrogen (Estados Unidos). La purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa se realizó con el kit QIAEX II Gel Extraction (Qiagen, Alemania) y las purificaciones de DNA plasmídico de alta calidad para secuenciación, transcripción *in vitro* o realización de curvas estándar para qPCR se realizaron con columnas del kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Alemania).

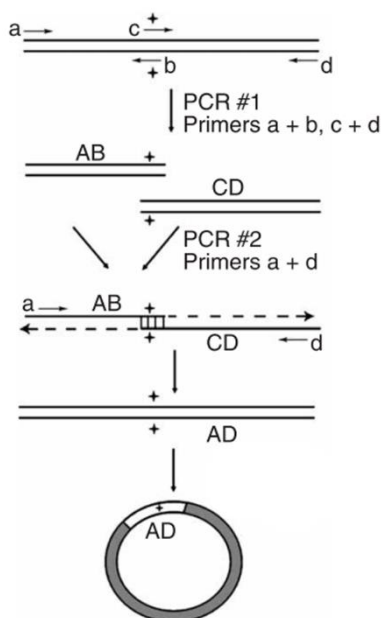


Para los clonados moleculares se emplearon las cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  químicamente competentes o XLI blue electrocompetentes, según el caso. Todos los cultivos bacterianos fueron realizados en medio "lysogeny broth" (LB) líquido adicionado con el antibiótico de selección adecuado (ampicilina 100 mg/lit, kanamicina 50 mg/lit ó espectinomicina 100 mg/lit). El medio LB sólido se preparó agregando agar (1,5 g/100 ml).

Previo a la obtención de cada una las construcciones utilizadas en esta Tesis, los mismos fueron estudiados *in silico* con el software Vector NTI 11 Advance (Invitrogen) para comprobar que los productos a obtener y sus marcos de lectura resultantes fueran los deseados. Todas las construcciones fueron secuenciadas previamente a su utilización.

### *Obtención de mutantes del segmento S5*

Para la obtención de las mutantes del segmento S5 se utilizó la técnica de *overlapped PCR* como fuera descrito en (Heckman & Pease, 2007) y esquematizado en la Figura 9. Brevemente, se realizan 2 PCRs parcialmente solapadas utilizando *primers* con la mutación deseada, cuyos productos son purificados en gel de agarosa y mezclados para servir de nuevo templado en una nueva reacción de PCR utilizando el par de *primers* de los extremos del amplicón. El resultado final es la unión de los dos productos parciales con la mutación deseada. La lista de oligonucleótidos utilizada se detalla en la tabla



**Figura 9. Mutagénesis por overlapped PCR. Se utilizan primers con la mutación deseada (b y c) y primers flanqueantes (a y d) para generar productos de PCR intermedios AB y CD que se solapan para formar el producto**

*completo AD. Los productos AB y CD se desnaturalizan cuando se usan como molde para la segunda PCR; Las cadenas de cada producto hibridan en sus regiones complementarias superpuestas conteniendo la mutación deseada (indicada por la cruz). La amplificación del producto AD en la PCR #2 es utiliza los primers a y d. El producto final AD es clonado en un vector para su secuenciación. Adaptado de (Heckman & Pease, 2007).*

Nombre del primer	Secuencia (5' -> 3')
deltaN XhoI fw	CCGGCTCGAGAATGGAAGGTATAATTTGCGC
ORF5-2 PTC fw	GACGTGCAAGACCTGATCTCAAACAAA
ORF5-2 PTC rv	TTTGTGTTGAGATCAGGTCTTGCACGTC
S5 SS fw	AAACATAAATCTTTCAGAAGCTTCCTA
S5 SS rv	TAGGAAGCTTCTGAAAGATTTATGTTT
S5 IFC fw	TAAACATAAATCTTTCGAAGCTTCCTACGA
S5 IFC rv	TCGTAGGAAGCTTCGAAAGATTTATGTTTA
S5 BamHI rv	CGGGATCCAGGAACGCGCGCCCCGCGGC

*Tabla 6. Lista de oligonucleótidos utilizados para la realización de las construcciones mutantes del segmento S5.*

### Extracción de proteínas de plantas, SDS-PAGE y detección por Western blot

La extracción de proteínas se realizó en base al protocolo de (Isogai et al., 1998). Para ello, se molieron 100 mg de plantas de maíz con N<sub>2</sub> en mortero, hasta obtener un polvo fino, y se los incubó en 200 µl de buffer de extracción (KCl 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM; sacarosa 400 mM; Tris-HCl 100 mM pH 8; glicerol 10%; β-mercaptoetanol 10 mM; fluoruro de fenilmetilsulfonilo o PMSF 2 mM). La mezcla se incubó en hielo durante 10 a 30 minutos y se centrifugó 12000 r.p.m. durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo limpio y se conservó a -80 °C hasta su utilización. Las muestras se sembraron en geles desnaturalizantes de poli(acrilamida 10%) y separaron por electroforesis. Luego fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa Hybond N (Ge Healthcare, Reino Unido) para su detección por "Western blot". La transferencia correcta de las proteínas fue corroborada mediante tinción con rojo Ponceau (Rojo Ponceau 650 mM, ácido acético 1%). Las membranas fueron incubadas con solución de bloqueo TBS-leche (Tris 25 mM, NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,5, leche descremada 5%) por 1 hora a temperatura ambiente, y luego incubadas por 16-20 hs con el anticuerpo primario diluido en TBS-leche, luego de tres lavados de 10 min con TBS-Tween20 0,05% (TBST) se incubaron por 2 hs a temperatura ambiente con una dilución en TBS-leche del anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina. Luego de 3 lavados de 10 min con TBS se equilibró la membrana en buffer fosfatasa (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM) y para el revelado se incubó con los sustratos BCIP y NBT (Promega, Estados Unidos) en buffer fosfatasa a una concentración final de 0,56 mM y 0,45 mM, respectivamente.

El antisuero primario anti-P5-2 fue desarrollado en conejos por (G. A. Maroniche, 2011), y se utilizó en una dilución 1/15000. El Anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (AP) (Sigma) se utilizó en una dilución de 1/5000.

### Northern blot *de mensajeros virales para la detección de mensajeros subgenómicos*

---

Los RNAs de plantas de maíz infectadas fueron extraídos con Trizol como fuera descrito anteriormente. Igual cantidad de RNA (10 µg) se utilizó para las hibridaciones con las sondas de ambos extremos. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa 1,5% con MOPs 1X como buffer de corrida. Se preparó el RNA utilizando un buffer de siembra preparado con formamida deionizada (60%), formaldehído (8,5%) y azul de bromofenol (0,01%), y se incubaron las muestras a 65°C 10' previo a la siembra para asegurar la ruptura de posibles estructuras secundarias. Las sondas radiactivas se prepararon usando productos purificados de PCR (ver detalle de los *primers* utilizados en la Tabla 7). Se marcaron radiactivamente con  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP haciendo uso del kit *Prime-a-Gene Labeling System*, según las especificaciones del fabricante (Promega). La transferencia e hibridación se realizaron siguiendo las técnicas ya descritas por (Sambrook & Russell, 2001). Se utilizaron membranas *Hybond N+* (Amersham). Para la prehibridación e hibridación se empleó la solución *ULTRAhyb* (Ambion). Se prehibridó durante 2 horas a 42°C y se hibridó durante toda la noche a la misma temperatura. Luego de descartada la sonda se realizaron dos lavados sucesivos a temperatura ambiente durante 15 minutos con SSC (2X), SDS (0,1%) y otro de 15 minutos con SSC (1X), SDS (0,1%) a 42°C. Se realizaron exposiciones durante períodos variables y luego se escanearon las imágenes mediante un Typhoon 9400 (GeHealthcare).

Nombre del primer	Secuencia (5' -> 3')
<b>S5 200nt iniciales fw</b>	AAGTTTTTTTCACTCATGAC
<b>S5 200nt iniciales rv</b>	TGGGGGGTCATTGCGGAACG
<b>S5 200nt finales fw</b>	AATGTATCTATCAGTCCATC
<b>S5 200nt finales rv</b>	GACAATAGCTGTTTCACTCC
<b>S7 200nt iniciales fw</b>	AAGTTTTTTTTCGACCTGTCT
<b>S7 200nt iniciales rv</b>	CTGAAAGTGCCATTCTGGGT
<b>S7 200nt finales fw</b>	CAGGTATTCTTATAGCTCAT
<b>S7 200nt finales rv</b>	GACATCAGCTGCTTCCGACC
<b>S8 200nt iniciales fw</b>	AAGTTTTTTTTCGACTGTCTG
<b>S8 200nt iniciales rv</b>	TCGTATTCAATTAATGGTCTGG
<b>S8 200nt finales fw</b>	TTATTTAAGTATCATTTTGGG
<b>S8 200nt finales rv</b>	GACATTAGCTGATTTTGGCA

<b>S9 200nt iniciales fw</b>	AAGTTTTTAAGCCTGGAAC
<b>S9 200nt iniciales rv</b>	TCGTCCAAAATTGGTATCTT
<b>S9 200nt finales fw</b>	GCGTAGTAGATAAAGATACAGG
<b>S9 200nt finales rv</b>	GACATCAGCTGTAAGCCCGC

*Tabla 7. Lista de oligonucleótidos utilizados para la obtención de sondas que hibriden contra los 200 nt iniciales o finales de los segmentos bicistónicos S5, S7 y S9 del MRCV*

### Transcripción y traducción in vitro de las construcciones mutantes del S5

Cada plásmido a ser transcrito se preparó a una concentración de 250 ng/μL y se linealizó con la enzima de corte único *NarI* ON (42,5μL de DNA con 2,5μL de *NarI*, vf= 50μL). Se purificaron los productos digeridos con columna y se chequeó integridad de DNA por electroforesis en geles de agarosa. Se realizó la transcripción *in vitro* utilizando el kit *mMESSAGE mMACHINE* (Thermo Fisher Scientific) con el siguiente protocolo: 12μL DNA (2μg aprox), 20μL 2x dNTPs 10mM c/u + CAP mix, 4μL 10x reaction buffer, 4μL enzima, 40 μL vf. Se incubó la reacción 1h 30' a 37 °C. Transcurrido ese tiempo se agregó 3,5 μL de GTP 10mM y se lo incubó 30' más. Luego se agregó 2,5uL de *TurboDNase* (Thermo Fisher Scientific) y se incubó 25' a 37 °C. Los RNAs se purificaron utilizando una columna *NucAway Spin Columns* (Thermo Fisher Scientific) y el eluido se precipitó 20' a -20°C con acetato de amonio 5M (1/10 el volumen) y el mismo volumen de isopropanol. Se centrifugó a máxima velocidad a 4 °C durante 20 minutos, y se lavó el pellet con EtOH 80%. Se centrifugó nuevamente, se descartó el etanol y se dejó secar el pellet al aire previo a su resuspensión en 10μL. Se cuantificaron los RNAs con *Nanodrop* y se chequeó que la banda fuera única y tuviera el tamaño esperado por electroforesis en geles de agarosa.

Para la traducción *in vitro* se diluyó el RNA hasta una concentración de 400 ng/μL y se utilizó extracto de germen de trigo (*wheat germ extract*, WGE, Promega) en las siguientes condiciones: 5 μL WGE, 1 μL mix de aminoácidos Met-, 1 μL RNA a traducir 400 ng/μL, 0,72 μL 1M KAc, 0,25 μL RNase OUT, 1,53 μL H<sub>2</sub>O, 0,5 μL [<sup>35</sup>S] Methionine, 10 μL vf. Se incubó la reacción 1h 30' a 25 °C. Se trató 1μL de cada muestra con RNaseA (100ug/mL) durante 15' a 15 °C. Luego se agregó dos volúmenes de cracking buffer, se hirvieron a 99°C 10' y se sembraron en geles de poliacrilamida 10%. Como marcador de peso molecular se utilizó [*Methyl-<sup>14</sup>C*] *MethylatedProtein Molecular Weight Marker* (Parkin Elmer). Una vez corrido el gel, se fijaron las proteínas con buffer 10% acético y 50% metanol durante 20 minutos, se colocó el gel entre hojas Whatman y se lo expuso a un film ON. Luego, las autorradiografías fueron escaneadas con un equipo Typhoon y se cuantificó su intensidad con el software *ImageJ*. La eficiencia del *frameshift* se determinó mediante el cociente entre la intensidad de la banda producto del *frameshift* menos la intensidad observada en el control negativo y la intensidad observada para el producto canónico.

## Procesamiento y análisis bioinformático

---

El procesamiento de los datos se llevó a cabo mayormente en un clúster denominado FARM (<https://wiki.cse.ucdavis.edu/support/systems/farm>) perteneciente al *College of Agricultural and Environmental Sciences* de la Universidad de California, Davis, que corre bajo un sistema operativo Ubuntu versión 14.04. Los scripts de R fueron ejecutados en el entorno RStudio versión 0.99.902, utilizando R versión 3.3.1. Los scripts de Python fueron escritos en la versión Python 2.7.6. En todos los casos, pueden solicitarse al autor de esta Tesis al correo [luidelharo@gmail.com](mailto:luidelharo@gmail.com).

Los parámetros de cada programa son los utilizados por defecto, salvo cuando se detalle lo contrario en cada Capítulo en la sección resultados. Las versiones de cada uno de los módulos utilizados que corren sobre Linux se detallan a continuación (programa/versión):

bcftools/1.2; bedtools/2.25; blast/2.2.29; bwa/0.7.9a ; cutadapt/1.8.3; fastqc/0.11.5; gmap/2015-06-23; HTSeq/0.5.4p5; picardtools/2.7.1; pysam/0.9.0; samtools/1.2; scythe/0.991; sickle/1.33; sratoolkit/2.3.2-4; ViennaRNA/2.1.8; vcftools/0.1.13

En cuanto a los paquetes de R utilizados, se adjunta la siguiente lista:

Package	Versión	Package	Versión
AnnotationDbi	1.34.4	KEGGREST	1.12.2
Biobase	2.32.0	latticeExtra	0.6-28
BiocGenerics	0.18.0	limma	3.28.21
BiocInstaller	1.22.3	pathview	1.12.0
BiocParallel	1.6.6	plyr	1.8.4
biomaRt	2.28.0	png	0.1-7
Biostrings	2.40.2	R6	2.1.3
curl	2.1	RColorBrewer	1.1-2
DESeq2	1.12.4	Rcpp	0.12.7
edgeR	3.14.0	RcppArmadillo	0.7.400.2.0
gage	2.22.0	RCurl	1.95-4.8
gageData	2.10.0	reshape	0.8.5
gdata	2.17.0	reshape2	1.4.1
genefilter	1.54.2	Rgraphviz	2.16.0
genefilter	1.50.0	Rsamtools	1.24.0
GenomeInfoDb	1.8.7	seqinr	3.3-3
GenomicAlignments	1.8.4	seqLogo	1.38.0
GenomicRanges	1.24.3	stringi	1.1.1
ggplot2	2.1.0	stringr	1.1.0
GO.db	3.3.0	SummarizedExperiment	1.2.3
gplots	3.0.1	topGO	2.24.0
graph	1.50.0	XML	3.98-1.4
gridExtra	2.2.1	XVector	0.12.1
IRanges	2.6.1	translations	3.3.1
KEGGgraph	1.30.0		

# CAPÍTULO 1

Caracterización del perfil de los RNAs  
pequeños (sRNAs) en plantas e insectos  
infectados con MRCV

## Introducción

---

En los organismos eucariotas, el silenciamiento mediado por RNA es un mecanismo de regulación que controla la expresión génica y la estabilidad genómica a través de la síntesis de sRNAs a partir de dsRNA desencadenan el proceso. Estos sRNAs, de 20-25nt, se unen a complejos multienzimáticos que poseen la facultad de reconocer y silenciar transcripcional o post-transcripcionalmente secuencias de DNA o RNA altamente complementarias. En tejidos infectados con virus, este proceso se activa a partir del reconocimiento de dsRNAs de origen viral. Como resultado, la infección provoca la síntesis de vsiRNAs capaces de modular la interacción virus-hospedante, limitando la infección en las células infectadas y participando en el proceso que determina la desaparición total (interacción incompatible) o parcial del virus (interacción compatible).

En plantas, se ha demostrado que la respuesta antiviral requiere de un proceso de amplificación que se caracteriza por la producción de sRNAs derivados del genoma viral (vsiRNAs) secundarios procedentes de dsRNAs cuya síntesis es dependiente de la acción de proteínas RNA polimerasas dependientes de RNA (RDRs) del hospedador (Voinnet, 2008). Estos vsiRNAs secundarios participan en la dispersión sistémica del silenciamiento a través del transporte de la señal de silenciamiento célula a célula y hacia el floema, activando el sistema de inmunidad innata en tejidos distantes de la planta.

En insectos, hasta ahora no se han encontrado RDRs, por lo que se presume que no existe amplificación de la respuesta antiviral por parte del hospedante. En cambio, recientemente se ha vinculado la vía de los PIWI-interacting (pi)RNAs en el silenciamiento antiviral en mosquitos (Miesen, Joosten, & Rij, 2016). La función canónica los piRNAs es la protección de la integridad del genoma en células germinales a través del silenciamiento de elementos transponibles. Dado que la biogénesis de los piRNAs ocurre independientemente de la producción de siRNA, la existencia de piRNAs virales podría constituir una línea adicional de defensa contra virus en insectos que puede ser amplificada.

El **objetivo general** de este capítulo es comparar las poblaciones de sRNAs en plantas e insectos infectados con MRCV. Para ello, en una primera instancia, se obtuvo el material biológico necesario. Luego, se extrajo el RNA y se secuenciaron los sRNAs en servicios de secuenciación de alto rendimiento que utilizan la tecnología Illumina. Se analizó la composición de los sRNAs en ambos hospedantes, y en particular se focalizó el análisis en los vsiRNAs. Se compararon los perfiles de acumulación de manera semicuantitativa, se estableció si la vía de los piRNAs estaba presente

en *D. kuscheli* y si la misma participaba en el silenciamiento contra MRCV. Luego, se evaluó si las diferencias en los patrones de densidad de vsRNAs observados en los distintos segmentos se debían a diferencias en la acumulación de RNAs virales por PCR en tiempo real. Finalmente, se realizó un análisis comparativo del perfil mutacional del virus entre ambos hospedantes.

Las interacciones MRCV-insecto y MRCV-planta fueron moldeadas por tiempos evolutivos distintos, siendo la última más reciente. A su vez, el virus alterna frecuentemente de hospedante por lo que en su ciclo enfrenta mecanismos antivirales con características particulares, sometiéndolo a entornos selectivos distintos. La **hipótesis de trabajo** es que la acumulación diferencial de vsRNAs derivados de los segmentos del MRCV en plantas e insectos permitirá evidenciar diferencias y similitudes en la acción de las maquinarias de silenciamiento entre ambos hospedantes. De manera indirecta, permitirá inferir características del ciclo replicativo y regiones genómicas sujetas a presión selectiva diferencial.

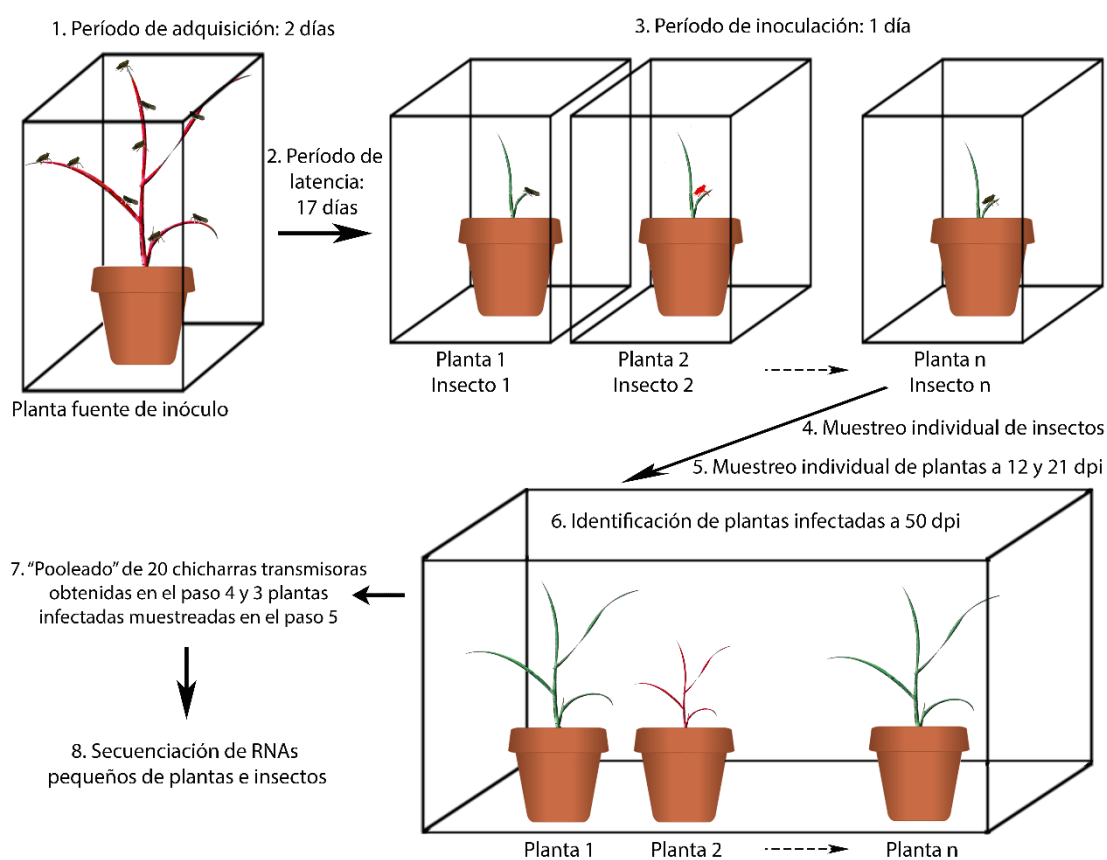
Cabe destacar que el MRCV, como todos los reovirus, posee un genoma de RNA doble cadena segmentado que dificulta la construcción de un clon infectivo que permita infectar células u organismos obviando la necesidad de insectos vectores. Si bien en los últimos años se han desarrollado estrategias para la infección de células animales con rotavirus y orbivirus (Trask, Boehme, Dermody, & Patton, 2013), las mismas requieren de la transfección simultánea de múltiples plásmidos recombinantes o de RNAs transcritos *in vitro*, y aún no se han desarrollado sistemas equivalentes para células vegetales. En consecuencia, la obtención de material infectado con MRCV en condiciones de laboratorio requiere la cría del insecto vector. El grupo de insectos vectores que dirige la Dra. Graciela Truol (IPAVE, CIAP, INTA-Córdoba) cría de rutina al delfácido transmisor *D. kuscheli* y tiene amplia experiencia en ensayos de transmisión viral. El material biológico utilizado en este capítulo y en el capítulo 2 fue obtenido en colaboración con su grupo.



## Resultados

### Obtención de plantas de trigo y delfácidos infectados con MRCV

Se realizó un experimento de infección en condiciones controladas en el cual se utilizaron plántulas de trigo recién emergidas (*Triticum aestivum* cv. ProINTA Federal) y delfácidos en una proporción de infección uno a uno (Figura 10). Se realizaron tres repeticiones en invernáculos distintos durante el mismo período de tiempo. Se controló de manera visual la aparición de síntomas, y a los 50 días post infección (dpi) se realizó un control serológico de infección (ELISA).



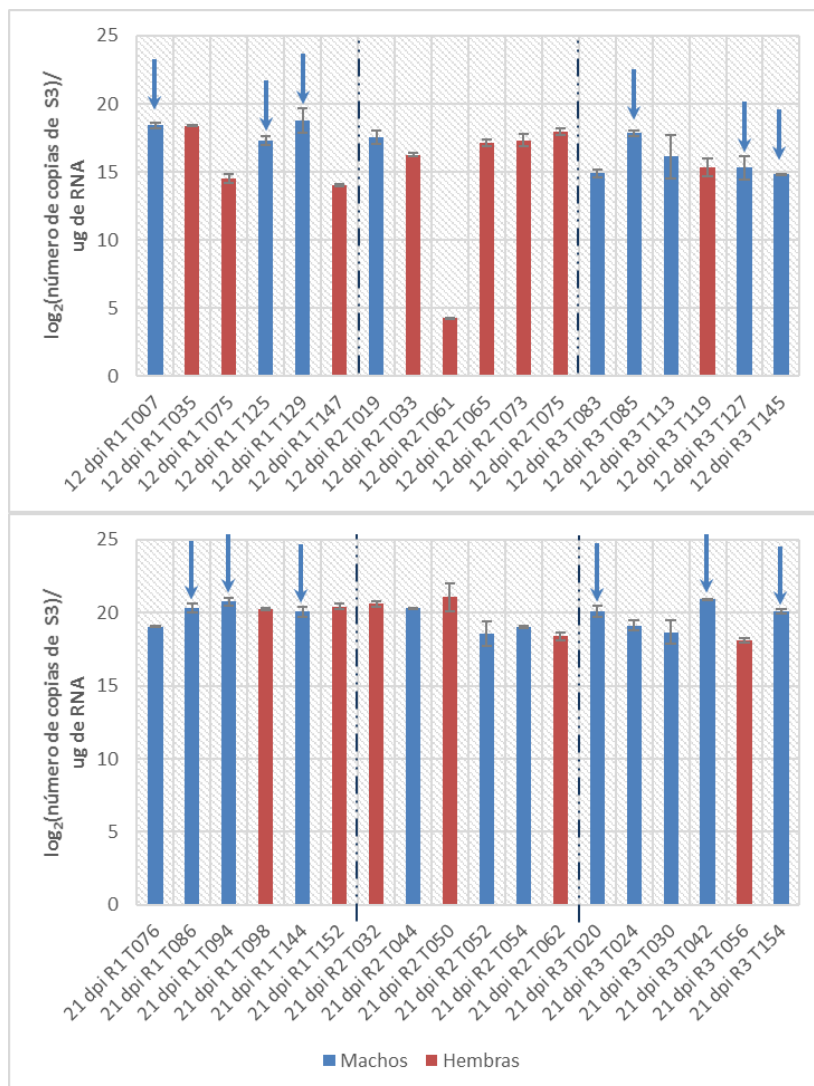
**Figura 10. Esquema del diseño experimental utilizado en para la obtención del material biológico. Las plantas y los insectos infectados se colorearon en rojo.**

Los resultados del ensayo de transmisión se detallan en la Tabla 8. Como control se utilizaron plantas que fueron picadas por insectos alimentados en plantas sin infectar.

		<b>Total plantas</b>	<b>Con síntomas</b>	<b>Con ELISA (+)</b>	<b>% Infección</b>
<b>Repetición 1</b>	12 dpi	82	11	10	<b>12%</b>
	21 dpi	82	12	11	<b>13%</b>
<b>Repetición 2</b>	12 dpi	32	8	6	<b>19%</b>
	21 dpi	32	8	7	<b>22%</b>
<b>Repetición 3</b>	12 dpi	82	16	14	<b>17%</b>
	21 dpi	82	18	8	<b>10%</b>

*Tabla 8. Resultados del experimento de transmisión de plántulas de trigo con MRCV.*

Con el objetivo de seleccionar individuos con carga viral similar, se seleccionaron 6 plantas positivas por ELISA de cada repetición y se cuantificó la carga viral absoluta por qPCR tal como fue descrito en (Argüello et al., 2013). Dado que insectos hembra suelen realizar oviposiciones que provocan estrés oxidativo en la planta, se tuvo en cuenta la información sobre el sexo del insecto y la detección visual de oviposiciones en las plantas para la elección de los individuos que serían utilizados para las secuenciaciones posteriores. Los resultados de la cuantificación de carga viral se detallan en la Figura 11.



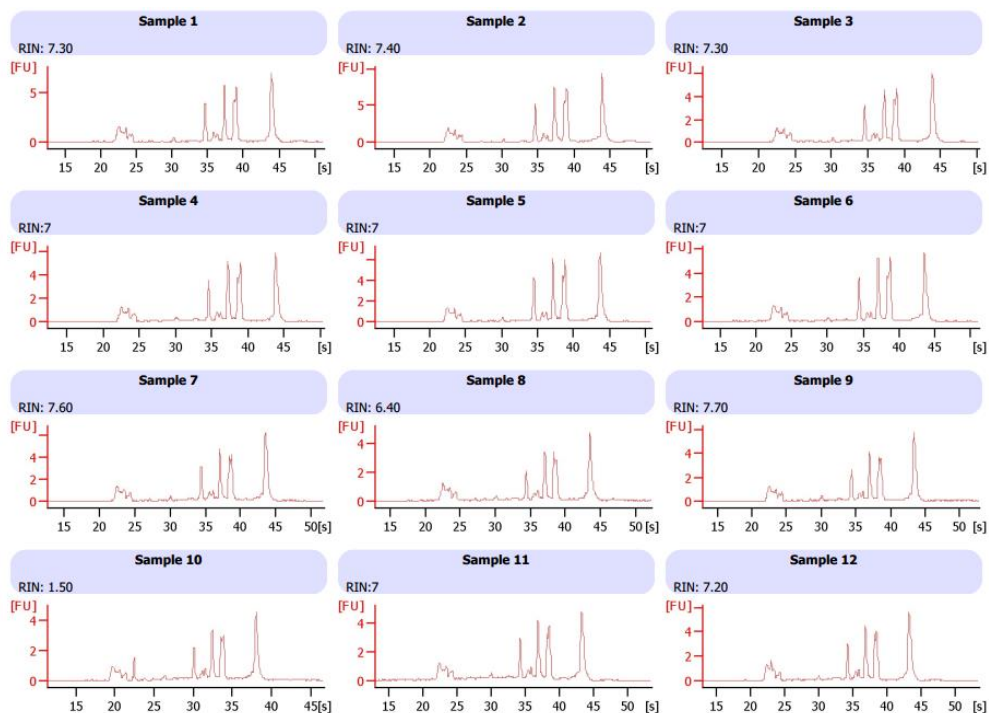
**Figura 11. Cuantificación absoluta de carga viral de MRCV en base a qPCR del segmento S3. Se indican el sexo del insecto utilizado. Se indica con una flecha los individuos seleccionados para el armado de los pools para las secuenciaciones.**

Se observa que a 12 dpi la carga viral es menor que a 21 dpi, evidenciando que en los tiempos evaluados el virus se encuentra en replicación activa. Para evitar la posible presencia de oviposturas, se eligieron 3 plantas de cada repetición y tratamiento que hubieran sido picadas por individuos machos y que tuvieran carga viral similar (indicadas con flechas en la Figura 11). Dado que no se consiguió el número de machos necesario a 12 dpi, la repetición 2 fue descartada del experimento.

#### *Extracción de ARN enriquecido en ARNs pequeños de plantas e insectos*

Se realizó la molienda del material vegetal en nitrógeno líquido y se utilizó el kit mirVana para la extracción de RNA. Este kit brinda una tasa de recuperación de RNAs pequeños mayor que la que suele obtenerse en protocolos de extracción de RNA convencionales. Dado que un paso clave en los experimentos de RNAseq es partir de RNA de buena calidad e integridad, se utilizó un equipo

Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) con el kit AgilentRNA 6000 Nano para obtener sus perfiles electroforéticos de alta resolución (ejemplos de los perfiles en la Figura 12).



**Figura 12.** Salida del Bioanalyzer indicando integridad de los RNAs extraídos de plantas con mirVana. **Sample 1-12:** 21dpiR1T086, 21dpR1T094, 21dpiR1T144, 21dpiR3T020, 21dpiR3T042, 21dpiR3T154, 12dpiR1T007, 12dpiR1T125, 12dpiR1T129, 12dpiR3T85 12dpiR3T127 12dpiR3T145 respectivamente.

Se observa que cada perfil posee asociado un valor de RIN (*RNA Integrity Number*), que cuantifica en forma numérica la integridad del perfil de RNA obtenido. Si bien habitualmente se utiliza un valor RIN mayor o igual a 8 para considerar que el RNA se encuentra en buenas condiciones de integridad (Schroeder et al., 2006), existen reportes demostrando que, especialmente en el caso de plantas, diferentes especies dan patrones electroforéticos distintos asociados a variabilidad en los RNAs ribosomales citoplasmáticos, de cloroplastos y de mitocondrias. Dado que el equipo tiene una configuración estática para plantas, algunas especies no son correctamente evaluadas numéricamente (Kim & Haj-Ahmad, n.d.). Por ello, el indicador de calidad utilizado fue la observación manual de los perfiles en busca de picos definidos y sin evidencia de degradación. En todos los casos, los perfiles fueron enviados a los servicios de secuenciación correspondientes para obtener el visto bueno de los expertos.

En paralelo, se seleccionaron 20 chicharras transmisoras de cada repetición (que picaron plantas que resultaron ELISA positivas) y se les realizó el mismo procedimiento de extracción de RNA y chequeo de calidad descrito anteriormente. Cabe señalar que la decisión de utilizar *pools* de 20

insectos es debido a que, dado su reducido tamaño, la extracción individual hubiera dificultado y encarecido significativamente el experimento.

### Secuenciación de los RNAs pequeños de plantas e insectos.

Los RNAs de plantas de cada uno de los 3 individuos de cada réplica fueron cuantificados utilizando el equipo NanoDrop ND-1000 (NanoDropTechnologies), y mezclados en partes iguales hasta una concentración final de 500ng/μL. Luego, fueron enviados al servicio de secuenciación del INDEAR (Rosario, Santa Fe, Argentina) para la secuenciación de RNAs pequeños que se hizo mediante la síntesis de las librerías utilizando el kit TruSeq Small RNA Library Prep (Illumina) y un equipo HiSeq 1500 (Illumina).

Los RNAs extraídos de los *pooles* de insectos virulíferos transmisores y no infectados fueron enviados al grupo de la Dra. Carla Saleh, del Institut Pasteur, París, Francia donde se realizó la síntesis de librerías de cDNA para su secuenciación en un equipo Genome Analyzer Iix.

La Figura 13 resume a modo de esquema todas las librerías que fueron secuenciadas.

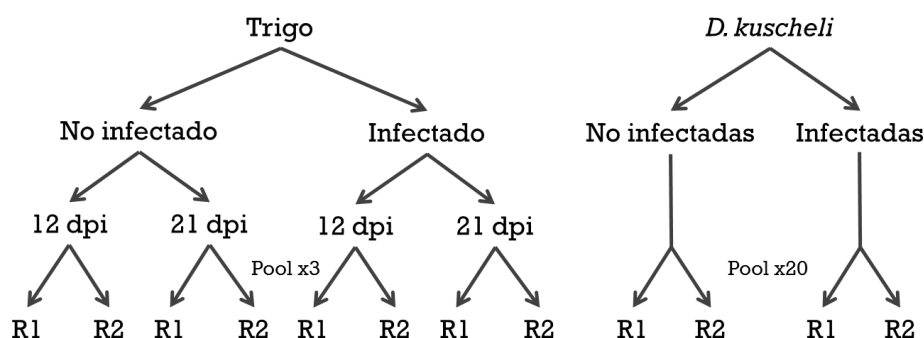


Figura 13. Esquema del diseño experimental utilizado para la secuenciación de RNAs pequeños. De aquí en adelante, por cuestiones de practicidad, la R3 del ensayo biológico pasa a llamarse R2.

### Lecturas obtenidas por librería y procesamiento por calidad

Se procesaron los archivos de tipo fastq obtenidos utilizando los programas Cutadapt, Sickle y Scythe (Buffalo, 2014; Joshi & Fass, 2011; Martin, 2011) para la remoción de adaptadores y corte y filtrado por calidad (QC > 30) y tamaño (18-35nt). Los resultados obtenidos para cada librería y el número de lecturas limpias se resumen en la Tabla 9.

Organismo	Tiempo muestreo	Repetición	Tratamiento	Lecturas totales	Lecturas limpias	% Recuperadas
Trigo	12 dpi	R1	Control	17037949	13821710	81.12%
			Infectado	15003126	12940427	86.25%
		R2	Control	17658938	14231901	80.59%
			Infectado	20673392	17925337	86.71%

21 dpi	R1	Control	29225009	27788087	95.08%
		Infectado	43934581	41453229	94.35%
	R2	Control	28159910	26669088	94.71%
		Infectado	33218051	31505250	94.84%
<b><i>D. kuscheli</i></b>	R1	Control	32720096	26542680	81.12%
		Infectada	34276011	29541521	86.19%
	R2	Control	34569307	29022443	83.95%
		Infectada	35952047	17052129	47.43%

*Tabla 9. Número de lecturas de sRNAs obtenidas por librería antes y luego del filtrado por calidad. R1 y R2: repetición 1 y 2 respectivamente.*

A continuación, se contabilizaron las lecturas de sRNAs de cada tamaño y se normalizaron según el tamaño de la librería (lecturas por millón), y se realizaron los histogramas correspondientes al promedio de cada tratamiento (Figura 14).

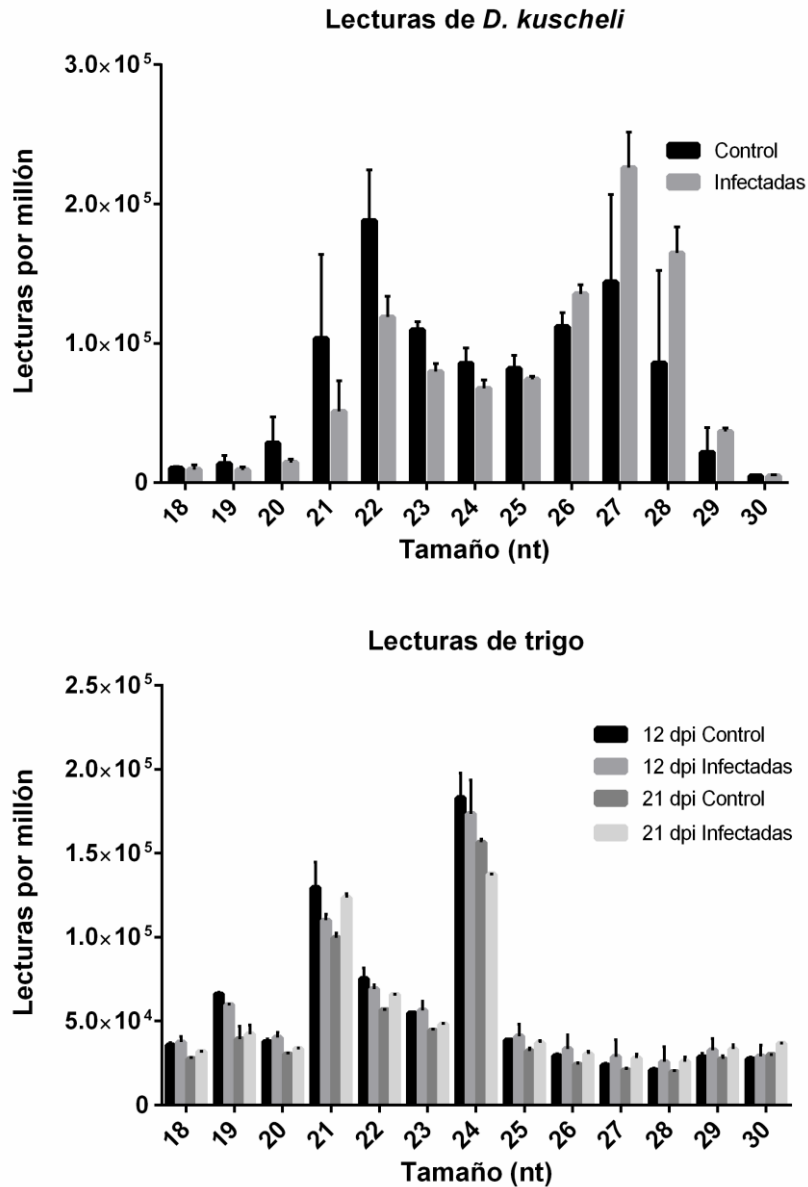


Figura 14. Distribución de tamaños de las lecturas totales de sRNAs normalizadas por millón de cuentas totales para trigo y *D. kuscheli*. Barras de error: desvío estándar.

En insectos se observan dos picos de 21-22 y de 26-28nt. Los primeros corresponden a miRNAs y RNAs derivados de la acción de las Dicers, mientras que los segundos son poseen un tamaño compatible con el esperado para piRNAs. Se observa que la proporción de sRNAs de 21 y 22 nt disminuye en insectos infectados, mientras que los de 26-28 se incrementan ante la infección.

En trigo se observan dos picos a 21 y 24 nt. Los primeros corresponden a sRNAs (tanto endógenos como virales en el caso de las muestras infectadas) y a miRNAs, mientras que los segundos corresponden a sRNAs endógenos asociados al silenciamiento transcripcional a través de AGO4. Se observa que esta especie disminuye su proporción en las muestras infectadas.

### *Mapeo de las lecturas al genoma del MRCV y reconstrucción del genoma de referencia*

Se realizó el mapeo de todas lecturas de cada librería al genoma del MRCV mediante el programa BWA (H. Li & Durbin, 2009). Dado que el genoma de referencia utilizado corresponde a un aislamiento de hace aproximadamente 17 años, se evaluaron los polimorfismos existentes entre las secuencias virales depositadas y la secuencia del aislamiento utilizado en el ensayo. En base a los alineamientos obtenidos, se obtuvo una secuencia consenso utilizando el programa *bcftools*.

Con el genoma actualizado se evaluaron distintos niveles de astringencia de mapeo, permitiendo 0, 1 o 2 *missmatch* por lectura (Tabla 10).

Organismo	Tiempo muestreo	Rep	0 <i>missmatch</i>		1 <i>missmatch</i>		2 <i>missmatch</i>	
			Control	Infectado	Control	Infectado	Control	Infectado
Trigo	12 dpi	R1	0,00%	2,04%	0,01%	2,29%	0,31%	2,62%
		R2	0,00%	0,77%	0,01%	0,87%	0,26%	1,11%
	21 dpi	R1	0,00%	4,63%	0,01%	5,26%	0,14%	5,66%
		R2	0,00%	3,96%	0,00%	4,53%	0,15%	4,92%
<i>D. kuscheli</i>	21 dpi	R1	0,00%	5,52%	0,01%	8,52%	0,01%	9,14%
		R2	0,00%	8,84%	0,01%	11,87%	0,01%	12,43%

**Tabla 10.** Porcentaje de las lecturas de sRNAs mapeadas al genoma curado del MRCV (vsiRNAs) sobre el total de lecturas para distintos niveles de astringencia.

Se observa que a medida que se disminuye la astringencia permitiendo más *missmatches*, el porcentaje de lecturas que alinean con el genoma viral es mayor. Esto se puede deber a dos factores. Primero, las lecturas que pasaron el control de calidad (QC > 30) poseen errores de secuenciación en el orden del 0,1%, por lo que 1 de cada 1000 bases secuenciadas será un error. Por otro lado, existe una gran variabilidad genética en los virus a RNA dada la elevada tasa de mutación de la RdRP, que carece de actividad *proofreading*. Con el objetivo de conservar parte de la variabilidad intrahospedante y a la vez mantener un grado de astringencia que minimice los alineamientos espurios (evidenciados por el porcentaje de mapeo en los controles), para los análisis posteriores se utilizaron los alineamientos generados con 1 *missmatch*. La Figura 15 muestra la distribución de tamaños de las lecturas mapeadas al genoma viral en ambos hospedantes.



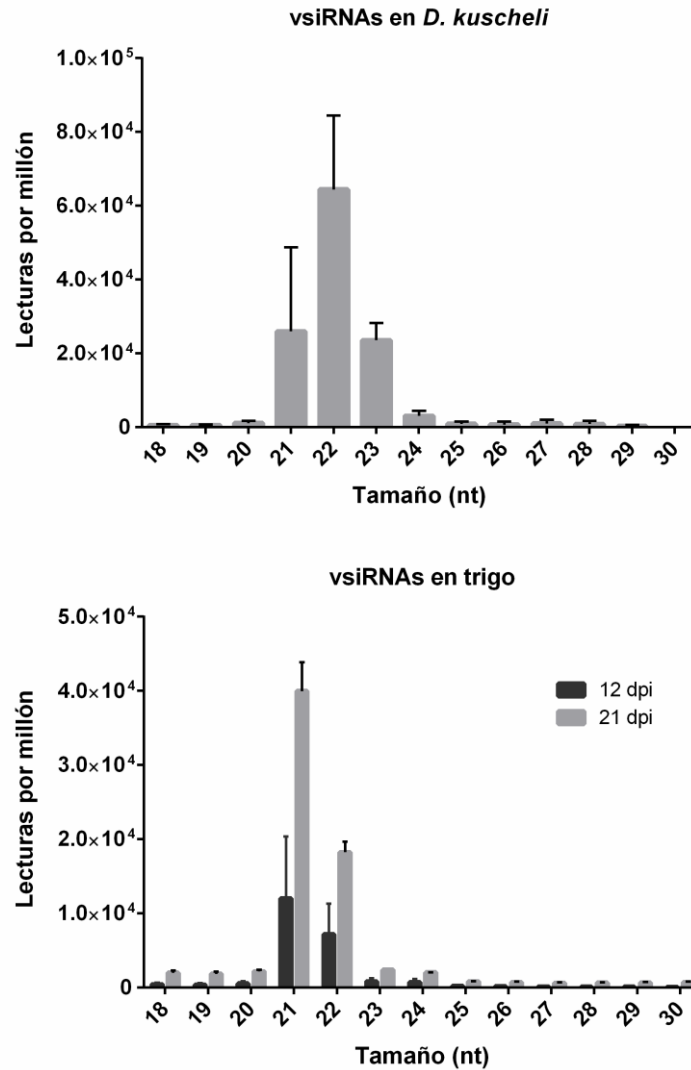


Figura 15. Distribución de tamaños de los vsiRNAs normalizados por millón de lecturas totales en trigo y *D. kuscheli*.

Se observa que para el caso de *D. kuscheli*, el pico de vsiRNAs está formado por sRNAs de 22 nt, seguido de las especies de 21 y 23 nt respectivamente, mientras que en plantas mayoritariamente se generan vsiRNAs de 21 y 22 nt. En ambos casos, aproximadamente el 95% de todas las lecturas virales tuvieron entre 18 y 25nt (Figura 15). En el caso del trigo, se observa un incremento notable en la cantidad de lecturas que mapean a 21 dpi respecto a 12 dpi, evidenciando una mayor respuesta antiviral muy posiblemente debida a un incremento en la carga viral.

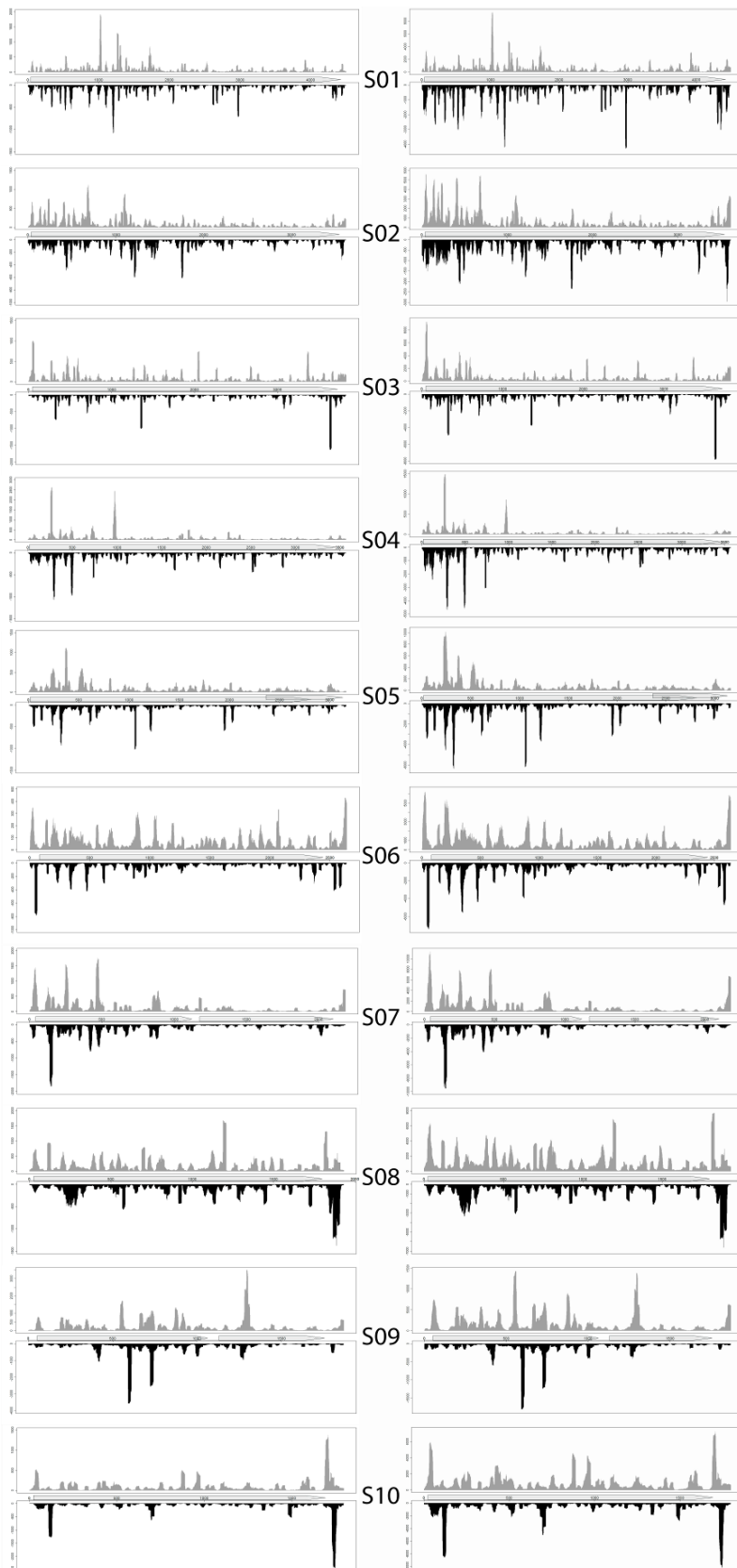
#### Análisis comparativo de los vsiRNAs de trigo y *D. kuscheli*

Con el objetivo de determinar si existen zonas del genoma viral que den lugar a una acumulación significativamente mayor (*hot spots*) o menor (*cold spots*) de vsiRNAs respecto a la media del segmento genómico en estudio, se obtuvieron los perfiles de mapeo de vsiRNAs para todos los

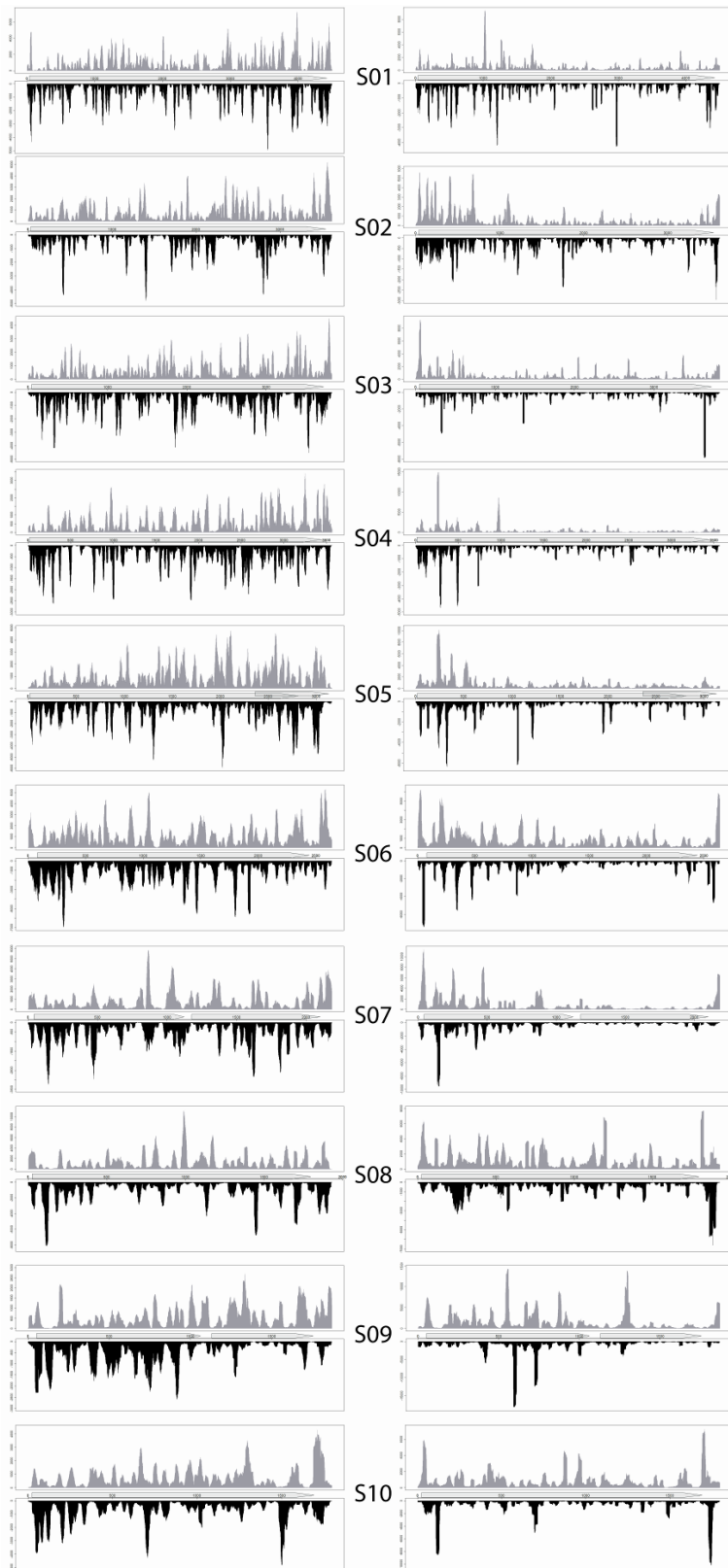
segmentos del MRCV con resolución de una base. Todas las réplicas presentaron perfiles muy consistentes entre sí, evidenciando una alta reproducibilidad biológica. En el caso del trigo, tanto a 12 como a 21 dpi los perfiles fueron notoriamente similares, generando *hot spots* y *cold spots* en las mismas regiones genómicas y variando principalmente en el número relativo de lecturas que componen el perfil y los picos (Figura 16, panel izquierdo 12 dpi, derecho 21 dpi).

Por otro lado, los perfiles de mapeo de *D. kuscheli* mostraron claras diferencias respecto a los de trigo. Mientras estos últimos se caracterizaron por la presencia de *hot spots* muy marcados particularmente hacia las puntas de los segmentos, en insectos la distribución fue mucho más homogénea, con picos de acumulación de intensidad equivalentes distribuidos a lo largo de todos los segmentos (Figura 17, panel izquierdo). En plantas, los *hot spots* mostraron una especie de simetría especular desfasada, con algunos de ellos derivados de la cadena positiva presentando otros de forma y tamaño equivalente en la cadena negativa, pero no exactamente en la misma posición. Para estudiar si los picos observados se podían explicar por plegamientos de RNA que desencadenan una mayor respuesta, se compararon los picos de acumulación con la probabilidad de formar estructuras secundarias utilizando el programa RNA fold (Gruber, Lorenz, Bernhart, Neubock, & Hofacker, 2008), pero este análisis no arrojó resultados concluyentes (no se muestran los datos).

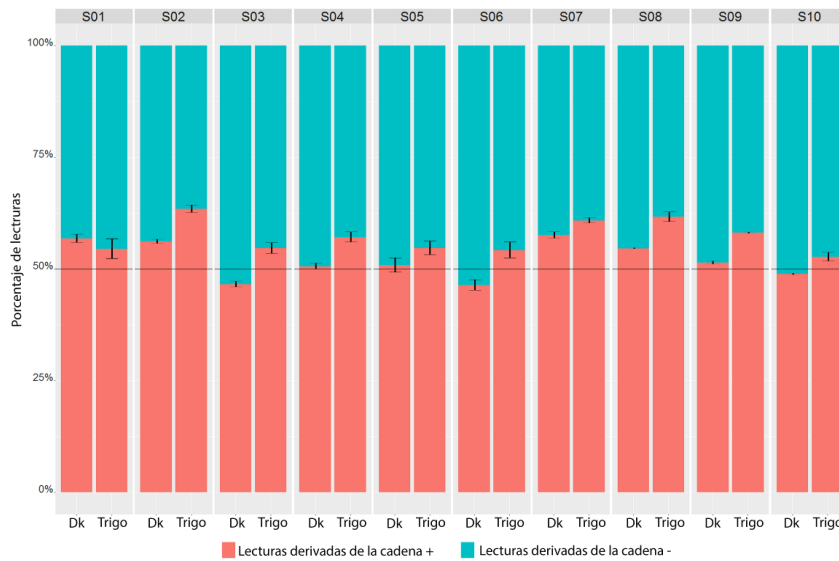
En ambos hospedantes se secuenció prácticamente la misma cantidad de vsRNAs derivados de la cadena positiva que de la negativa (Figura 18). Este resultado es llamativo dado que se postula que los Reovirus realizan tanto la transcripción como la síntesis de la segunda cadena de RNA cuando las partículas virales se encuentran preformadas (Gridley & Patton, 2014) en el viroplasma, y por lo tanto se encuentran protegidas de la maquinaria de silenciamiento. Esto implicaría que la respuesta de silenciamiento estaría primordialmente dirigida contra mRNAs virales derivados de la cadena positiva, que son expulsados de las partículas virales a través de los vértices específicos (Periz et al., 2013). Si bien en trigo las RdRPs podría explicar la igual presencia de vsRNAs derivados de la cadena negativa por medio del proceso de amplificación, en insectos aún no se han aislado enzimas que presenten esta actividad ni detectado posibles genes que las codifiquen. Este tema se ampliará en la discusión.



**Figura 16.** Perfil de mapeo de los vsiRNAs en los distintos segmentos genómicos del MRCV en trigo a 12 dpi (izquierda) y 21 dpi (derecha) para las cadenas positiva (arriba, perfil gris) y negativa (abajo, perfil negro).



*Figura 17. Perfil de mapeo de los vsRNAs en los distintos segmentos genómicos del MRCV en D. kuscheli (izquierda) y trigo (derecha) a los 21 dpi para las cadenas positiva (arriba, perfil gris) y negativa (abajo, perfil negro)*



**Figura 18. Proporción de los vsiRNAs derivados de la cadena positiva (rojo) y negativa (celeste) de cada uno de los segmentos del MRCV en ambos hospedantes, *Delphacodes kuscheli* (DK) y trigo a 21 dpi.**

Como ya fue mencionado, los perfiles de los vsiRNAs de cada hospedante presentaron una distribución distintiva de *hotspots* que se caracterizó principalmente por ser más heterogénea para el caso del trigo (Figura 17). Para cuantificar esta distribución, se determinó la densidad de vsiRNAs dividiendo cada segmento en 10 partes iguales y estudiando la proporción que mapea a cada una de ellas (Figura 19). De esta manera, se puede observar de manera más clara que los insectos presentan pequeñas variaciones que no se repiten entre segmentos, mientras que en las plantas el primer tercio de gran parte de los segmentos acumula la mayor proporción de vsiRNAs. Esto implica que, por alguna razón, la maquinaria de silenciamiento preferentemente desencadena la producción vsiRNAs contra el tercio 5' de los segmentos. Adicionalmente, algunos de ellos presentan un enriquecimiento de vsiRNAs en el extremo 3'. En ambos casos, una posible explicación parcial es la presencia de estructuras secundarias de tipo mango de sartén (*panhandle*) que son complementarias entre segmentos y desempeñan un rol crucial en el empaquetamiento y la transcripción (Boyce, McCrae, Boyce, & Kim, 2016; McDonald et al., 2016).

El segmento 9 representa una clara excepción, exhibiendo un pico de acumulación en la región central que coincide con dos de los picos simétricos espejados de gran intensidad observados en la Figura 17.

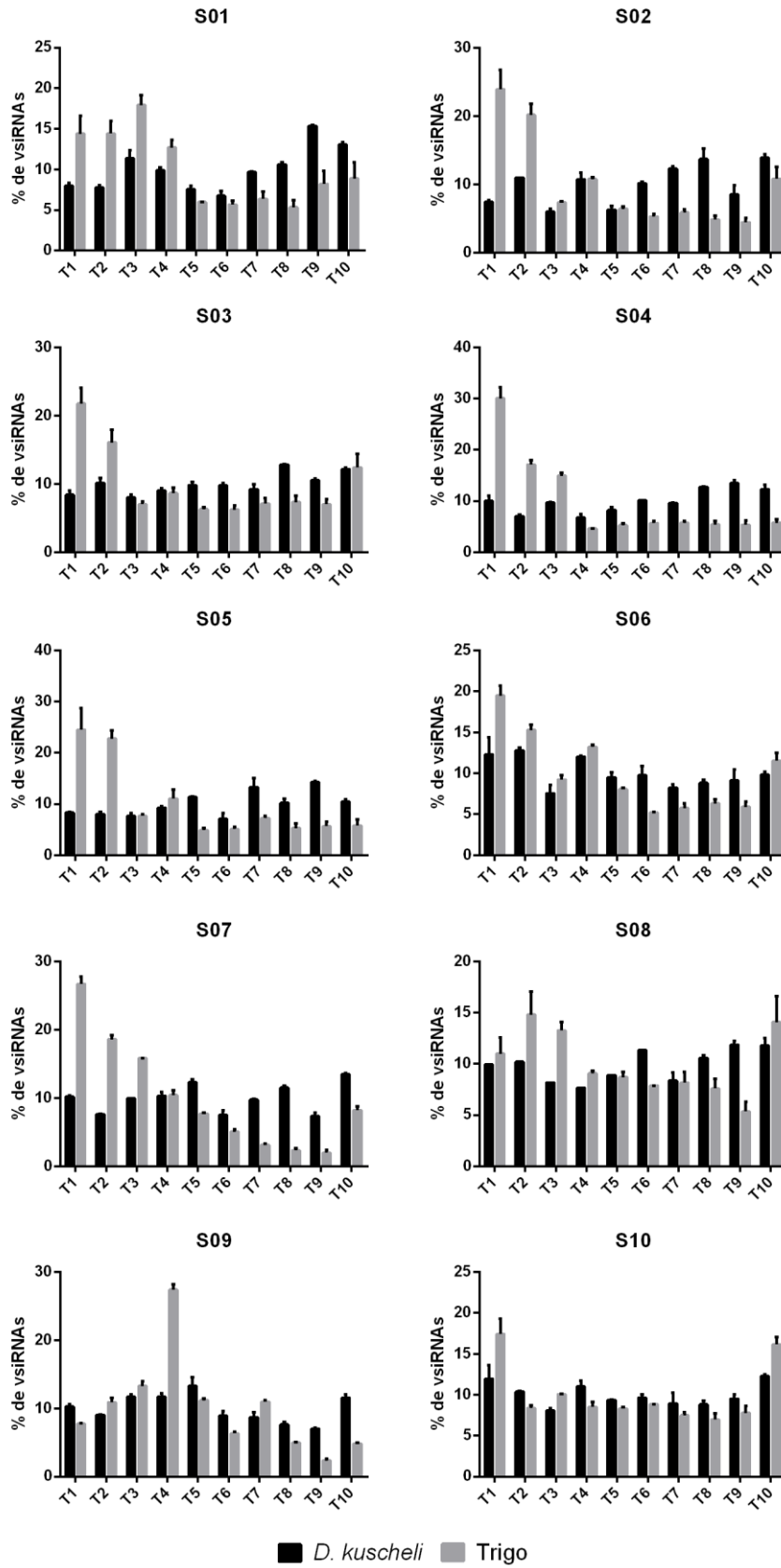


Figura 19. Proporción de los vsRNAs que mapean a cada una de las décimas partes de cada uno de los segmentos del MRCV en ambos hospedantes, *Delphacodes kuscheli* en negro y trigo en gris a los 21 dpi.

### *Estudio comparativo de la acumulación de vsiRNAs y RNA viral en ambos hospedantes*

Como ya fue mencionado, en el caso de los virus con genoma de RNA doble cadena, los vsiRNAs son el resultado de la respuesta antiviral a los segmentos en estadio doble cadena y/o a estructuras secundarias de mRNAs virales que podrían estar expuestos a la maquinaria de silenciamiento (Szitty et al., 2010). Con el objetivo de evaluar si alguno de ellos presentaba una acumulación distintiva, se cuantificó la acumulación de vsiRNAs en cada segmento. Para ello, se aplicó otra capa de normalización considerando el largo variable de cada segmento (lecturas por kilobase por millón de lecturas mapeadas, o *reads per kilobase per million mapped reads*, RPKM, Figura 20 paneles A y B). Se realizó un ANOVA de una vía para determinar grupos con diferencias significativas. En insectos, los segmentos S8, S6 y S5 fueron los que presentaron una mayor densidad de acumulación de vsiRNAs, mientras que en trigo el S9 presentó la mayor densidad de acumulación. De manera interesante, pareciera existir una correlación inversa entre el tamaño del segmento y la densidad de lecturas mapeadas, con la notable excepción del segmento 10. Este resultado podría estar vinculado también con el modelo actual de empaquetamiento propuesto para Reovirus, en el que en primer lugar se recluta el segmento 10 a las subpartículas, y luego los demás en orden creciente de tamaño.

Para establecer si las diferencias en la densidad de vsiRNAs por segmento se debían a diferentes niveles de acumulación de RNAs virales, se cuantificó cada uno de los segmentos por RT-qPCR. Dado que el experimento requería de la comparación de diferentes amplicones en diferentes hospedantes, se realizaron cuantificaciones absolutas realizando las curvas estándar correspondientes. En general, las diferencias relativas en densidad de vsiRNAs no pudieron ser explicadas por diferencias relativas en la acumulación de RNA medida por qPCR. Por ejemplo, el RNA de S1 resultó altamente expresado en plantas, pero posee baja densidad de vsiRNAs. El RNA de S6 presentó bajos niveles de acumulación en insectos a la vez que presentó alta densidad de vsiRNAs. Solo el segmento S8 en insectos muestra un pico de acumulación de vsiRNAs que se corresponde con el máximo de acumulación de RNA. Estos resultados indican que en el caso de MRCV, la acumulación de vsiRNAs no está directamente relacionada con la acumulación de RNA viral y sino a diferentes grados de accesibilidad a los segmentos.

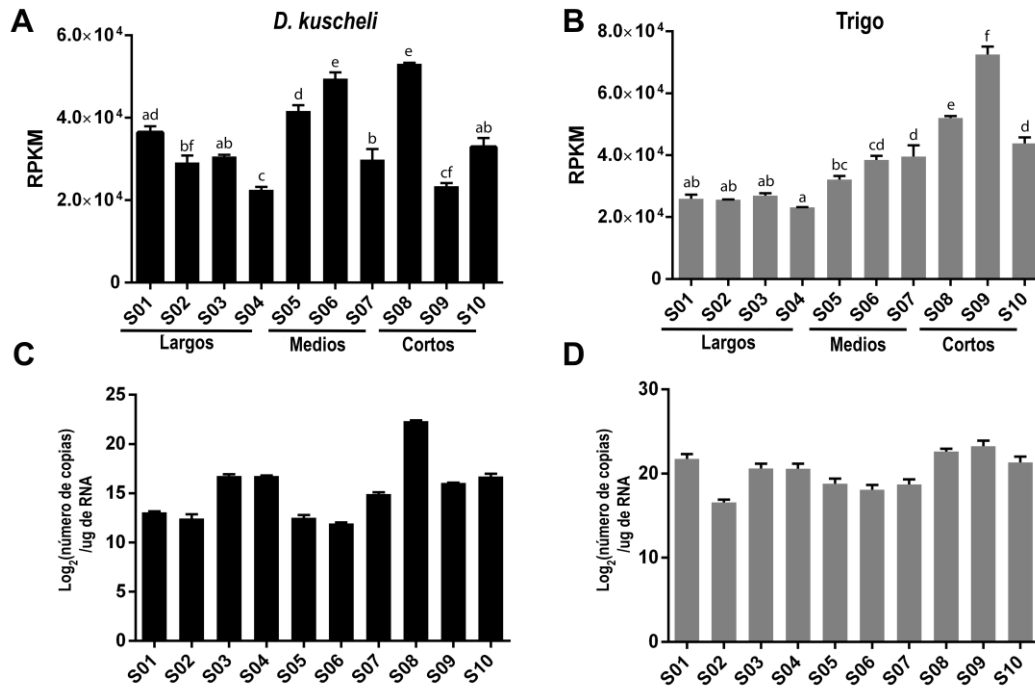


Figura 20. Comparación entre la densidad de mapeo de vsiRNAs a los distintos segmentos genómicos y la acumulación de RNA medida por qPCR de los distintos segmentos genómicos. Paneles A y B: lecturas por kilobase por millón de lecturas mapeadas (RPKM) para los 10 segmentos del MRCV en insectos (A) y plantas (B). Se indican sobre las barras los grupos definidos por ANOVA de una vía. Se indican debajo la clasificación de los segmentos según el tamaño. Paneles C y D: acumulación de RNA viral de cada segmento medida por qPCR absoluta en muestras de insectos (C) y plantas (D).

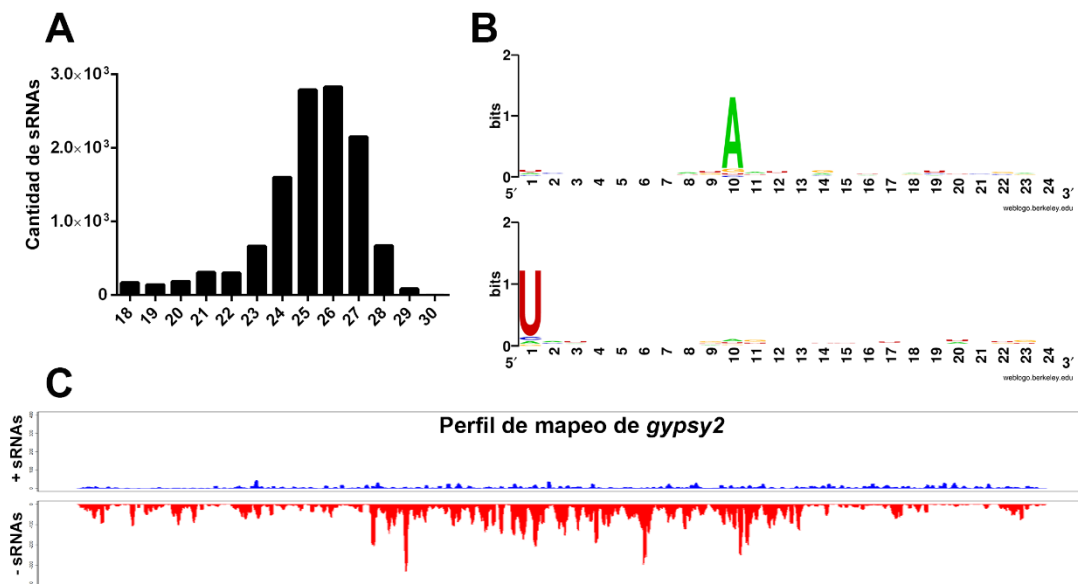
### Análisis de la participación de piRNAs en el silenciamiento antiviral

La vía de los piRNAs ha sido recientemente implicada en la defensa antiviral en insectos (Miesen et al., 2016; Morazzani et al., 2012). Sin embargo, no pareciera ser el caso para delfácidos ya que no se identificaron vsiRNAs de 26-28 nt en insectos infectados (Figura 15). Para definir si la vía de los piRNAs se encuentra presente y activa en *D. kuscheli*, se evaluó la existencia de piRNAs dentro de la población de sRNAs secuenciados. Estas secuencias pueden derivar de elementos transponibles, por lo que un primer paso en su identificación es la búsqueda de homología de secuencia con ellos. Dado que no se cuenta con información genómica de *D. kuscheli*, se utilizaron datos públicos de elementos transponibles de *Drosophila melanogaster* (FlyBase v.FB2016\_05, [http://flybase.org/static\\_pages/docs/datafiles.html#transposon\\_sequence\\_set](http://flybase.org/static_pages/docs/datafiles.html#transposon_sequence_set)) y se realizó el mapeo de todas las librerías de insecto permitiendo hasta 1 *missmatch*. En promedio, el 3,97% de las lecturas por librería mapearon a la base de TEs. Se utilizó la librería con mayor número de secuencias (R1 infectada) para proseguir con el análisis ya que es de naturaleza cualitativa y no se realizaron comparaciones entre librerías. Se seleccionaron los alineamientos correspondientes a 80 elementos transponibles con más de 2000 lecturas mapeadas y se analizó para cada uno de ellos la distribución de tamaños y la firma característica del proceso de amplificación conocido como *ping-*



*pong* (ver INTRODUCCIÓN GENERAL). 61 alineamientos resultaron mayormente compuestos por piRNAs, evidenciado por 1) el tamaño de las lecturas que mapearon (25-27 nt) y 2) el *sequence logo* generado a partir de todas las posibles combinaciones entre las lecturas positivas y las negativas que solapan 10 nt (un enriquecimiento de A en la posición 10 de las lecturas positivas, y un enriquecimiento de U en la primera posición de las lecturas negativas)

A modo de ejemplo, los resultados obtenidos para el elemento transponible *gypsy2* de *D. melanogaster* se muestra en la Figura 21. 11902 sRNAs predominantemente de 24-27 nt de largo (Figura 21A) mapean casi exclusivamente a la cadena antisentido de *gypsy2* (Figura 21C). Se observó un fuerte sesgo de A en la décima posición de la hebra sentido y de U en la primera posición de la hebra antisentido (Figura 21B). Estos resultados indicarían que la vía de piRNAs es activa en delfácidos, pero no parece estar directamente involucrada en la defensa antiviral al menos ante la infección con MRCV.



**Figura 21.** Identificación de piRNAs en *Delphacodes kuscheli* para el elemento transponible *gypsy2*. Distribución del tamaño de los sRNAs mapeados (A); *sequence logo* que muestra evidencia del ciclo de amplificación ping-pong por las posiciones enriquecidas en A y U (B); gráfico de la cobertura de sRNAs derivados de lecturas sentido (arriba, color azul) y antisentido (abajo, color rojo) (C).

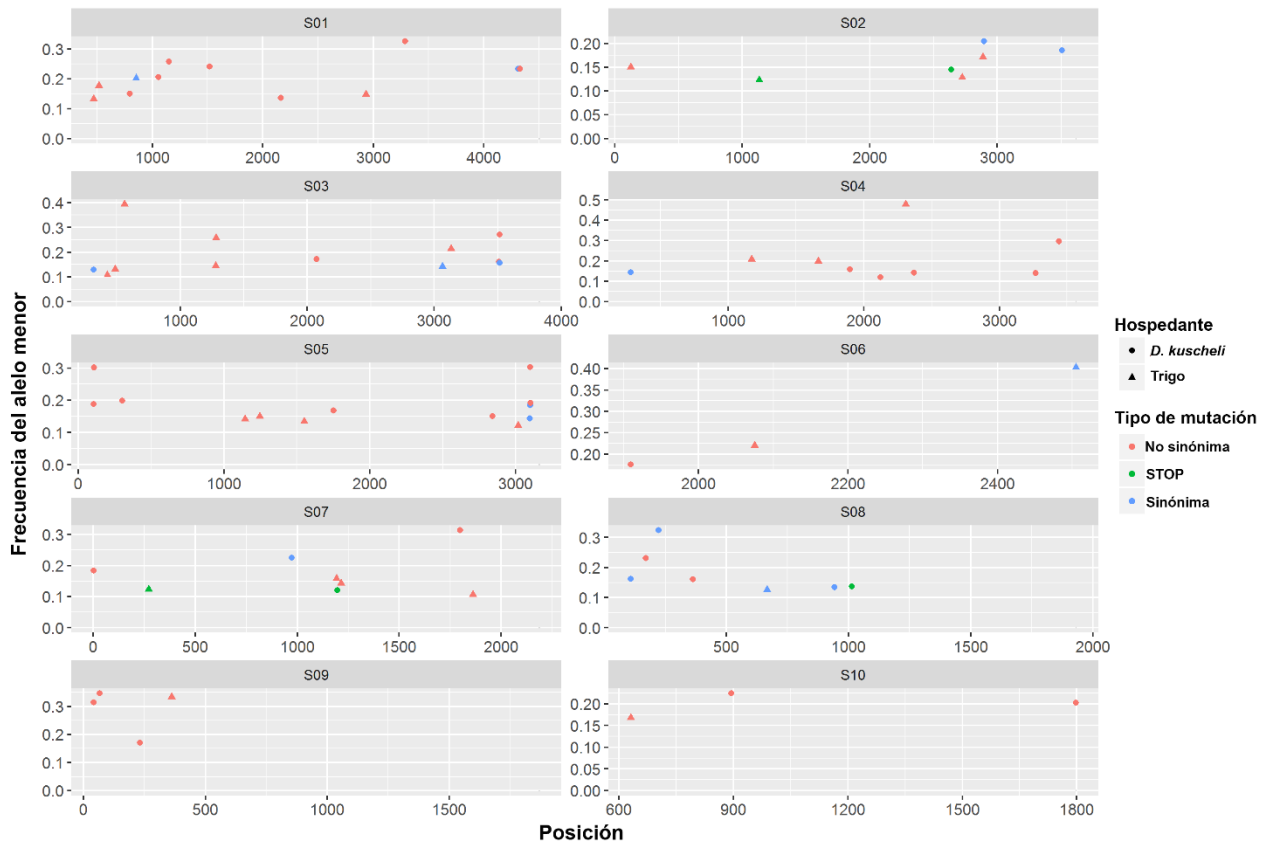
### *Estudio comparativo del perfil mutacional del MRCV en plantas e insectos infectados.*

La secuenciación masiva de vsRNAs ha demostrado ser útil para representar la estructura de la población viral dentro un hospedante (Kutnjak et al., 2015). Si bien normalmente se utiliza el concepto de quasiespecies virales para referirse al conjunto de poblaciones que se encuentran en un tejido infectado, en el presente trabajo se optó por hablar de “perfil mutacional” ya que se desconoce qué mutaciones se encuentran ligadas entre sí.

Para obtener el perfil mutacional de la población viral dentro de cada hospedante, primeramente se calculó la frecuencia de polimorfismos de nucleótido simple (*single nucleotide polymorphism*, SNP) por posición para cada repetición. Para evitar que posibles errores de secuenciación fueran interpretados como SNPs, se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones:

- 1) Sólo se consideraron polimorfismos bialélicos ocurridos con alta frecuencia (igual o mayor al 10% de las lecturas).
- 2) Sólo se consideraron sitios que estuvieran cubiertos por al menos 100 lecturas.
- 3) Sólo se conservaron los cambios que cumplieran las condiciones 1) y 2) en ambas réplicas biológicas.

Los resultados se representan gráficamente en la Figura 22. En *D. kuscheli* se identificaron 47 SNPs con la frecuencia del alelo menor variando entre 0,120 y 0,346, mientras que en trigo se identificaron 31 SNPs con una frecuencia del alelo menor que varió entre 0,106 a 0,479. El mayor número de posiciones variables en el insecto puede deberse a la mayor diversidad de tejidos que el virus es capaz de infectar en este hospedante. Curiosamente, en ambos hospedantes la mayoría de estas mutaciones fueron no sinónimas (29/41 en insectos y 25/29 en plantas) y algunas de ellas incluso generaron codones de terminación prematura (Tabla 15, material suplementario). Ninguna de las mutaciones afectó motivos funcionales, tales como los motivos RdRP en la proteína P1 (Ana J. Distéfano et al., 2003), el motivo helicasa en la proteína P8 (A. J. Distéfano, Conci, Hidalgo, Guzmán, Hopp, & Del Vas, 2002) o el brazo C-terminal implicado en la homomultimerización o los dominios de unión a RNA de la proteína P9-1 (Akita et al., 2012; G. Maroniche, Mongelli, Peralta, Distéfano, Llauger, Taboga, Hopp, & del Vas, 2010). Finalmente, cabe destacar que las posiciones polimórficas fueron específicas para cada hospedante, mostrando que existe una rápida adaptación posiblemente relacionada con funciones diferenciales de las proteínas.



**Figura 22.** Frecuencia del alelo menor de los SNPs identificados en el genoma del MRCV en *D. kuscheli* (círculos) y trigo (triángulos). Las mutaciones fueron clasificadas según su efecto en sinónimas (azules), no sinónimas (rojas) y STOP (codón STOP prematuro, verdes)

## Discusión

El silenciamiento mediado por RNA es una capa defensiva primaria en eucariotas, y la conservación de las proteínas esenciales implicadas en este proceso sugiere que es un mecanismo ancestral (Shabalina & Koonin, 2008). Por otro lado, se postula que evolutivamente los fijivirus adquirieron la capacidad de replicar en plantas más recientemente que en insectos (Lowell R Nault, 1994), por lo que la adaptación de estos virus a este tipo de organismos posiblemente sea más reciente. Resulta interesante entonces comparar cómo el mismo inóculo de MRCV es silenciado y sujeto a presión de selección en ambos hospedantes que poseen maquinarias de silenciamiento diferentes y en los cuales el virus produce sintomatologías con severidad contrastante.

La vía de los siRNAs ha sido ampliamente estudiada en *Drosophila melanogaster* y mosquitos (Bronkhorst & Van Rij, 2014; J. Xu & Cherry, 2014) y en menor grado en *leafhoppers* y *planthoppers* que transmiten distintos virus de propagación persistente (Lan, Wang, et al., 2016; Junmin Li et al., 2013). En la mayoría de los insectos estudiados, la acción de DCR2 da lugar predominantemente a vsiRNAs de 21 nt que limitan la infección viral (Galiana-Arnoux, Dostert, Schneemann, Hoffmann, & Imler, 2006; Lan, Wang, et al., 2016; Schnettler, Ratnier, et al., 2013; Sekhar Nandety, Fofanov,

Koshinsky, Stenger, & Falk, 2013; Van Rij et al., 2006; X.-H. Wang et al., 2006). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo indican que en *D. kuscheli* la especie de 22 nt es la más abundante seguida por vsiRNAs de 21 y 23 nt (Figura 15). Estos resultados están en concordancia con datos obtenidos en otras especies de *planthoppers* (Q. Chen et al., 2012; Lan, Chen, et al., 2016; Junmin Li et al., 2013, 2014; Y. Xu et al., 2014; Y. Xu, Huang, Fu, Wu, & Zhou, 2012). Curiosamente, en el *planthopper Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) DCR2 carece del dominio canónico de unión a dsRNA carboxi-terminal que está presente en *Drosophila* y otros insectos (X.-Y. Zhang, Lu, Zhou, & Zhou, 2013). Esta diferencia estructural podría explicar las diferencias en la regla molecular que determina la longitud de los vsiRNAs.

Los animales, desde protozoos hasta humanos poseen piRNAs, que intervienen en el mantenimiento de la estabilidad genómica en células de la línea germinal mediante el silenciamiento de transposones (Halic & Moazed, 2009). Sin embargo, recientemente se han propuesto nuevas funciones para los piRNAs (Czech & Hannon, 2016; Sarkar, Volf, & Vaury, 2016), incluyendo su participación en la defensa antiviral en mosquitos (Miesen et al., 2016; Morazzani et al., 2012). En el *leafhopper Recilia dorsalis* se identificaron piRNAs (Lan, Wang, et al., 2016) y se demostró que el genoma del *planthopper Nilaparvata lugens* posee los genes codificantes para los componentes centrales de la vía de piRNAs, incluyendo AGO3, Piwi y Aubergine (H.-J. Xu et al., 2013). Los datos obtenidos en la presente Tesis muestran por primera vez que la vía de piRNAs también es funcional en *planthoppers* ya que se encontraron sRNAs derivados de TEs con los tamaños y características de piRNAs (Figura 21). Sin embargo, nuestros resultados indican que no participan directamente en el silenciamiento antiviral ya que no se identificaron piRNA derivados de secuencias virales de 24-26-nt (Figura 15). Curiosamente, la producción de piRNAs parece afectada por la infección por MRCV. A pesar de que la disminución en las cantidades de piRNAs mostrada (Figura 14) no es estadísticamente significativa, el papel de la infección en el control del perfil de los transposones y eventualmente en la regulación de genes del hospedante merece un estudio más profundo.

En plantas, distintas proteínas DCL cortan el dsRNA viral o endógeno en sRNAs de distintos tamaños. En *Arabidopsis* se han establecido roles jerárquicos en la participación de estas proteínas, donde DCL4 genera vsiRNAs de 21 nt siendo ésta la especie mayoritaria, mientras que DCL2 genera en menor cantidad vsiRNAs de 22 nt (Parent et al., 2015). DCL3, por su parte, genera sRNAs de 24 nt generalmente asociados al silenciamiento transcripcional y con capacidad móvil a través del floema (Melnyk, Molnar, Bassett, & Baulcombe, 2011). El genoma de arroz codifica por lo menos para 5 DCL, y el rol que cumple cada una ha de ellas ha sido parcialmente estudiado en la producción de sRNAs endógenos. OsDCL1 y OsDCL3a generan miRNAs de 21-22 nt y miRNAs no canónicos de 24 nt respectivamente, a partir de estructuras de dsRNA en horquilla que provienen de transcripciones de genes de miRNAs (L. Wu et al., 2009, 2010). OsDCL4 produce sRNAs

secundarios de 21 nt, incluyendo los generados a partir de dsRNA dependiente de OsRDR6 (B. Liu et al., 2007; Song et al., 2012). OsDCL3b y OsDCL3a generan sRNAs de 24 nt de manera dependiente de OsRDR2. Los sRNAs de 24 nt se asocian a OsAGO4 y median la metilación de citosinas en moléculas de DNA, mientras que los miRNAs de 21 nt se asocian con OsAGO1 y median el corte de mRNAs (Song et al., 2012; Wei et al., 2014; L. Wu et al., 2010). La acción respectiva de cada una de estas proteínas DCL en la respuesta antiviral en arroz es desconocida, y menos se conoce aún en trigo.

En arroz infectado con RSV, los vsiRNAs representan entre el 0,6% (Yan et al., 2010) y el 15% (Y. Xu et al., 2012) del total de sRNAs y su largo es de 21 nt, seguidos por 22 y 20 nt respectivamente. Plantas de trigo infectadas con *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) y *Triticum mosaic virus* (TriMV) también generan vsiRNAs mayormente de 21 y 22 nt (Tatineni, Riethoven, Graybosch, French, & Mitra, 2014). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en este trabajo de Tesis, donde se observa que en trigo la gran mayor parte de los vsiRNAs son de 21 y 22 nt y representan entre el ~1% y ~5,5% del total de los sRNAs. Llamativamente, la coinfección en arroz con los virus *Rice tungro bacilliform virus* (RTBV, pararetrovirus de DNA) y *Rice tungro spherical virus* (RTSV, picorna-like virus) genera además vsiRNAs de 24 nt, que han sido asociados con virus de DNA y viroides que poseen una etapa de replicación dentro del núcleo.

La infección con MRCV modifica levemente la proporción de sRNAs de 21 y 24 nt, siendo el cociente 21/24nt de ~0,6 en las plantas control y ~0,7 y ~0,9 a 12 y 21 dpi respectivamente (Figura 14). Esto resulta llamativo dado que dicho cociente es de aproximadamente 5 en infecciones con otros virus de plantas que replican en mesófilo (Herranz, Navarro, Sommen, & Pallas, 2015). En infecciones de trigo con los virus WSMV y TriMV se observó la misma tendencia de incremento en la proporción de sRNAs de 21 nt y una disminución de los sRNAs de 24 nt (Tatineni, Riethoven, Graybosch, French, & Mitra, 2014).

En los reovirus animales las cadenas negativas del genoma viral se sintetizan dentro de partículas preensambladas que contienen 1 molécula de +RNA de cada uno de los segmentos (Lourenco & Roy, 2011). El ensamblaje de las partículas está acoplado con la replicación del genoma en un proceso finamente regulado: la polimerasa viral sólo es activa cuando su estructura se modifica por interacción con el componente mayoritario del *core* (Gridley & Patton, 2014; Trask, McDonald, & Patton, 2012). Este mecanismo aseguraría que el dsRNA viral se sintetice protegido de la maquinaria de silenciamiento. Dado que en animales no existen RDRs, resulta entonces particularmente llamativa la presencia de vsiRNAs derivados de todo el largo de los segmentos del MRCV y de ambas cadenas en proporciones similares (prácticamente el 50% de las lecturas de cada segmento, Figura 17, Figura 18) en insectos. Estos resultados indicarían que el sustrato para la producción de vsiRNAs son los segmentos completos del dsRNA viral. Se obtuvieron resultados

similares en insectos infectados con otros miembros de la familia *Reoviridae* en los *leafhoppers* *Homalodisca vitripennis* (Sekhar Nandety et al., 2013) y *Recilia dorsalis* (Lan, Chen, et al., 2016; Lan, Wang, et al., 2016), en el *planthopper* *Laodelphax striatellus* (Junmin Li et al., 2013), en el lepidóptero *Bombix mori* (Zografidis et al., 2015) y en células derivadas de *Culicoides sonorensis* (Schnettler, Ratnier, et al., 2013).

Existen diversas hipótesis que podrían explicar la presencia de dsRNAs virales en citoplasma que serían procesados dando lugar a vsRNAs derivados de ambas cadenas en igual proporción en insectos. En primer lugar, el complejo supramolecular producto de interacciones de ssRNAs de cadena positiva (McDonald et al., 2016) previo a la encapsidación propuesto podría generar complementariedad intra e inter molecular a lo largo de todos los segmentos virales. Esto es respaldado por el hecho de que se ha detectado dsRNA utilizando un anticuerpo monoclonal específico en el citoplasma de células infectadas con un ortoreovirus de mamífero (Weber et al., 2006). Otra hipótesis es que inmediatamente luego de la infección partes del genoma del MRCV se podrían integrar al genoma del insecto (Huiquan Liu et al., 2010) y la transcripción de tales secuencias podría dar lugar a dsRNA viral. En *Drosophila* se ha demostrado que transcriptasas reversas endógenas convierten el RNA viral en DNA que se integra al genoma y se transcribe dando lugar a dsRNAs (Goic et al., 2013). Una posibilidad alternativa es que existan elementos virales endógenos derivados de MRCV (EVEs) integrados en el genoma de *D. kuscheli* como consecuencia de infecciones ocurridas en generaciones pasadas del insecto. Tales elementos, en general derivados de virus de RNA, han sido identificados en diversos genomas de insectos (Drezen et al., 2016), incluido el *planthopper* *Nilaparvata lugens* (Cheng et al., 2014).

La distribución de vsRNAs a lo largo del genoma viral permite identificar regiones que selectivamente generan vsRNAs. Llamativamente, los perfiles fueron muy similares en trigo en los dos tiempos ensayados (Figura 16), indicando que las regiones responsables de mayor producción de vsRNAs no variaron a lo largo del ciclo infectivo en los tiempos ensayados. Por el contrario, pueden observarse notables diferencias en la distribución de vsRNAs entre hospedantes (Figura 17, Figura 19). Mientras que en plantas existe una distribución relativamente heterogénea, con *hotspots* en particular hacia el extremo 5' de los segmentos, en insectos la distribución fue mucho más homogénea (Figura 17). La presencia de vsRNAs en los extremos podría ser parcialmente explicada por las estructuras de tipo *panhandle* que se han descrito en todos los *Reovirus* incluido el MRCV (A. J. Distéfano, Conci, Hidalgo, Guzmán, Hopp, del Vas, et al., 2002), pero no está claro qué mecanismo dispararía la producción de *hotspots* internos en los sectores que no forman partes de estas estructuras. Dada la presencia de RDRs en plantas, los *hotspots* podrían representar zonas en donde su actividad se encuentra exacerbada. Se ha demostrado que proteínas de esta familia contribuyen de manera diferencial a la producción de vsRNAs en *Arabidopsis*, siendo RDR1 inducible por infecciones virales y promoviendo la producción de vsRNAs derivados principalmente

del extremo 5' de RNAs virales, mientras que RDR6 contribuye a la producción de vsiRNAs del extremo 3' (Qu, 2010). De manera interesante, RDR6 de arroz resultó ser esencial para la defensa contra RSV (*Rice stripe virus, Phytoreovirus*) y RDV (Hong et al., 2015) y la proteína P6 de *Rice yellow stunt virus* (familia *Rhabdoviridae*) interactúa con OsRDR6 e interfiere con la producción de siRNAs secundarios en ensayos de expresión transitoria en *N. benthamiana* (Guo et al., 2013). Durante este trabajo de Tesis se cuantificó el nivel de expresión de RDR1 y RDR6 en plantas infectadas con MRCV por qPCR, pero no se detectaron diferencias significativas en ambos genes respecto a los controles (datos no mostrados).

Alternativamente, se ha propuesto que la acumulación de vsiRNAs se debe a estructuras secundarias de ssRNA que desencadenan la producción de gran cantidad de vsiRNAs, y que en algunos casos podrían actuar como un mecanismo de “distracción” de la maquinaria de silenciamiento (Rajeswaran et al., 2014). Sin embargo, la utilización de algoritmos predictivos de estructura secundaria en los mensajeros de MRCV no arrojó resultados compatibles con la acumulación de vsiRNAs (datos no mostrados). Sin embargo, se debe tener en cuenta que estos algoritmos predictivos, sin la complementación de datos experimentales utilizando técnicas bioquímicas como SHAPE (McGinnis, Duncan, & Weeks, 2009), son muy limitados. Si bien suelen ser confiables para analizar regiones contiguas que generan estructuras simples como tRNAs o miRNAs, la gran complejidad de estructuras que es altamente posible que se generen entre los segmentos del MRCV dificulta grandemente el análisis *in silico*.

Los distintos segmentos virales presentaron distintas densidades de acumulación de vsiRNAs, cuantificadas normalizando según el largo de cada segmento (RPKM, Figura 20). Llamativamente, en ningún caso se pudo correlacionar acumulación de RNA medida por qPCR y acumulación de vsiRNAs (Figura 20). Este resultado contrasta con lo obtenido para RSV en arroz, donde los *hotspots* de vsiRNAs derivaron de los mRNAs virales más abundantes (Y. Xu et al., 2012). Resulta interesante la observación de que en plantas existe una correlación inversa entre el tamaño del segmento y la densidad de mapeo de vsiRNAs (Figura 20). En BTV, se ha propuesto que el mecanismo de distribución que asegura que haya una sola copia de cada segmento por partícula viral se debe a interacciones RNA-RNA completamente dependientes del segmento más pequeño S10 que ocurren en paralelo con la encapsidación. Se postula que en primer lugar, el S10 interactuaría con los otros segmentos pequeños (S9, S8), luego con los medianos (S7, S6 y S5) y finalmente con los grandes (S4, S3, S2, S1) (Boyce et al., 2016; T. J. Fajardo, AlShaikhahmed, & Roy, 2016; T. Fajardo, Sung, & Roy, 2015; Sung & Roy, 2014). De esta manera, los segmentos grandes no se podrían empaquetar hasta que los pequeños no lo hagan primero. Aunque esta observación no se repita en insectos, resulta tentador especular con que existe una relación entre este proceso y las diferencias de densidad de vsiRNAs correspondientes a los distintos segmentos del MRCV en trigo.

Debido a su gran tamaño poblacional, sus tiempos de generación cortos y sus altas tasas de mutación, los virus de RNA existen como poblaciones genéticamente diversas (Acevedo, Brodsky, & Andino, 2014). Dentro de un único hospedante, los virus encuentran múltiples tejidos y tipos celulares que poseen una diversidad de respuestas inmunes antivirales. En el caso de los virus que infectan hospedantes múltiples, hay evidencias que demuestra que la adaptación del virus a un organismo específico a menudo tiene como consecuencia una pérdida de *fitness* en el otro. Dicho de otro modo, mutaciones que benefician la replicación viral en un hospedante resultan perjudiciales en un hospedante alternativo (Elena, Agudelo-Romero, & Lalić, 2009). En el caso del MRCV, las transmisiones heterólogas entre organismos son frecuentes, y, dada la gran cantidad de datos generados por la secuenciación de sRNAs, resultaba interesante evaluar el impacto de esta transición sobre la estructura genética poblacional del virus. Se encontraron gran cantidad de mutaciones a tasas relativamente altas en ambos hospedantes y en todos los segmentos (Figura 22, Tabla 15 del material suplementario). Ninguno de los cambios observados fue común entre plantas e insectos, indicando diferentes restricciones mutacionales en los dos hospedantes. Resulta interesante destacar que la mayor parte de las posiciones variables tuvieron como consecuencia un cambio no sinónimo (Tabla 15, material suplementario), posiblemente indicando un proceso de adaptación dentro de cada hospedante. Sin embargo, no se identificaron motivos funcionales conocidos afectados por las mismas. Para determinar si efectivamente cumplen un rol biológico relevante y modifican el *fitness* se necesitarán experimentos basados en aproximaciones de genética reversa.



# CAPÍTULO 2

Análisis transcriptómico de plantas de  
trigo infectadas con MRCV

## *Introducción*

---

El transcriptoma representa al RNA mensajero (mRNA) de aquellos genes que se encuentran presentes en una célula. Es decir, mide un estado estacionario de genes que eventualmente fueron transcritos y que no necesariamente representan el proteoma (todas las proteínas de la muestra) ya que existen diversas capas de regulación post-transcripcional que lo determinan. Por otro lado, algunos mRNA no se traducen en proteínas y diferentes proteínas pueden resultar de un mismo transcripto. El transcriptoma se encuentra continuamente cambiando y es sumamente dependiente del tipo celular, pero posee la ventaja de ser técnicamente menos desafiante que el estudio del proteoma. En particular, el RNA-seq (secuenciación masiva de RNAs) se ha convertido en una herramienta fundamental para una innumerable cantidad de aplicaciones dado su relativo bajo costo y la independencia de información previa sobre el/los organismo/s en estudio.

El **objetivo general** del capítulo es determinar la presencia de alteraciones en la abundancia de los transcritos en plantas de trigo infectadas con MRCV e identificar cuáles de ellas podrían vincularse con la sintomatología. Para ello, primeramente se utilizó el RNA del ensayo biológico del CAPÍTULO 1 para la generación de las librerías de cDNA que fueron secuenciadas utilizando la tecnología Illumina. Luego, se trabajó sobre la referencia del genoma de trigo con el objetivo de incrementar la información de anotación disponible. Posteriormente se realizó el mapeo de las lecturas al genoma, se obtuvieron los conteos correspondientes a cada gen y se realizaron los análisis estadísticos para la determinación de los genes diferencialmente expresados. Finalmente, se realizaron estudios de enriquecimiento funcional para identificar grupos de genes alterados pertenecientes vías metabólicas relacionadas.

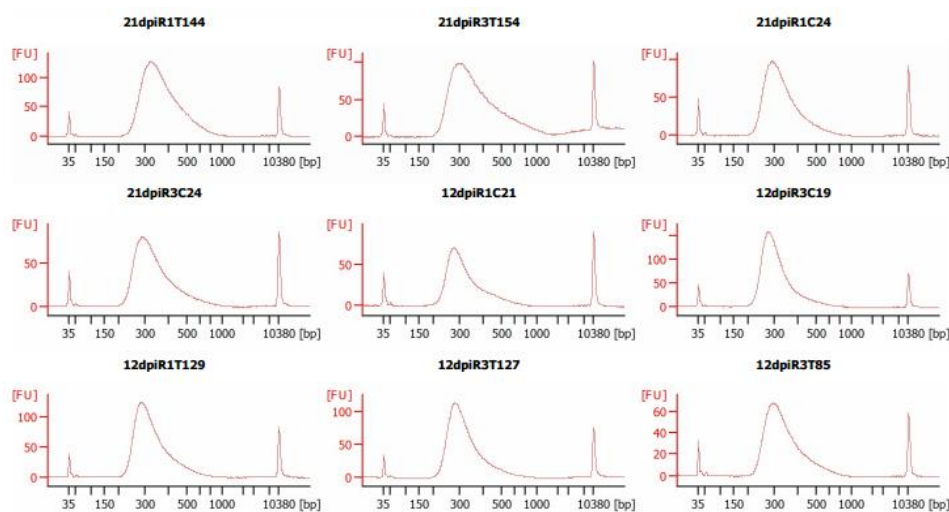
En toda relación hospedante-patógeno se desencadenan diversos mecanismos de respuesta que tienen incidencia directa en la regulación de la abundancia de los transcritos. El conocimiento del transcriptoma resulta entonces una pieza fundamental para la integración de los elementos que componen esa red de respuestas. La **hipótesis de trabajo** es que las alteraciones en la acumulación de transcritos de trigo inducidas por la infección con MRCV aportará información acerca de los mecanismos mediante los cuales el virus cumple su ciclo replicativo y permitirá inferir alteraciones génicas vinculadas en la producción de síntomas.

El apartado que se describe a continuación fue realizado en parte en la Universidad de California, Davis, entre octubre de 2015 y marzo de 2016 en el marco de una colaboración establecida con el Dr. Jorge Dubcovsky, y gracias a una beca para pasantías cortas en el exterior obtenida a través de BEC.AR. Allí se realizó la secuenciación y se comenzó con los análisis bioinformáticos, que fueron finalizados en Argentina.

## Resultados

### Construcción de las bibliotecas y obtención de secuencias

Se utilizó para este experimento el mismo RNA de las muestras pertenecientes al ensayo biológico descrito en el CAPÍTULO 1. Se secuenció el RNA de 4 individuos de trigo por tiempo y por tratamiento (12 dpi y 21 dpi, control e infectados). Con el fin de capturar en la secuenciación la mayor cantidad de varianza posible no atribuible al tratamiento, se utilizaron muestras provenientes de 2 plantas de cada repetición, totalizando 4 réplicas biológicas. Se sintetizaron las bibliotecas de cDNA mediante el kit *IlluminaTruSeq RNA sampleprep* (Illumina). El protocolo de dicho kit permite la purificación de RNAs mensajeros mediante la selección por unión a poliT y la ligación de los adaptadores ocurre una vez realizada la síntesis de cDNA. Esto implica que 1) no se recogen lecturas derivadas transcritos del virus ya que no son poliadenilados y 2) se pierde información acerca de la cadena que le dio origen a cada lectura. A continuación, se verificó la calidad y el tamaño promedio de los insertos mediante un equipo *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies), utilizando el kit *High Sensitivity DNA assay*. Algunos de los perfiles obtenidos se muestran en la Figura 23.



**Figura 23.** Perfiles electroforéticos de las librerías que se indican en la figura obtenidos con un *Bioanalyzer 2100*. T es tratado y C es control. R indica la repetición de la cual proviene la muestra.

Se realizó una secuenciación en dos *lanes* en corridas independientes en un equipo HiSeq3000 con lecturas de tipo *single end* de 50 pares de bases. Con el objetivo de minimizar la variabilidad técnica se secuenciaron todas las librerías con sus respectivos índices en una misma *lane*. Dado que la detección de genes diferencialmente expresados a nivel técnico requiere no sólo de un diseño experimental robusto, sino también de la obtención de un número relativamente homogéneo de lecturas por muestra, se esperó a que los resultados de la primera *lane* estuvieran disponibles para

hacer correcciones en el armado del *pool* de secuenciación, de manera tal de compensar las diferencias en cantidad de lecturas por muestra en la segunda corrida. En promedio, ambas *lanes* generaron 400.209.497,5 lecturas cada una.

De esta manera se obtuvieron entre 41 y 71 millones de lecturas por librería. Luego de la limpieza de adaptadores utilizando Scythe [(Buffalo, 2014), con una lista de adaptadores de Illumina standard] y recorte y filtrado por calidad utilizando Sickle [(Joshi & Fass, 2011), con parámetros  $-q$  25 y  $-l$  25] más del 98% de las lecturas cumplieron con los requisitos de calidad necesarios para el mapeo (“lecturas mapeables”, ver Tabla 11).

<i>Librería</i>	<i>Lane1</i>	<i>Lane2</i>	<i>Lecturas totales</i>	<i>Lecturas mapeables</i>
<b>12dpiR1C11</b>	22140154	24430208	46570362	45729423
<b>12dpiR1C21</b>	26316929	19190545	45507474	44622147
<b>12dpiR1T07</b>	23474735	28239543	51714278	50768381
<b>12dpiR1T129</b>	29568521	41941638	71510159	70212482
<b>12dpiR3C01</b>	25582159	20227512	45809671	45015770
<b>12dpiR3C19</b>	16694649	30851072	47545721	46738470
<b>12dpiR3T127</b>	35074061	23154402	58228463	57160964
<b>12dpiR3T85</b>	25001557	29498981	54500538	53494976
<b>21dpiR1C06</b>	24402878	21409347	45812225	44995555
<b>21dpiR1C14</b>	28359178	21112311	49471489	48600135
<b>21dpiR1C24</b>	21229749	22699960	43929709	43126684
<b>21dpiR1T144</b>	22180690	22929851	45110541	44238652
<b>21dpiR1T86</b>	31847798	29514277	61362075	60325626
<b>21dpiR3C24</b>	18849126	22503351	41352477	40540055
<b>21dpiR3T154</b>	20180452	25592854	45773306	44798243
<b>21dpiR3T42</b>	26884006	19336501	46220507	45357968
	<b>Promedio por muestra</b>		<b>50026187</b>	<b>49107845</b>

*Tabla 11. Cantidad de lecturas obtenidas por muestra en cada corrida (lane 1 y lane 2), el total, y el total de las lecturas mapeables luego de la limpieza de adaptadores y el filtrado por calidad. T es tratado y C es control. R indica la repetición de la cual proviene la muestra.*

### *Elección de genoma de referencia y generación de archivo de anotación la versión TGACv1*

Para gran parte de las aplicaciones de tecnologías NGS, y en especial para RNAseq, es fundamental contar con un genoma de referencia de buena calidad de ensamblado y anotado para obtener información útil. Al momento de realizar este análisis se encontraban disponibles dos ensamblados del genoma de trigo pan (*Triticum aestivum* cv *Chinese Spring*,  $2n=6x=42$ ): uno de ellos había sido liberado por el *International Wheat Genome Sequencing Consortium* en 2015 (IWGSCv2, *ensembl*

release 29) y otro por el *The Genome Analysis Center* en 2016 (TGACv1, *ensembl release 30*). Ambos provienen de datos de distintos tipos de secuenciación de los brazos cromosómicos de cada uno de los 21 cromosomas del trigo, que fueron separados por *flow sorting* (Marcussen et al., 2014). Se evaluó la proporción de lecturas mapeadas a ambas referencias utilizando BWA [(H. Li & Durbin, 2009) permitiendo 2 *missmatches*] y se determinó que mientras que el 92% de las lecturas mapearon al genoma IWGSCv2, el 96% lo hicieron al genoma TGAC. Por ello se optó seguir trabajando con esta última versión del genoma.

Debido a su liberación reciente (enero 2016), el genoma TGAC no contaba con un archivo de anotación. Por ello, se procedió a anotar manualmente el genoma utilizando distintos *datasets* de transcriptos públicos: la base de cDNAs depositados en *ensembl* (IWGSC1.0+popseq.30\_cDNA), los transcriptos ensamblados en el trabajo (Xiao et al., 2013) y los descriptos en el trabajo (Krasileva et al., 2013).

El procedimiento para la obtención de la anotación fue tomado de (Pearce et al., 2014). Brevemente, los *datasets* de transcriptos mencionados se mapearon a cada homeólogo por separado utilizando el programa específico para mapeo de secuencias largas de mRNAs GMAP (utilizando los parámetros `-n 1 --nofails --cross-species -f samse -x 0 -K 10000 --min-intron-length 20`, (T. D. Wu & Watanabe, 2005). Luego, se utilizaron diversos *scripts* para determinar las regiones iniciales y finales correspondientes a cada transcripto, y se anotó de manera independiente cada cromosoma homeólogo. Luego, se fusionaron dichos datos en un archivo de anotación único para todo el genoma. Lamentablemente, utilizando esta metodología basada en la determinación de coordenadas génicas iniciales y finales, se pierde información acerca de la estructura génica de cada transcripto, por lo que no pueden obtenerse datos como cambios en variantes de *splicing*.

Para incrementar la cantidad de transcriptos con anotación funcional se utilizó el programa Blast2GO que permite obtener anotación de tipo GO (*Gene Ontology*) a partir de los resultados de un *blast*. La ontología génica GO consiste en un vocabulario controlado y jerárquico que describe el gen y los atributos del producto génico según tres clasificaciones: la **función molecular** (la actividad bioquímica de la entidad), el **proceso biológico** (sobre qué proceso celular actúa) y la **localización en componentes celulares**. En primer lugar, se utilizó el programa Blastx (parámetros `-evalue 1e-3 -outfmt 5`) contra la base de datos de proteínas no redundantes del NCBI. Luego, se utilizó una versión local del programa Blast2GO para obtener los términos GO utilizando los primeros 10 *blast hits*. De esta manera, se obtuvieron indicadores funcionales de la mayor parte de los transcriptos de trigo y se anotó el genoma TGAC. Este paso resultó sumamente necesario para la extracción de la mayor cantidad de datos útiles de las secuencias que se obtuvieron en este capítulo.

### *Mapeo de las lecturas obtenidas al genoma TGACv1*

Una vez concluida la anotación del genoma, se procedió a mapear las lecturas correspondientes a cada librería utilizando el programa específico de mapeo para secuencias cortas GSNAP (T. D. Wu & Nacu, 2010), con los parámetros `-m 2 -n 1 -N 1`), permitiendo 2 *missmatches* por lectura. Luego, a partir de los alineamientos generados y el archivo de anotación, se utilizó el programa HTSeqcount [(Anders, Pyl, & Huber, 2015), parámetros `-m union --stranded=no -a 30 -t gene`] para realizar el conteo de lecturas por gen. Es importante aclarar que este programa descarta cualquier secuencia que no mapee de manera única al genoma, por lo que aquellas lecturas que no presenten la suficiente divergencia como para determinar el homeólogo del cual provienen fueron descartadas (Tabla 12).

<b>Librería</b>	<b>Número de lecturas mapeadas</b>	<b>% sobre el total</b>	<b>% no únicas</b>	<b>Únicas con anotación</b>		<b>Únicas con anotación ensembl</b>	
<b>12dpiR1C11</b>	45184747	98,81%	48,63%	22752679	50,35%	21166979	46,85%
<b>12dpiR1C21</b>	44172697	98,99%	48,69%	22237091	50,34%	20701266	46,86%
<b>12dpiR1T07</b>	50235243	98,95%	47,57%	25838744	51,44%	23964676	47,70%
<b>12dpiR1T129</b>	69460101	98,93%	48,44%	35191034	50,66%	32955115	47,44%
<b>12dpiR3C01</b>	44592042	99,06%	46,73%	23236324	52,11%	21381286	47,95%
<b>12dpiR3C19</b>	46246137	98,95%	47,20%	23898253	51,68%	22053661	47,69%
<b>12dpiR3T127</b>	55989714	97,95%	47,00%	28882240	51,58%	26549110	47,42%
<b>12dpiR3T85</b>	52885448	98,86%	47,11%	27346798	51,71%	25128328	47,51%
<b>21dpiR1C06</b>	44584866	99,09%	48,11%	22630945	50,76%	20903066	46,88%
<b>21dpiR1C14</b>	48154675	99,08%	47,60%	24710221	51,31%	22838761	47,43%
<b>21dpiR1C24</b>	42611477	98,81%	47,10%	22026281	51,69%	20193512	47,39%
<b>21dpiR1T144</b>	43853851	99,13%	47,23%	22705754	51,78%	21036019	47,97%
<b>21dpiR1T86</b>	59754559	99,05%	48,30%	30337956	50,77%	28275548	47,32%
<b>21dpiR3C24</b>	40069842	98,84%	46,80%	20818291	51,96%	19071392	47,60%
<b>21dpiR3T154</b>	44299067	98,89%	48,32%	22405511	50,58%	20675281	46,67%
<b>21dpiR3T42</b>	44936801	99,07%	47,74%	23024348	51,24%	21341063	47,49%

*Tabla 12. Lecturas de cada librería mapeadas al genoma TGACv1 de trigo. Se indica la proporción de lecturas que mapearon en el genoma (% sobre el total); de ellas, la proporción que mapearon en más de un lugar (% no únicas), cuántas de ellas resultaron informativas ya que mapearon a una sola locación (únicas con anotación) y cuántas de ellas tenían además anotación de ensembl (únicas con anotación ensembl).*

Se observa que, del total de las secuencias mapeadas, sólo el ~51% lo hizo de manera única. Esto se debe, como ya se mencionó, a la ploidía de la especie y a la gran cantidad de eventos de duplicación que existen en el genoma del trigo.

### *Identificación de genes diferencialmente expresados ante la infección con MRCV*

Una vez obtenidos los archivos de conteos se procedió a la determinación de genes diferencialmente expresados utilizando dos paquetes estadísticos independientes que funcionan dentro del entorno R: EdgeR y DESeq2 (Love, Anders, & Huber, 2014; Robinson, McCarthy, & Smyth, 2010). Ambos algoritmos se basan en los mismos supuestos estadísticos (distribución binomial negativa de los conteos, que la hipótesis nula sea que los genes no están diferencialmente expresados, entre otros) pero poseen diferencias en las formas de normalización (Varet et al., 2016). Los dos métodos han sido utilizados indistintamente para gran cantidad de estudios de RNAseq, y no existe un consenso general acerca de la utilidad de uno por sobre el otro (Varet et al., 2016).

En primer lugar, se estudió la dispersión entre las muestras mediante un análisis de componentes principales (Figura 24). A 12 dpi no se observa agrupamiento de las muestras según si están infectadas o no, indicando que no habría un efecto por tratamiento muy marcado. A 21 dpi se observa un leve agrupamiento de las muestras tratadas a lo largo de la componente 1. Esto indica que la variabilidad biológica entre muestras es grande en relación al efecto del tratamiento, sobre todo a 12 dpi.

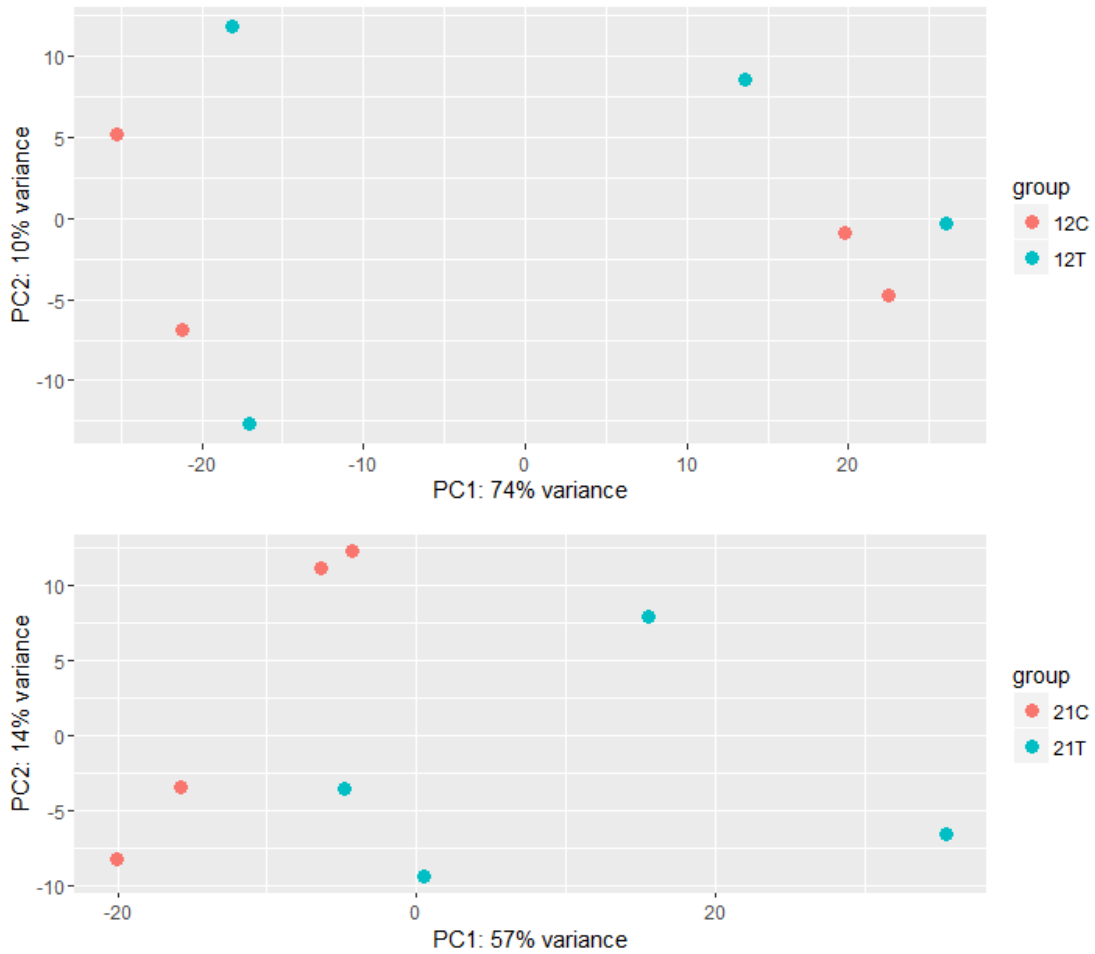


Figura 24. Análisis de PCA para las comparaciones tratamiento control a 12 dpi (12C) vs infectado a 12 dpi (12T) y tratamiento control a 21 dpi (21C) vs infectado a 21 dpi (21T)

Para definir que un gen se encuentra diferencialmente expresado se tomó como *cut-off* en ambos programas un p-valor ajustado menor a 0,05 ( $p_{adj} < 0,05$ ). Luego, para cada tiempo, se identificó cuántos genes son diferencialmente expresados utilizando uno u otro programa o ambos (la intersección, Figura 25).



Figura 25. Diagramas de Venn indicando el número de genes diferencialmente expresados a 12 y 21 dpi identificados con cada algoritmo utilizado (EdgeR o DESeq2) y la intersección.



### Validación de un conjunto de genes diferencialmente expresados por PCR en tiempo real

Se seleccionaron 4 genes identificados como diferencialmente expresados en el RNAseq a 12 dpi, y 12 genes en la misma condición a 21 dpi. El criterio utilizado fue una combinación de bajo p-valor y que hubieran sido detectados por ambos programas. Se diseñaron oligonucleótidos específicos (detallados en la Tabla 5) para la cuantificación relativa de los genes de interés mediante PCR cuantitativa en tiempo real (n=6). Como *housekeeping* se seleccionó al gen *GTPB* de acuerdo con el trabajo de (K. Zhang et al., 2013), donde se evalúa la conveniencia de utilizar distintos genes *housekeeping* ante infecciones provocadas por diferentes especies virales en trigo incluyendo al fijivirus SRBSDV.

Los resultados de la validación se detallan en la Figura 26.

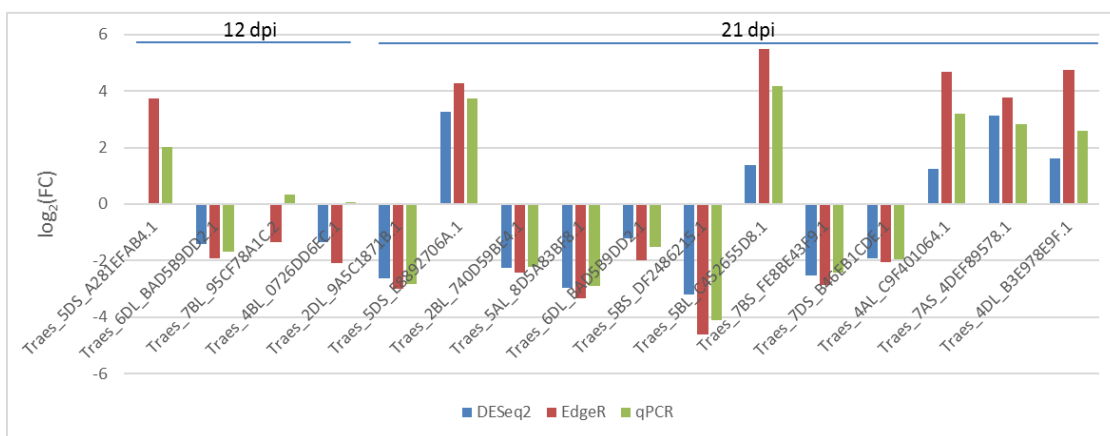


Figura 26. Validación de un conjunto de genes candidatos a ser diferencialmente expresados por PCR en tiempo real. Se representan en el mismo gráfico los resultados arrojados por cada programa estadístico y el valor de cambio obtenido por PCR en tiempo real.

Se logró validar dos de cuatro genes seleccionados identificados como diferencialmente expresados a 12 días post infección, y la totalidad de doce genes seleccionados a 21 días post infección. Estos resultados indican que el diseño experimental utilizado para el RNAseq (4 réplicas por tratamiento) tuvo la potencia esperada. Dado que a 12 dpi sólo se pudieron validar dos de los cuatro genes seleccionados, y que además en estas muestras se identificó una baja cantidad de genes diferencialmente expresados con medidas discordantes entre ambos programas, se optó por solamente profundizar el análisis a 21 dpi.

### Estudio del enriquecimiento funcional de genes diferencialmente expresados a 21 dpi

Dado que como se mencionó, no existe un consenso general acerca de la validez de uno método por sobre el otro para la identificación de genes diferencialmente expresados, se sumaron ambas listas. De esta forma se obtuvo un total de 1110 genes subexpresados y 2456 genes sobreexpresados ante la infección. Luego se hicieron análisis de enriquecimiento funcional utilizando el programa TopGO [(Alexa & Rahnenführer, 2007), opciones

algorithm="weight01", statistic="fisher"] que se basa en el uso de categorías GO. Esta estrategia es utilizada por una gran cantidad de técnicas vinculadas a la interpretación de datos transcriptómicos para extraer conocimiento biológico y utiliza el vocabulario controlado descriptivo de cada gen (*Gene Ontology*) para determinar si una cierta lista de genes posee más elementos vinculados a una categoría funcional que los esperados por azar (*gene set enrichment analysis*).

A nivel biológico, quizás la ontología más útil para entender procesos alterados es “proceso biológico” o *biological process*. Por lo tanto, se realizó el estudio de enriquecimiento funcional para dicha ontología y se obtuvieron categorías enriquecidas tanto para genes sobreexpresados (Tabla 13) como para genes subexpresados (Tabla 14) con p-valor < 0,01 según el test exacto de Fisher.

GO.ID	Term	Annotated	Significant	Expected	classicFisher
GO:0006412	translation	3580	190	69,67	1,00E-30
GO:0005975	carbohydrate metabolic process	5042	165	98,12	8,30E-11
GO:0009607	response to biotic stimulus	880	39	17,13	7,00E-09
GO:0030244	cellulose biosynthetic process	269	20	5,23	8,80E-08
GO:0010089	xylem development	37	8	0,72	2,20E-07
GO:0006032	chitin catabolic process	86	11	1,67	3,50E-07
GO:0055114	oxidation-reduction process	8885	187	172,91	6,20E-07
GO:0016998	cell wall macromolecule catabolic process	107	11	2,08	3,20E-06
GO:0031408	oxylipin biosynthetic process	71	9	1,38	4,40E-06
GO:0009415	response to water	200	10	3,89	5,80E-06
GO:0031640	killing of cells of other organism	9	4	0,18	1,10E-05
GO:0045492	xylan biosynthetic process	125	11	2,43	1,40E-05
GO:0009834	plant-type secondary cell wall biogenesis	43	9	0,84	2,60E-05
GO:0001510	RNA methylation	222	14	4,32	3,70E-05
GO:0008152	metabolic process	53781	1055	1046,61	3,90E-05
GO:0051258	protein polymerization	322	10	6,27	0,00018
GO:0042026	protein refolding	48	6	0,93	0,00019
GO:0019919	peptidyl-arginine methylation, to asymmetrical-dimethyl arginine	2	2	0,04	0,00031
GO:0006414	translational elongation	187	12	3,64	0,00033
GO:2000652	regulation of secondary cell wall biogenesis	9	3	0,18	0,00042
GO:0050832	defense response to fungus	186	11	3,62	0,0005
GO:0009832	plant-type cell wall biogenesis	150	17	2,92	0,00052
GO:0006656	phosphatidylcholine biosynthetic process	11	3	0,21	0,00081
GO:0006183	GTP biosynthetic process	26	4	0,51	0,00105
GO:0006228	UTP biosynthetic process	26	4	0,51	0,00105
GO:0006165	nucleoside diphosphate phosphorylation	506	12	9,85	0,00105
GO:0006564	L-serine biosynthetic process	12	3	0,23	0,00106
GO:0009963	positive regulation of flavonoid biosynthetic process	30	4	0,58	0,00182
GO:0042254	ribosome biogenesis	805	26	15,67	0,00205

GO:0010413	glucuronoxylan metabolic process	103	7	2	0,00236
GO:0046274	lignin catabolic process	33	4	0,64	0,0026
GO:0001522	pseudouridine synthesis	105	7	2,04	0,00263
GO:0006457	protein folding	698	29	13,58	0,00289
GO:0009611	response to wounding	199	10	3,87	0,00297
GO:0009625	response to insect	21	3	0,41	0,00298
GO:0000028	ribosomal small subunit assembly	5	2	0,1	0,00299
GO:0006626	protein targeting to mitochondrion	142	8	2,76	0,00381
GO:0006952	defense response	1212	42	23,59	0,00409
GO:0010067	procambium histogenesis	6	2	0,12	0,00443
GO:0006979	response to oxidative stress	1114	34	21,68	0,00599
GO:0042742	defense response to bacterium	225	10	4,38	0,00696
GO:0007017	microtubule-based process	818	17	15,92	0,00718
GO:0019464	glycine decarboxylation via glycine cleavage system	8	2	0,16	0,00807
GO:0000463	maturation of LSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5,8S rRNA, LSU-rRNA)	8	2	0,16	0,00807
GO:0000466	maturation of 5,8S rRNA from tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5,8S rRNA, LSU-rRNA)	8	2	0,16	0,00807
GO:0006730	one-carbon metabolic process	88	6	1,71	0,00884
GO:0045490	pectin catabolic process	25	3	0,49	0,00937

**Tabla 13.** Categorías GO enriquecidas en genes sobreexpresados a 21 dpi (classicFisher,  $p < 0,01$ ). Las columnas indican el identificador GO asociado a esa categoría (GO.ID), el nombre del término (Term), cuántos genes están asociadas a dicha categoría en la referencia utilizada (Annotated), cuántos genes estaban alterados dentro de esa categoría (Significant), cuántos hubiera sido esperado por azar (Expected) y finalmente el p-valor que se obtiene por el test exacto de Fischer (classicFisher). Cada categoría fue nuevamente clasificada en grupos más generales indicados en color: **biogénesis de ribosomas**, **metabolismo de aminoácidos y expresión y plegado de proteínas**; **biosíntesis y modificación de ácidos nucleicos**; **desarrollo de pared celular o de tejido vascular**; **respuesta a estímulos bióticos**; **procesos de óxido reducción y estrés oxidativo**; **síntesis de lípidos**; **otros**

GO.ID	Term	Annotated	Significant	Expected	classicFisher
GO:0045454	cell redox homeostasis	456	15	3,21	1,30E-07
GO:0005992	trehalose biosynthetic process	76	7	0,54	3,80E-07
GO:0009741	response to brassinosteroid	74	6	0,52	2,30E-06
GO:0009435	NAD biosynthetic process	29	4	0,2	2,60E-05
GO:0015798	myo-inositol transport	2	2	0,01	3,50E-05
GO:0000024	maltose biosynthetic process	3	2	0,02	0,0001
GO:0009691	cytokinin biosynthetic process	54	4	0,38	0,0003
GO:0010167	response to nitrate	62	4	0,44	0,00052
GO:0010106	cellular response to iron ion starvation	34	3	0,24	0,00108
GO:0005983	starch catabolic process	36	3	0,25	0,00128
GO:0015706	nitrate transport	79	4	0,56	0,00129
GO:0008152	metabolic process	53781	326	378,83	0,00156
GO:0005975	carbohydrate metabolic process	5042	50	35,52	0,00186
GO:0042754	negative regulation of circadian rhythm	1	1	0,01	0,00593
GO:0019805	quinolinate biosynthetic process	1	1	0,01	0,00593

**Tabla 14.** Categorías GO enriquecidas en genes sub-expresados a 21 dpi (classicFisher,  $p < 0.01$ ). Las columnas indican el identificador GO asociado a esa categoría (GO.ID), el nombre del término (Term), cuántos genes están asociadas a dicha categoría en la referencia utilizada (Annotated), cuántos genes estaban alterados dentro de esa categoría (Significant), cuántos hubiera sido esperado por azar (Expected) y finalmente el p-valor que se obtiene por el test exacto de Fischer (classicFisher). Cada categoría fue nuevamente clasificada en grupos más generales indicados en color: procesos de óxido reducción y estrés oxidativo; metabolismo hormonal; metabolismo de almidón y azúcares simples; metabolismo y transporte de nitrógeno; otros

Se identificaron 47 categorías funcionales enriquecidas correspondientes a genes sobreexpresados (Tabla 13) y 15 correspondientes a genes subexpresados. Como se puede apreciar considerando la cantidad de elementos que compone cada categoría (columna Annotated), algunas de ellas son más generales e incluso comprenden otras más específicas. Con el objetivo de facilitar el análisis, se clasificó cada una en grupos más abarcativos indicados con color en las tablas.

## Discusión

---

La infección viral es un fenómeno complejo cuyo desarrollo varía en función del virus, del hospedante, del tejido, del estadio de desarrollo de la planta en el momento de la infección y de las condiciones ambientales. A su vez, todos los organismos responden a ritmos circadianos y el progreso de una misma infección viral puede presentar situaciones muy disímiles a lo largo del tiempo. Al momento de realizar un experimento que requerirá el análisis de un transcriptoma, sujeto a tantos factores que pueden modificar en gran manera los resultados, es fundamental considerar todos los aspectos posibles para minimizar las variaciones no asociadas al tratamiento que se quiere aplicar, en este caso la infección con MRCV. En este sentido, es necesario tomar recaudos como muestrear a la misma hora del día, minimizar el efecto posicional de la planta y utilizar como tratamiento control plantas picadas con chicharritas sanas.

Adicionalmente, cuando se realizan análisis estadísticos basados en un gran número de comparaciones en sistemas muy fluctuantes, es importante contar con la suficiente potencia para poder distinguir la señal del ruido biológico. Numerosos estudios técnicos sobre *RNAseq* han debatido sobre este tema, contraponiendo la cantidad de lecturas (profundidad) con la cantidad de réplicas biológicas a ser secuenciadas (Busby, Stewart, Miller, Grzeda, & Marth, 2013; Yuwen Liu, Zhou, & White, 2014; Schurch et al., 2016). Estos trabajos, si bien aportan lineamientos generales como priorizar el número de réplicas biológicas por sobre la profundidad, concluyen finalmente que la optimización del diseño es muy dependiente del organismo y de la intensidad del cambio inducido por el tratamiento. Por ello, la elección de utilizar 4 réplicas biológicas por cada tratamiento se realizó en base a experimentos previos que han utilizado al trigo como organismo de estudio y resultaron exitosos en la identificación de un número considerable de genes diferencialmente expresados (Krasileva et al., 2013; Pearce et al., 2014, 2015).

Numerosos trabajos han determinado el perfil transcriptómico mediante *RNAseq* de varias interacciones planta-virus (Hillung, García-García, Dopazo, Cuevas, & Elena, 2016; Lu et al., 2012; Sade et al., 2014). Sin embargo, la mayor parte de los hospedantes utilizados son organismos modelo (dicotiledóneas) que han demostrado poseer patrones de desarrollo y fisiologías en muchos casos no analogables a monocotiledóneas (Mandadi & Scholthof, 2013; Nelissen, Gonzalez, & Inzé, 2016). Por lo tanto, se priorizará la discusión de los resultados obtenidos en este trabajo con otros en los que se hayan utilizado sistemas similares.

Poco se conoce acerca de la cinética de replicación del MRCV en plantas salvo que los síntomas se comienzan a evidenciar a partir de los 20 dpi en trigo (Truol et al., 2001). Por otro lado, tiempos cercanos al momento de la infección resultan útiles para comprender alteraciones celulares tempranas que tendrán consecuencias en el desarrollo. En este trabajo, se analizaron dos tiempos postinfección que presentaron características diferentes, asociadas muy posiblemente a la cinética con la cual el virus cumple su ciclo. A 12 dpi, se detectaron pocos genes diferencialmente expresados, y ambos programas estadísticos utilizados presentaron medidas discrepantes, evidenciando que el nivel de alteración en la acumulación de transcritos a ese tiempo es relativamente bajo. Este hecho contrasta fuertemente con los datos obtenidos por (W. Zheng et al., 2013), donde observan 267 genes diferencialmente expresados en arroz infectado con RSV (*Phytoreovirus, Reoviridae*) a las 48 hs post infección. Sin embargo, en este experimento las plantas control no fueron picadas por insectos, mientras que las plantas infectadas fueron picadas por cientos de insectos y es bien sabido que alimentación de insectos provoca cambios en la expresión de muchos genes (Thompson & Goggin, 2006). Adicionalmente, los autores no utilizaron réplicas biológicas. Estos hechos podrían indicar que las diferencias observadas por (W. Zheng et al., 2013) se deben principalmente a la respuesta de la planta frente a la picadura del insecto y no a la infección viral.

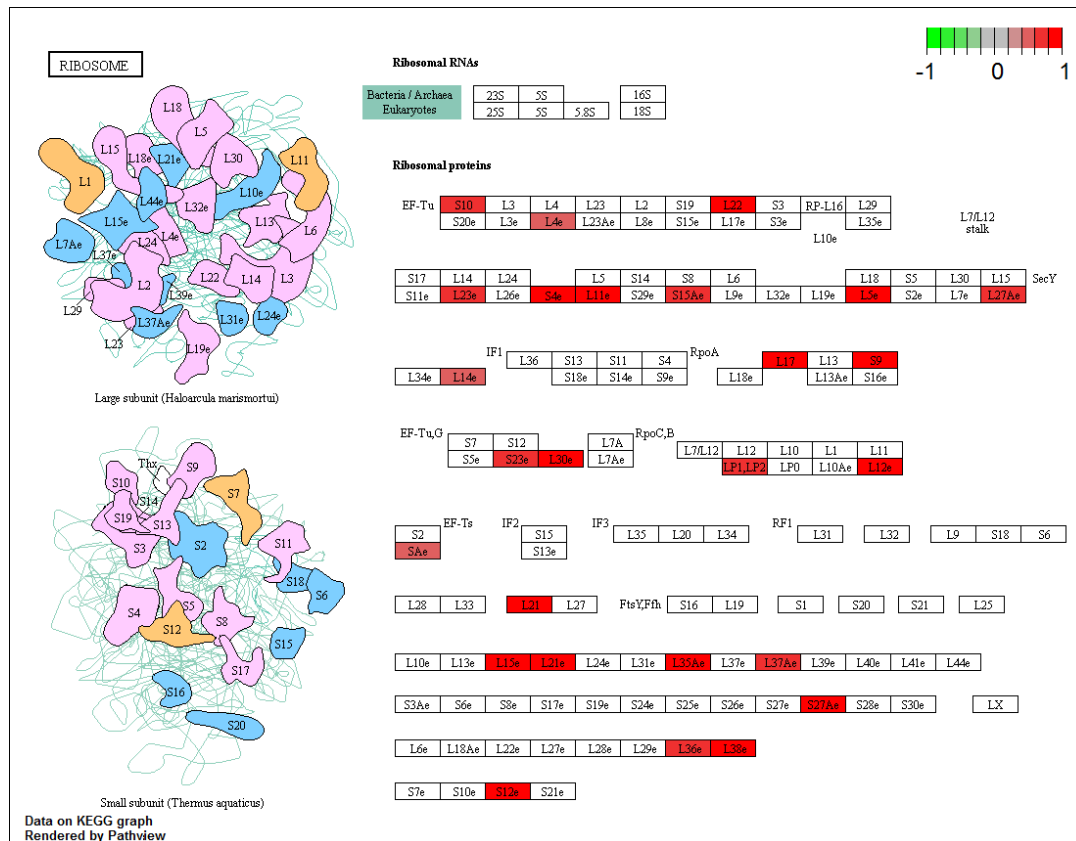
A 21 dpi, por el contrario, se identificó una gran cantidad de genes alterados. Esto indica que a este tiempo ya han ocurrido importantes cambios a nivel celular y fisiológico que tuvieron un impacto sobre el transcriptoma. Estos resultados coinciden parcialmente con los obtenidos por (He et al., 2016), quienes estudiaron el impacto de la infección de arroz con RBSDV a los 30 dpi y obtuvieron 809 genes diferencialmente expresados.

El enriquecimiento funcional de genes alterados mostró varias categorías sobre o sub representadas ante la infección que se encuentran estrechamente relacionadas entre sí. A continuación, se realizará un análisis más profundo de algunas de las categorías que se consideraron biológicamente más interesantes. En ciertos casos, se complementó el estudio utilizando a modo ilustrativo vías metabólicas de tipo KEGG (Kanehisa, Goto, Furumichi, Tanabe, & Hirakawa, 2009). Estas vías están compuestas por una colección de mapas que representan el

conocimiento actual sobre las interacciones moleculares de distintos componentes biológicos tales como metabolitos y enzimas. Para ubicar los transcritos en estos mapas, es necesario que la especie con la que se trabaja cuente con información específica. Dado que no es el caso del trigo, se utilizaron los homólogos de arroz informados por la base de datos *Ensembl Plants* (Kersey et al., 2016) y se realizó el mapeo de genes mediante el programa de R *Pathview* (Luo & Brouwer, 2015).

- Traducción: biogénesis de ribosomas, metabolismo de aminoácidos y expresión de chaperonas

Un gran número de las categorías sobreexpresadas están vinculada a la traducción de proteínas. Dentro de ellas se encuentran genes implicados en la biogénesis de las ribonucleoproteínas que componen el ribosoma (el mapa KEGG mostrando algunos de los genes afectados puede observarse en la Figura 27), cofactores necesarios para el proceso de iniciación o elongación y diversas rutas de biosíntesis de aminoácidos. Si bien existen numerosos reportes de mecanismos por los cuales los virus secuestran la maquinaria traduccional del hospedante (Valiente-Echeverría, Melnychuk, & Moulard, 2012; Walsh, Mathews, & Mohr, 2013; Walsh & Mohr, 2011), pocos estudios transcriptómicos han destacado una marcada inducción de la maquinaria de traducción (Gómez-aix, Pascual, Cañizares, Sánchez-pina, & Aranda, 2016; Hillung et al., 2016; Lu et al., 2012) y en todos los casos se desconoce el mecanismo por el que esto ocurre. Dado que la replicación viral implica la producción de una gran cantidad de proteínas nuevas, es lógico pensar que todas estas vías se encuentren inducidas. En concordancia, se observó un incremento significativo de proteínas totales en plantas infectadas a 21 dpi (Sofía Arellano, Tesis Doctoral en curso).



**Figura 27. Mapa KEGG de los elementos que componen el ribosoma. En rojo se observan los genes sobreexpresados, en verde los subexpresados ante la infección con MRCV a 21 dpi. Se observa un incremento de la expresión de una notable cantidad de genes.**

- Biosíntesis y modificación de ácidos nucleicos

Entre las categorías sobreexpresadas, se encuentran tanto la biosíntesis e interconversión de ácidos nucleicos como dos modificaciones postranscripcionales de RNA: metilación y pseudouridilación (que da como resultado la formación de pseudouridina o  $\Psi$ ). Algunos RNAs virales de cadena simple se pueden plegar en sus extremos para formar estructuras similares a RNAs de transferencia (tRNA) que son capaces de interactuar con la maquinaria de modificación química de tRNAs (Becker, Motorin, Florentz, Giegé, & Grosjean, 1998). Si bien la función que cumplen estas modificaciones no ha sido completamente dilucidada, estudios utilizando técnicas de secuenciación de nueva generación mostraron que la pseudouridina se encuentra presente en una gran cantidad de transcritos celulares, codificantes o no, y que dicha modificación es dinámica (Carlile et al., 2014; Schwartz et al., 2014). Estudios *in vitro* demostraron que incrementos en la cantidad de  $\Psi$  en moléculas de RNA sintéticas aumenta el nivel de expresión de proteínas (Kariko, Muramatsu, Keller, & Weissman, 2012). Finalmente, la pseudouridilación de codones STOP ha demostrado suprimir la terminación de la traducción mediante la incorporación de aminoácidos, expandiendo el código genético (Karijolich & Yu, 2011).

Si bien con los datos actuales no se puede inferir si un incremento en las enzimas modificantes de ácidos nucleicos tiene un efecto sobre RNAs celulares o virales, resulta interesante proponer que cumplen un rol biológico relevante como una nueva capa regulatoria sobre la secuencia primaria. Entre ellos, podrían incrementar la tasa de traducción de mRNAs virales o modificar su estructura secundaria alterando la vida media de los transcriptos (Zhao & He, 2014).

- Desarrollo de pared celular, desarrollo de tejido vascular

Otro grupo de las categorías sobreexpresadas incluye genes relacionados con la biosíntesis de la pared celular y el desarrollo del tejido vascular. Las paredes celulares, además de cumplir múltiples funciones esenciales para el desarrollo y sostén de la planta, también juegan un papel en la prevención de la invasión de patógenos. En primer lugar, actúan como una barrera mecánica impidiendo la progresión de la infección. Adicionalmente, se han reportado diversos procesos de lignificación y engrosamiento de las paredes posteriores a la infección en numerosos sistemas y se los ha vinculado con la restricción del patógeno a una zona definida (Miedes, Vanholme, Boerjan, & Molina, 2014).

En el caso del MRCV y otros fijivirus cuya replicación en plantas está limitada a floema, se han observado alteraciones citopatológicas que incluyen proliferación tumoral de este tejido en el envés de las hojas (enaciones, ver INTRODUCCIÓN GENERAL). Si bien los tumores provocados por bacterias han sido ampliamente estudiados, se conoce poco acerca de los mecanismos que subyacen a los inducidos por infecciones virales (K. Li, Xu, & Zhang, 2011; Shen, Chen, Chen, & Sun, 2016). En general, los tumores vegetales de rápido crecimiento desarrollan distintas redes vasculares (neovascularización) que proporcionan nutrientes y agua para el crecimiento tumoral (Ullrich & Aloni, 2000).

Las alteraciones en los niveles de expresión observados podrían estar relacionadas tanto con el proceso de vascularización y formación del tumor, como con una respuesta de la planta para limitar el movimiento viral. En el caso del RBSDV se ha propuesto que una posible vinculación con el síntoma enanismo podría deberse a cambios en la estructura y la síntesis de la pared celular (Shen et al., 2016). También se ha demostrado que la sobreexpresión de la proteína viral P7-1 en plantas de *Arabidopsis* transgénicas conduce a una esterilidad masculina debido a que las anteras no se abren porque tienen un menor contenido de lignina (F. Sun et al., 2013). Esto es interesante dado que la esterilidad masculina es uno de los síntomas provocados por el MRCV.

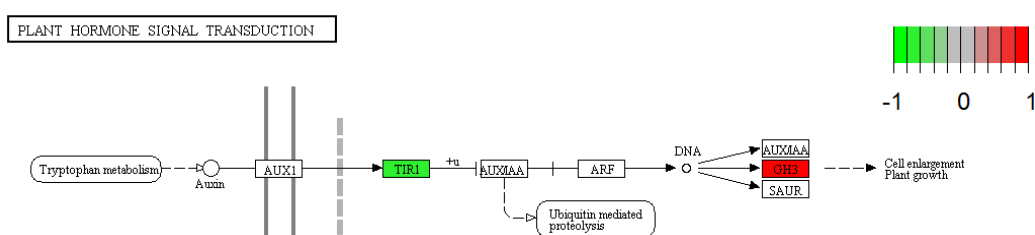
- Metabolismo hormonal

Como ya se mencionó en la INTRODUCCIÓN GENERAL, las redes hormonales se encuentran sumamente interconectadas y desempeñan una función clave en el desarrollo de la planta. El desbalance clásico de SA y JA, modulando la respuesta contra el patógeno invasor, puede



desencadenar grandes alteraciones en otras vías. Se ha propuesto además que algunos patógenos virales de plantas transmitidos por insectos inducen cambios fisiológicos que resultan en que el vector se sienta más atraído por la planta infectada, incrementando la eficiencia de dispersión del patógeno (D. Wu et al., 2017; Zhou et al., 2014).

Dentro de la vía de auxinas, los homólogos de TIR1 y GH3 de arroz, implicados en la percepción y transducción de la señalización de esta hormona, se encuentran alterados (Figura 28). TIR1 es un receptor soluble de auxinas, que modifica su conformación en presencia de la hormona y media la degradación de proteínas AUX/IAA, que en general actúan como represores transcripcionales y desencadenan diversas vías de transducción de respuesta (Dharmasiri, Dharmasiri, & Estelle, 2005). Por su parte, GH3 es una familia multigénica que ha sido vinculada con la respuesta a estrés, modulando los niveles de SA y JA (Yuan et al., 2013). Una disminución de la expresión de TIR1 tiene como muy posible consecuencia una disminución en la percepción de auxinas, mientras que un incremento en la expresión de GH3 puede ser una consecuencia directa de este cambio alterando la interacción con la vía del SA.



**Figura 28.** Mapa KEGG de la vía de percepción de auxinas. En rojo se observan los genes sobreexpresados, en verde los subexpresados ante la infección con MRCV a 21 dpi.

De modo interesante, y en concordancia con la alteración de la vía de auxinas, se ha encontrado que la proteína P2 codificada por el *Phytoreovirus* RDV interactúa de manera directa con la proteína de arroz de la familia AUX/IAA OsIAA10, protegiéndola de degradación (Jin et al., 2016). Plantas sobreexpresantes de OsIAA10 o su mutante resistente a la degradación muestran síntomas típicos de infección con RDV incluyendo enanismo, macollaje excesivo y raíces de atrofiadas. Por el contrario, la infección de RDV en plantas con expresión disminuida de OsIAA10 da lugar a una sintomatología más leve. Estos resultados indicarían que la reprogramación de la señalización por auxinas es necesaria para una infección viral exitosa.

El ácido giberélico (GA) es una enzima conocida por su efecto en la promoción del crecimiento y elongación celular. La revolución verde en arroz, que se basó en la obtención de plantas semienanas que incrementaron la productividad del cultivo a niveles sin precedentes, poseían una mutación deletérea del gen GA 20-oxidasa (Spielmeyer, Ellis, & Chandler, 2002). En plantas infectadas con MRCV, el gen homólogo en trigo (Traes\_1AL\_3A716350F.2, ver (Pearce et al., 2015))

se encuentra subexpresado, lo cual podría explicar al menos en parte el síntoma del enanismo de la enfermedad.

Los brasinoesteroides son una familia de hormonas vegetales esteroideas que actúan como reguladores de crecimiento vegetal en muy bajas cantidades. Recientemente se ha vinculado a esta hormona como clave en la modulación de otros mecanismos que regulan el compromiso antagónico defensa-crecimiento al que se ven sometidos las plantas frente a un patógeno (De Bruyne, Höfte, & De Vleeschauwer, 2014). En MRCV, una de las categorías subexpresadas es “*response to brassinosteroid*”, indicando que la expresión de genes de respuesta a esta hormona se encuentra disminuida. Llamativamente, la infección de arroz con el fijivirus RBSDV induce la vía de producción del JA, que a su vez antagoniza la vía de producción de BRs (He et al., 2016). La aplicación exógena de JA redujo la susceptibilidad de plantas a la infección, mientras que la aplicación de BRs la incrementó, indicando que los BRs regulan negativamente la defensa innata en este sistema. Una reducción en los niveles de expresión de genes de respuesta a BRs frente a la infección con MRCV podría interpretarse como una respuesta de la planta que minimiza el impacto de esta hormona sobre las vías de defensa innatas.

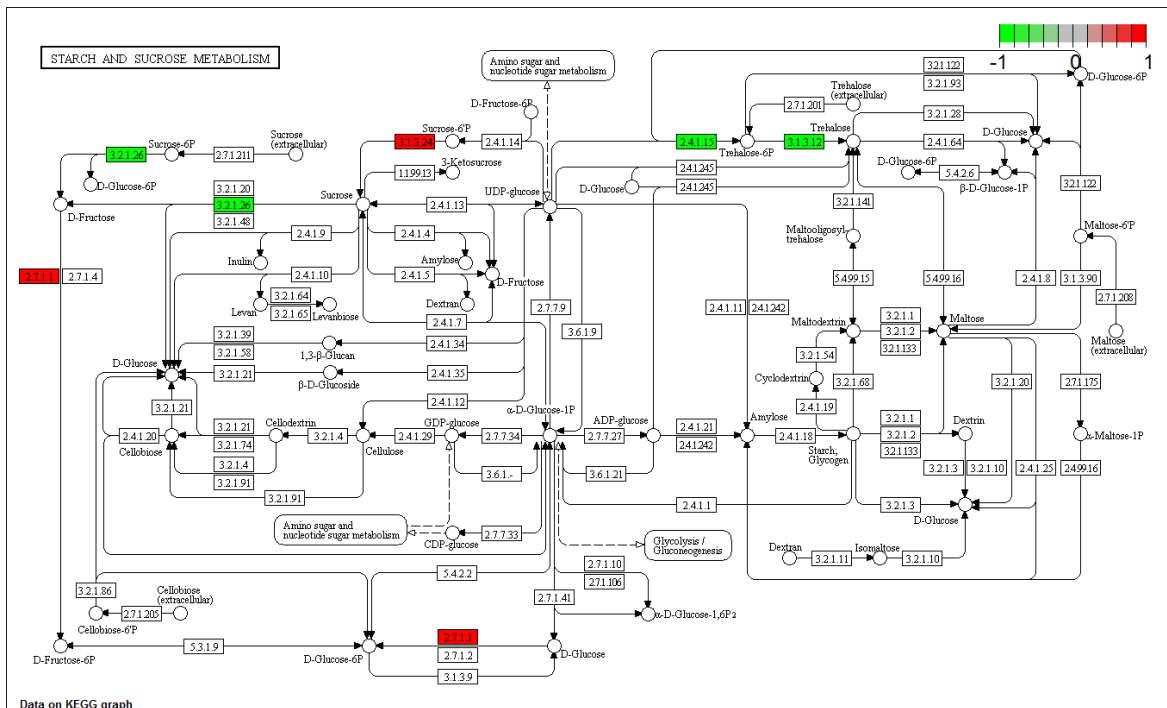
Por todo lo dicho, se desprende que estas profundas alteraciones en la acumulación de transcritos de enzimas involucradas en vías hormonales muy probablemente provocan cambios fisiológicos posiblemente relacionados con la sintomatología provocada por el MRCV (enanismo, acortamiento de entrenudos, pérdida de dominancia apical, etc). Sin embargo, con los datos actuales, no es posible establecer relaciones más específicas entre alteraciones de la expresión de estos genes y la sintomatología. En primer lugar, en un futuro se planea cuantificar los niveles de las distintas hormonas en las mismas muestras que se utilizaron para el RNAseq. Finalmente, se planean realizar estudios funcionales utilizando sistemas de genética reversa para comprender la contribución individual de cada una de las vías que se encuentren efectivamente alteradas en la sintomatología.

- Metabolismo de almidón y azúcares simples

Otra categoría evidentemente subexpresada está vinculada con el metabolismo de hidratos de carbono simples y almidón, generalmente asociados con una función energética. En particular, la categoría *trehalose biosynthetic process* (biosíntesis de trehalosa) resulta particularmente interesante ya que la trehalosa 6-fosfato (Tre6P) es un metabolito de señalización esencial en las plantas, que vincula el crecimiento y el metabolismo del carbono interviniendo en el establecimiento de las relaciones fuente-destino. El modelo que vincula a la sacarosa con la Tre6P postula que esta última actúa como un regulador negativo de los niveles de sacarosa ayudando a mantener la concentración intracelular dentro de un rango óptimo (Carlos María Figueroa & Lunn, 2016; Yadav et al., 2014). Recientemente se demostró que altos niveles de Tre6P causan una

disminución en la concentración de sacarosa mediante la estimulación de la asimilación de nitratos y la síntesis de ácidos orgánicos. De esta manera, los fotoasimilados se utilizarían para generar esqueletos de carbono y fijar nitrógeno para la síntesis de aminoácidos (Carlos M. Figueroa et al., 2016). La Figura 29 muestra cambios en distintas enzimas directamente vinculadas con el metabolismo tanto de trehalosa como de glucosa.

Se ha descrito que muchas proteínas involucradas en la fotosíntesis se encuentran subexpresadas en enaciones de plantas de maíz infectadas con SRBSDV (Shen et al., 2016). Dado que se postula que la mayor parte de la replicación viral ocurre en las enaciones, y que en general este tipo de tumores presentan una concentración de sacarosa anormalmente alta, es tentador especular con que la alteración de la biosíntesis de Tre6P modifica la relación fuente-destino, permitiendo que tejidos que generalmente se comportan como fuente (hojas) reciban mayor cantidad de fotoasimilados. Sin embargo, para evaluar esta hipótesis se deberían llevar a cabo nuevos experimentos aislando distintos tejidos infectados, en particular enaciones.



*Figura 29. Mapa KEGG representando las vías involucradas en el metabolismo de azúcares simples y almidón. En rojo se observan los genes sobreexpresados, en verde los subexpresados. Las alteraciones en las enzimas 2.4.1.15 (T6P sintasa) y 3.1.3.12 (T6P fosfatasa) podrían explicar una disminución en la concentración de trehalosa 6P mientras que los cambios en la expresión de las enzimas 3.1.3.24 (sacarosa 6P hidrolasa) y 3.2.1.26 (sacarosa invertasa) podrían dar lugar a una mayor acumulación de sacarosa ante la infección.*

# CAPÍTULO 3

Determinación del mecanismo  
traduccional del segundo ORF codificado  
por el segmento S5 del MRCV

## Introducción

Los virus son parásitos intracelulares obligados que dependen de las células que infectan para poder realizar su ciclo de replicación. Aunque el tamaño, composición y funciones de las proteínas codificadas por sus genomas son notablemente diversos, todos los virus dependen inexorablemente de la maquinaria de síntesis proteica de la célula hospedante. Al carecer de aparato de traducción propio, la traducción de mRNAs virales requiere del reclutamiento de ribosomas celulares (Walsh et al., 2013). Los virus con genoma compuesto de RNA son muy compactos, siendo los más grandes de alrededor de 30 kb (existen ejemplos en las familias *Coronaviridae* y *Reoviridae*). Por lo tanto, existe una fuerte presión de selección para optimizar la capacidad codificante que ha dado lugar a mecanismos específicos como la utilización de marcos abiertos de lectura superpuestos (A. E. Firth & Brierley, 2012).

Debido a las limitaciones de utilizar una “doble codificación”, los marcos abiertos de lectura superpuestos generalmente son pequeños y muestran un uso atípico de codones que hace difícil su identificación utilizando algoritmos convencionales de búsqueda de genes. El grupo del Dr. Andrew Firth ha desarrollado algoritmos computacionales comparativos para la detección y análisis de este tipo de genes en diversas familias virales (A. E. Firth & Brown, 2006) que han permitido la identificación de un marco abierto de lectura conservado en *Fijivirus* superpuesto al marco mayor en el segmento S5 (A. E. Firth & Atkins, 2009). Adicionalmente, el Dr. Firth postuló que la traducción del segundo ORF del segmento S5 (ORF5-2) ocurriría a partir de un cambio +1 en el marco de lectura producto de un “salto” o “patinaje” del ribosoma (+1 *frameshift*) (A. E. Firth et al., 2012; A. E. Firth & Atkins, 2009) dando lugar a una proteína de fusión P5-1/2. Para el caso del MRCV, dicho cambio ocurriría en una secuencia patinosa o *slippery* “UCU\_UUU\_CG” ubicada en la región superpuesta de ambos *ORFs* entre las posiciones 2419 y 2426 del segmento S5 (Figura 30).

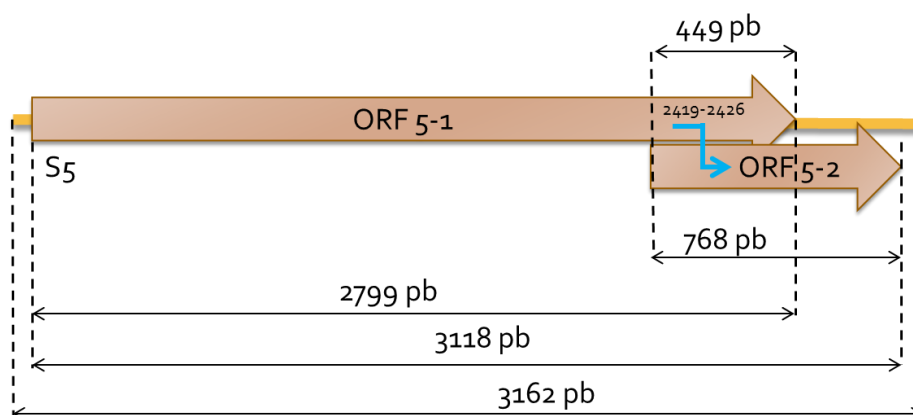


Figura 30. Esquema del segmento S5 del MRCV. Se indican los dos ORFs parcialmente superpuestos y la ubicación de la secuencia "slippery" propuesta con una flecha azul.

El **objetivo general** del capítulo es determinar el mecanismo traduccional del segmento S5 del MRCV. En una primera instancia se decidió evaluar la posibilidad de que los segmentos bicistrónicos del MRCV den lugar a una transcripción subgenómica mediante *Northern blots* específicos contra los extremos 5' y 3' de dichos segmentos. En segundo lugar, se propuso evaluar experimentalmente, la existencia de un *frameshift* por primera vez en *Fijivirus*. Para ello se diseñaron y obtuvieron una serie de construcciones genéticas que incluyen parte del segmento S5 que contiene la secuencia *slippery*, y se realizaron ensayos de transcripción y traducción *in vitro* utilizando extractos de germen de trigo

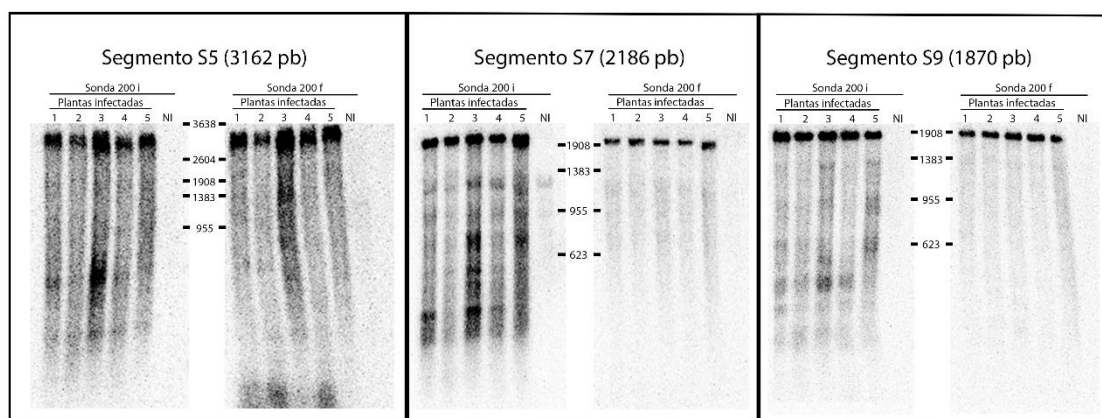
La **hipótesis de trabajo** es que la secuencia "UCU\_UUU\_CG" ubicada en la región superpuesta entre los ORFs 5-1 y 5-2 es una secuencia *slippery* responsable de la traducción del segundo ORF a través de un *frameshift* traduccional +1.

Cabe destacar que parte del trabajo se realizó en el marco de una colaboración establecida con el grupo del Dr. Andrew Firth, en el Departamento de Patología, División de Virología, Universidad de Cambridge, Reino Unido, durante una pasantía de corta duración. Las construcciones genéticas fueron obtenidas en el país, mientras que los experimentos de transcripción y traducción *in vitro* fueron realizados en la Universidad de Cambridge.

## Resultados

### Evaluación de la presencia de mRNAs subgenómicos transcriptos a partir de los segmentos bicistrónicos en el contexto de una infección con MRCV

Un mecanismo muy común que permite la traducción de segmentos policistrónicos virales es la transcripción subgenómica. El MRCV posee 3 segmentos bicistrónicos: S5, S7 y S9. Hasta el momento, dentro de la familia *Reoviridae*, sólo se han encontrado RNAs subgenómicos en partículas defectivas de reovirus aviares (Ni & Kemp, 1994). Sin embargo, se decidió evaluar esta posibilidad para los 3 segmentos bicistrónicos del MRCV mediante *Northern blot*. Para ello, se diseñaron sondas capaces de hibridar con los 200 nt iniciales o finales de cada segmento y se utilizaron para hibridar RNAs de plantas de maíz infectadas a campo (Figura 31).

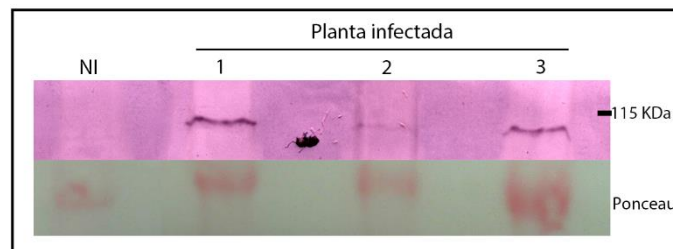


**Figura 31.** Northern blots revelados utilizando sondas que hibridan en los 200 nt iniciales (Sonda 200 i) o finales (Sonda 200 f) de cada segmento bicistrónico del MRCV. De 1 a 5: RNA total extraído de 5 plantas de maíz infectadas con MRCV NI: control no infectado. Se indica la posición de migración de un marcador de PM.

Como se puede observar, en todos los casos se detecta una banda conspicua del tamaño esperado para el mRNA viral completo y que es del mismo tamaño si se utiliza una sonda que hibrida en los extremos 5' o 3' de cada segmento. Asimismo, no se detectan bandas definidas de menor peso molecular características de los mRNAs subgenómicos. Se detecta además hibridación espuria contra los RNAs ribosomales citoplasmáticos, de cloroplastos y mitocondrias que ocurre en las muestras infectadas y control. Asimismo, al comparar la hibridación entre las muestras infectadas y control, se detectó la presencia de degradación parcial de los mRNAs virales que da lugar a un *background* homogéneo en las calles de las muestras infectadas. Por lo tanto se concluye que, al menos dentro de los límites de detección de la técnica y en concordancia con la literatura referida a reovirus, no ocurre transcripción subgenómica a partir de los segmentos bicistrónicos del MRCV.

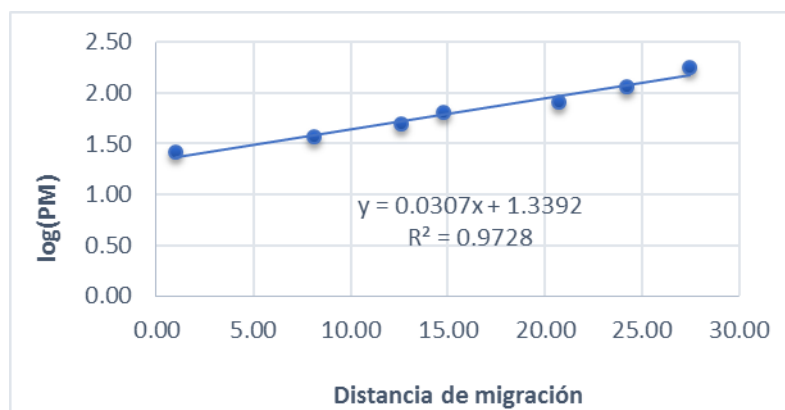
### Identificación de una proteína viral de alto peso molecular consistente con un desplazamiento del marco de lectura en el segmento S5 del MRCV

Fruto de parte de una Tesis Doctoral de un ex integrante del grupo de trabajo, el laboratorio cuenta con un antisuero contra la proteína P5-2 teóricamente codificada por el segundo marco abierto de lectura del segmento S5 expresada en bacterias (G. A. Maroniche, 2011). Cuando se utilizó dicho antisuero para ensayos de *Western blot* contra extractos proteicos de 3 distintas plantas de maíz infectadas a campo con MRCV se observó la presencia de una banda de alta masa molecular aparente que está presente en todos los extractos de plantas infectadas y ausente en el extracto control sin infectar (Figura 32).



**Figura 32.** Western blot utilizando un antisuero contra la proteína P5-2. En las distintas calles se sembraron extractos proteicos de plantas de maíz infectadas con MRCV (calles 1 a 3) o sin infectar (NI: control no infectado). El panel inferior muestra la tinción de las proteínas totales con rojo Ponceau.

Para obtener una estimación más precisa del peso molecular de la banda observada se realizó la interpolación a la curva patrón obtenida a partir del análisis de la migración de un marcador de peso molecular (Figura 33). De esta manera se obtuvo el valor de 116,62 KDa, mientras que el peso molecular esperado para una proteína producto de un cambio de marco en el sitio *slippery* es de 118,6 KDa. Cabe destacar que P5-2 tiene un peso molecular teórico de 28,8 kDa.



**Figura 33.** Curva patrón para la estimación del peso molecular de la banda observada en plantas infectadas con MRCV mediante Western blot utilizando un antisuero contra P5-2



## Diseño y obtención de mutantes del S5 para la evaluación *in vitro* de la existencia de un *frameshift* +1

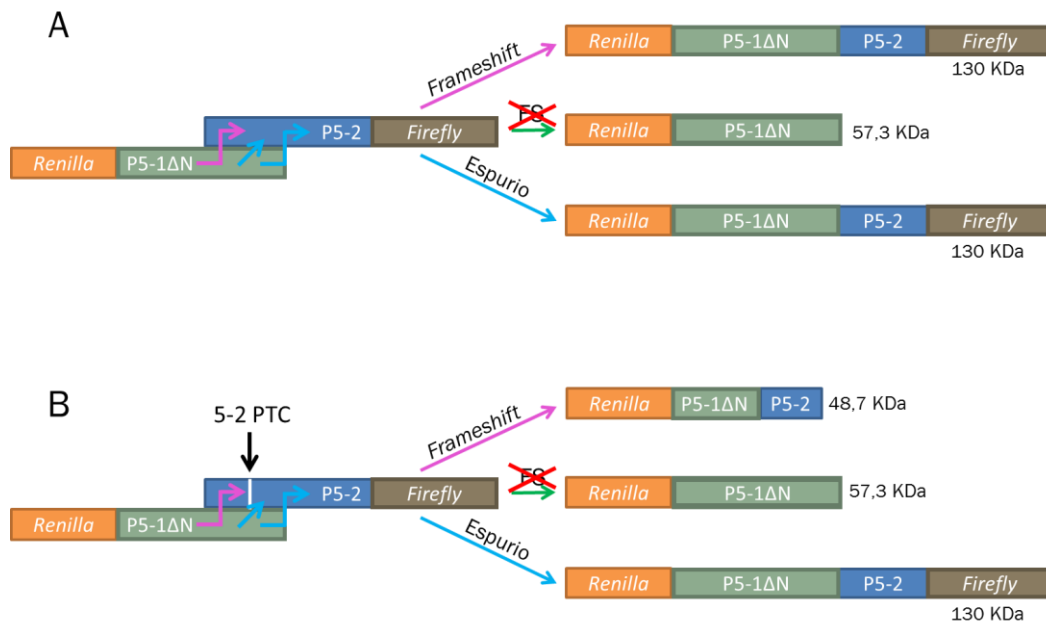
Para determinar experimentalmente la existencia de un *frameshift* para S5 y que el mismo ocurre en el sitio *slippery* de deslizamiento propuesto, se diseñaron una serie de construcciones para su posterior transcripción y traducción *in vitro* teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

- 1) Se utilizaron los vectores pDluc (Fixsen & Howard, 2010) diseñados para clonar una secuencia de interés entre los genes de luciferasa *Renilla* y *Firefly*. Estos vectores permiten la evaluación de eventos de *frameshifting*, ya que, si dentro de la secuencia clonada (en marco con la secuencia ubicada hacia el 5' luciferasa *Renilla*) ocurre un cambio en el marco de lectura, la proteína ríe abajo de la construcción (luciferasa *Firefly*) es efectivamente traducida (Figura 35).
- 2) Se optó por clonar la porción C-terminal de la proteína P5-1 (a partir de la posición 2272 del segmento S5) para disminuir el tamaño del producto final facilitando de esta manera el proceso experimental y su análisis. Por ello la proteína será referida como P5-1ΔN.
- 3) Se construyeron dos mutantes en el sitio *slippery*. La primera de ellas contiene una deleción de una base que da lugar a una fusión constitutiva de los ORFs 5-1 y 5-2 (mutante control en marco o *in-frame control*, *IFC*) y se utiliza como control positivo. La segunda mutante denominada mutante sinónima (o *synonymously mutated sequence*, *SS*) contiene una mutación puntual sinónima que teóricamente disminuye el “patinado” del ribosoma (ver Figura 34 para los detalles de las construcciones).
- 4) Adicionalmente, y sobre las mismas mutaciones previamente descritas, se generó una mutación que produjera un codón *stop* prematuro en el *ORF* 5-2 pocos codones después del sitio *slippery* (mutante de terminación prematura o *premature termination codon*, *PTC*). Esta construcción fue diseñada con el objetivo de disminuir el *background* producto de eventos de *frameshift* o *stop codon readthrough* espurios que podrían ocurrir fuera del sitio *slippery* (ver Figura 35).



Figura 34. Alineamiento de las secuencias de las construcciones obtenidas para su transcripción y traducción *in vitro*. MRCV S5: secuencia wild type. WT 5-2 PTC: secuencia slippery wild type con un codón stop prematuro en el ORF2; IFC 5-2 PTC: secuencia slippery con una deleción puntual in-frame con un codón stop prematuro en el ORF2;

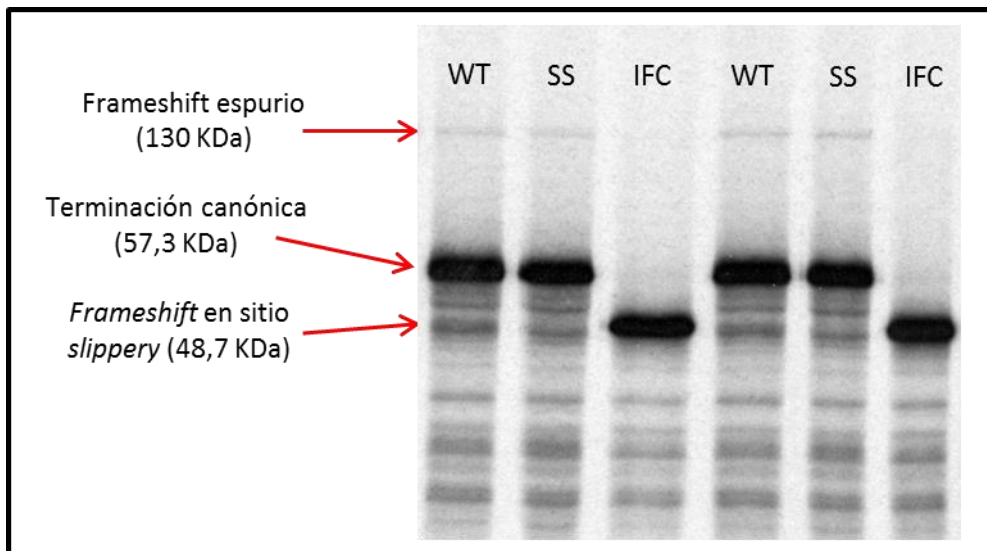
**SS 5-2 PTC: secuencia slippery synonymously mutated con un codón stop prematuro en el ORF2. Se destacan los sitios donde se realizaron mutaciones y el sitio slippery propuesto**



**Figura 35.** Esquema de los productos y los tamaños esperados luego de la traducción de los ORFs contenidos en las construcciones pDluc obtenidas. En el panel A, se indica qué ocurriría sin la mutación 5-2 PTC. En el panel B se indican los productos esperados con la mutación 5-2 PTC. Se observa que gracias a ella los productos del frameshift en la secuencia slippery (flecha rosada) serán teóricamente distinguibles de aquellos que pudieran ocurrir de manera espuria (flechas celestes).

### Transcripción y traducción *in vitro* de las construcciones mutantes

Finalmente, se llevó adelante un protocolo de transcripción y traducción *in vitro* utilizando extractos comerciales de germen de trigo en presencia de metionina L-[<sup>35</sup>S].



**Figura 36.** Autorradiografía de SDS-PAGE de los productos de una traducción *in vitro* de las construcciones mutantes utilizando extractos de germen de trigo en presencia de metionina L-[<sup>35</sup>S]. Se muestran dos series de transcripciones y traducciones independientes de las mismas construcciones.

En la Figura 36 se observa una banda con el tamaño correspondiente al producto esperado para el *frameshift* en el sitio *slippery* que posee gran intensidad en los productos de la traducción de la construcción control (IFC) y se observa más tenuemente en los productos de la traducción de la construcción WT. Dicha banda no se observa en los productos de la mutante SS, por lo que puede concluirse que el *frameshift* efectivamente ocurre y es abolido prácticamente en su totalidad cuando se altera la secuencia *slippery*. Se cuantificaron las bandas de interés en experimentos de traducción independientes, y se determinó que la eficiencia del *frameshift* en el sistema de traducción utilizado es menor al 1% en relación al producto de terminación canónico (n=6) (datos no mostrados).

#### *Evaluación de la posible existencia de un frameshift transcripcional en S5 a partir de la secuenciación de RNAs pequeños virales de plantas e insectos*

Las RNA polimerasas (sean las virales en el contexto de una infección natural o las utilizadas en experimentos de transcripción *in vitro*) cometen muchos errores durante la transcripción. Por ello, existe la posibilidad de que el producto de traducción observado compatible con un *frameshift* traduccional +1 haya sido producido por un deslizamiento de la RNA polimerasa durante la transcripción que genera un INDEL que produzca un corrimiento +1 en el producto proteico final (*transcriptional slippage*). Ya han sido reportados numerosos casos de *frameshift* en proteínas virales que han sido explicados por *transcriptional slippage* (Olsper et al., 2015).

Si bien el sitio *slippage* no presenta las características clásicas de un sitio de donde ocurra *frameshift* transcripcional (A. E. Firth & Atkins, 2009), se decidió evaluar esta posibilidad utilizando los RNAs pequeños de chicharras y de trigos secuenciados en el capítulo 1 que mapearan al S5.

Luego, se evaluó visualmente la presencia de INDELS en el sitio *slippery* (Figura 37) utilizando el software Tablet (Milne et al., 2009).

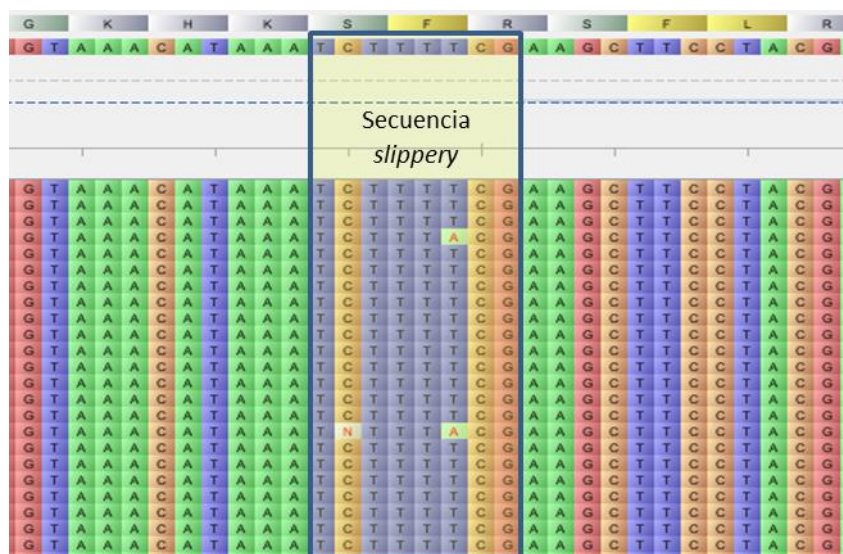


Figura 37. Visualización gráfica de del alineamiento de una parte de los RNAs pequeños virales que se muestran a modo de ejemplo al segmento S5 del MRCV. Se destaca la secuencia correspondiente al sitio slippery.

De un total de 395 lecturas que mapearon sobre el sitio *slippery*, no se detectó ninguna que presente INDELS que podrían explicar el *frameshift* a través de *transcriptional slippage*. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los vsRNAs son una visualización indirecta de los transcritos virales que son producto de diversas vías de procesamiento y amplificación, por lo que no se puede descartar de manera absoluta la existencia de un *frameshift* transcripcional.

## Discusión

El abaratamiento progresivo de los costos de secuenciación permitió el depósito de un gran número de secuencias virales en bases de datos públicas, abriendo las puertas a estudios de genómica comparativa dentro de familias o incluso de especies virales. Los virus de RNA resultan particularmente interesantes dado que poseen un genoma compacto y una elevada frecuencia de mutaciones que permite distinguir regiones donde ocurren mutaciones neutrales de regiones sujetas a selección purificadora (A. E. Firth & Brown, 2006). El desarrollo de algoritmos especialmente diseñados para encontrar patrones atípicos de conservación permitió la identificación de numerosos elementos funcionales sin relación con cambios aminoacídicos en la secuencia codificante que eran previamente indetectables (A. E. Firth, 2014).

En particular, se encontró que las secuencias codificantes solapadas son mucho más frecuentes de lo que se pensaba y son el resultado de la evolución de diversos mecanismos que posibilitan la expresión de esta estructura génica no convencional. Durante la traducción, los ribosomas suelen

mantener un marco de lectura fijo para interpretar la información genética primaria en polipéptidos. Sin embargo, pueden existir señales en *cis* que modifican este proceso y representan una nueva capa de regulación de la expresión génica. La mayor parte de ellas provoca que una fracción de la expresión génica modifique su marco de lectura por una base hacia el 5' (-1) o 3' (+1). Este mecanismo, denominado *programmed ribosomal frameshifting* (PRF) posee como característica la inducción de una pausa del ribosoma, que altera la cinética con la que se regula la apertura de los sitios E, P y A de entrada y salida de los tRNAs en secuencias específicas denominadas *slippery*. Muchos virus poseen PRF como un mecanismo que incrementa el poder codificante a la vez que asegura la síntesis de proteínas esenciales en proporciones correctas (Dinman, 2012).

En el caso de fijivirus, en 2009 se identificaron en el segmento S5 señales que mostraban un elevado nivel de conservación en la posible región solapante entre dos ORFs (ORF5-1 y ORF5-2, (A. E. Firth & Atkins, 2009). Años más tarde, se identificó para el virus de Influenza una secuencia *slippery* "UCC\_UUU\_CGU" ( a E. Firth et al., 2012) muy similar a una secuencia conservada en la región solapada entre los dos ORFs del segmento S5 de fijivirus ("UCU\_UUU\_CG[A/U]"). Sin embargo, hasta este trabajo, no se había demostrado experimentalmente la existencia de frameshift en ningún Reovirus.

El diseño racional de mutantes y experimentos de traducción y transcripción *in vitro* demostraron que 1) efectivamente ocurre un evento de *frameshift*, 2) que la región responsable de este mecanismo es la secuencia conservada "UCU\_UUU\_CGA" y 3) que el *frameshift* sería traduccional y no transcripcional. La eficiencia de este proceso, al menos en el sistema utilizado, es menor al 1%. Sin embargo, se deberían llevar a cabo nuevos experimentos utilizando enzimas reporteras (Ej: luciferasas *firefly* y *renilla*) en células de plantas e insectos para realizar un cálculo más cercano a la realidad biológica.

Existen numerosos ejemplos de proteínas traducidas a través de este mecanismo que han resultado clave en la caracterización funcional de especies virales. Un llamativo ejemplo es el de Influenza A virus, donde una proteína llamada PA codificada por el segmento 3 puede además dar lugar a una proteína de fusión PA-X debido a un *frameshift* traduccional +1. De manera relevante, PA-X posee actividad endonucleolítica contra RNA (Bavagnoli et al., 2015) y modula la infección reduciendo la virulencia (Jagger et al., 2013).

En cuanto a los virus de plantas, se han descrito eventos de *frameshifting* en las familias *Amalgaviridae*, *Closteroviridae*, *Tombusviridae*, *Luteoviridae*, *Potyviridae* y en los géneros *Umbravirus* y *Sobemovirus* (sin familia asignada) (Atkins & Gesteland, 2010; Nibert, Pyle, & Firth, 2016). El ejemplo de la familia *Potyviridae* resulta interesante ya que a este grupo pertenecen aproximadamente el 30% de los virus de plantas que causan grandes pérdidas económicas en todo

el mundo. La proteína llamada PIPO (por *Pretty Interesting Protein*) se expresa como parte de una proteína *frameshift* P3N-PIPO, que es esencial para el movimiento célula-célula. El estudio del mecanismo mostró que el deslizamiento es transcripcional y resulta en una población de transcritos con una "A" adicional dentro de la secuencia GAAAAAA altamente conservada en una frecuencia cercana al ~2% (Olsper et al., 2015). Dentro de la misma familia, en un grupo de virus que infectan batatas, se encontró que la proteína de fusión P1N-PISPO producida también por *frameshift* transcripcional tiene actividad supresora del silenciamiento local (Untiveros et al., 2016).

Otro curioso ejemplo corresponde a la familia *Amalgaviridae*, que es un taxón recientemente reconocido que comprende cuatro especies de virus de plantas. Los amalgavirus tienen genomas de dsRNA pequeño (3427-3437 pb) y aún no se han observado en forma de viriones. En cambio, se transmiten verticalmente a través de semillas y se cree que no poseen transmisión extracelular eficiente. El único segmento genómico posee dos ORFs que se superponen parcialmente y se observa la prevalencia de un motivo "UUU\_CGN" que podría funcionar como un +1 PRF, dando lugar a una RDRp predicha (Nibert et al., 2016).

En cuanto al segmento S5 del MRCV, estudios previos de nuestro grupo de trabajo han caracterizado la localización subcelular de P5-1 y P5-2 expresadas independientemente en células de insecto fusionadas a GFP. Por un lado, se determinó que P5-1 se distribuye en vesículas citoplasmáticas de manera dependiente de un motivo C-terminal TKF. Por su parte P5-2 tiene la capacidad de entrar al núcleo (G. Maroniche et al., 2012). La proteína posee una cola carboxilo terminal (de 15 aa aproximadamente) rica en aminoácidos básicos que podría funcionar como señal de importación al núcleo (Kosugi et al., 2009). De hecho, la fusión P5-2:GFP se distribuye homogéneamente en citoplasma y núcleo, lo que podría deberse a un transporte nuclear menos eficiente debido al bloqueo del extremo C-terminal (G. A. Maroniche, 2011). Adicionalmente, se han demostrado casos en los que la formación de dímeros produce nuevas señales conformacionales para la localización nuclear (Audsley, Jans, & Moseley, 2016). De manera interesante la proteína P5-2 posee un motivo "coliled coil" predicho que podría conducir a una dimerización de esta proteína (V. C. Mongelli, 2010).

Debido a que la proteína de fusión P5-1/2 carecería del motivo TKF C-terminal de P5-1 y poseería tanto los aa básicos de la cola C-terminal de P5-2 como el motivo "coiled-coil" de P5-2, es posible que la distribución vesicular no exista y alternativamente podría poseer capacidad de entrar a núcleo e intervenir en la regulación de genes del hospedante.

Al momento de finalizada esta Tesis, se obtuvo y secuenció una construcción completa emulando un *frameshift* constitutivo. Próximamente se realizarán diversos estudios incluyendo ensayos de localización subcelular de la proteína en protoplastos de arroz y células de insectos, y análisis funcionales para determinar si tiene actividad supresora del silenciamiento o es capaz de

complementar el movimiento en el sistema de PVX defectivo (S. Chapman, Kavanagh, & Baulcombe, 1992).

# CONCLUSIONES GENERALES

- La vía de los piRNAs es activa en *D. kuscheli* pero no participa de manera directa en la respuesta antiviral.
- La respuesta de silenciamiento antiviral en plantas e insectos fue diferente, presentando en plantas *hotspots* de acumulación notoriamente marcados, posiblemente debido a la actividad de RDRs.
- En plantas e insectos se acumulan vsiRNAs de ambas polaridades y distribuidos a lo largo de todos los segmentos genómicos. Por lo tanto, es posible que los sustratos de las proteínas DCL (en plantas) o DCR (en insectos) sean dsRNAs generados a partir de interacciones intra e inter segmentos.
- El nivel de acumulación de cada uno de los segmentos genómicos virales no es directamente responsable del nivel de producción de vsiRNAs.
- El análisis del perfil mutacional de la población viral dentro de cada hospedante permitió evidenciar la presencia de sitios altamente variables que son únicos para cada hospedante y dan lugar mayormente a mutaciones no sinónimas.
- La infección con MRCV produjo un impacto profundo en el perfil transcripcional de trigo a 21 dpi.
- La inducción de genes relacionados con la traducción y la modificación de ácidos nucleicos podrían formar parte de los mecanismos mediante los cuales el MRCV incrementa la biosíntesis de sus componentes.
- La infección viral impacta en las vías de brasinoesteroides y auxinas lo cual podría conducir a la generación de síntomas.



- La infección viral impacta en el metabolismo de azúcares simples lo cual podría causar una mayor disponibilidad de moléculas carbonadas en los tejidos en los que el virus replica.
- El segundo ORF del segmento S5 se traduce a partir de un *frameshift* traduccional que da lugar a una proteína de fusión P5-1/2 con probable localización nuclear.

Lic. Luis A. de Haro  
Tesista

Dra. Mariana del Vas  
Directora

# Referencias

- Acevedo, A., Brodsky, L., & Andino, R. (2014). Mutational and fitness landscapes of an RNA virus revealed through population sequencing. *Nature*, 505(7485), 686–690. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.12.017>. Two-stage
- Akita, F., Higashiura, A., Shimizu, T., Pu, Y., Suzuki, M., Uehara-Ichiki, T., ... Omura, T. (2012). Crystallographic analysis reveals octamerization of viroplasm matrix protein P9-1 of Rice black streaked dwarf virus. *Journal of virology* (Vol. 86). <http://doi.org/10.1128/JVI.00826-11>
- Alazem, M., & Lin, N. S. (2015). Roles of plant hormones in the regulation of host-virus interactions. *Molecular Plant Pathology*, 16(5), 529–540. <http://doi.org/10.1111/mpp.12204>
- Alexa, A., & Rahnenführer, J. (2007). Gene set enrichment analysis with topGO. *Bioconductor Improvments*, pp. 27. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Gene+set+enrichment+analysis+with+topGO#0\nftpr://mirrors.nic.funet.fi/bioconductor.org/2.7/bioc/vignettes/topGO/inst/doc/topGO.pdf>
- Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31(2), 166–169. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
- Argüello, E. B., Maroniche, G. A., Analía, D., Sagadín, M. B., Vas, M. Del, Truol, G., ... Dumo, A. D. (2013). High Viral Load in the Planthopper Vector *Delphacodes kuscheli* ( Hemiptera : Delphacidae ) is Associated With Successful Transmission of Mal de Río Cuarto Virus High Viral Load in the Planthopper Vector *Delphacodes kuscheli* ( Hemiptera : Delphacidae ) is .
- Arneodo, J. D., Guzman, F. A., Conci, L. R., Laguna, I. G., & Truol, G. A. (2002). Transmission features of Mai de Río Cuarto virus in wheat by its planthopper vector *Delphacodes kuscheli*. *Annals of Applied Biology*, 141(2), 195–200. <http://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2002.tb00212.x>
- Arneodo, J. D., Lorenzo, E., Laguna, I. G., Abdala, G., & Truol, G. a. (2002). Cytopathological characterization of Mal de Río Cuarto virus in corn, wheat and barley. *Fitopatologia Brasileira*, 27(3), 298–302. <http://doi.org/10.1590/S0100-41582002000300010>
- Atkins, J. F., & Gesteland, R. F. (2010). Recoding: Expansion of Decoding Rules Enriches Gene Expression, 167–169. <http://doi.org/10.1007/978-0-387-89382-2>
- Audsley, M. D., Jans, D. A., & Moseley, G. W. (2016). Roles of nuclear trafficking in infection by cytoplasmic negative-strand RNA viruses: paramyxoviruses and beyond. *The Journal of General Virology*, 97(10), 2463–2481. <http://doi.org/10.1099/jgv.0.000575>
- Bavagnoli, L., Cucuzza, S., Campanini, G., Rovida, F., Paolucci, S., Baldanti, F., & Maga, G. (2015). The novel influenza A virus protein PA-X and its naturally deleted variant show different enzymatic properties in comparison to the viral endonuclease PA. *Nucleic Acids Research*, 43(19), 9405–9417. <http://doi.org/10.1093/nar/gkv926>
- Becker, H. F., Motorin, Y., Florentz, C., Giegé, R., & Grosjean, H. (1998). Pseudouridine and ribothymidine formation in the tRNA-like domain of turnip yellow mosaic virus RNA. *Nucleic Acids Research*, 26(17), 3991–7. <http://doi.org/gk640> [pii]
- Bonamico, N. C., Balzarini, M. G., Arroyo, A. T., Ibañez, M. A., Díaz, D. G., Salerno, J. C., & Di Renzo, M. A. (2010). Association between microsatellites and resistance to Mal de Río Cuarto in maize by discriminant analysis. *Phyton*, 79(1), 31–38. Retrieved from <http://www.scielo.org.ar/pdf/phyton/v79n1/v79n1a06.pdf>
- Bonamico, N. C., Di Renzo, M. a., Ibañez, M. a., Borghi, M. L., Díaz, D. G., Salerno, J. C., & Balzarini, M. G. (2012). QTL analysis of resistance to Mal de Río Cuarto disease in maize using recombinant inbred lines. *The Journal of Agricultural Science*, 150(05), 619–629. <http://doi.org/10.1017/S0021859611000943>

- Boyce, M., McCrae, M. A., Boyce, P., & Kim, J. T. (2016). Inter-segment complementarity in orbiviruses: a driver for co-ordinated genome packaging in the Reoviridae? *The Journal of General Virology*, 97(5), 1145–1157. <http://doi.org/10.1099/jgv.0.000400>
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y. Y., Sieburth, L., & Voinnet, O. (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5880), 1185–1190. <http://doi.org/10.1126/science.1159151>
- Bronkhorst, A. W., & Van Rij, R. P. (2014). The long and short of antiviral defense: Small RNA-based immunity in insects. *Current Opinion in Virology*. <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.03.010>
- Buffalo, V. (2014). Scythe - A 3'-end adapter contaminant trimmer. Retrieved from <https://github.com/vsbuffalo/scythe>
- Busby, M. A., Stewart, C., Miller, C. A., Grzeda, K. R., & Marth, G. T. (2013). Scotty: A web tool for designing RNA-Seq experiments to measure differential gene expression. *Bioinformatics*, 29(5), 656–657. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt015>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., ... Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. <http://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Carlile, T. M., Rojas-Duran, M. F., Zinshteyn, B., Shin, H., Bartoli, K. M., & Gilbert, W. V. (2014). Pseudouridine profiling reveals regulated mRNA pseudouridylation in yeast and human cells. *Nature*, 515(7525), 143–146. <http://doi.org/10.1038/nature13802>
- Chapman, E. J., & Carrington, J. C. (2007). Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature Reviews. Genetics*, 8(11), 884–896. <http://doi.org/10.1038/nrg2179>
- Chapman, S., Kavanagh, T., & Baulcombe, D. (1992). Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 2(4), 549–557. <http://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1992.t01-24-00999.x>
- Chen, C. C., Hsu, Y. H., Chen, M. J., & Chiu, R. J. (1989). Comparison of proteins and nucleic acids of Echinochloa ragged stunt and rice ragged stunt viruses. *Intervirology*, 30(5), 278–284.
- Chen, Q., Lu, L., Hua, H., Zhou, F., Lu, L., & Lin, Y. (2012). Characterization and comparative analysis of small RNAs in three small RNA libraries of the brown planthopper (*Nilaparvata lugens*). *PloS One*, 7(3), e32860. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0032860>
- Cheng, R.-L., Xi, Y., Lou, Y.-H., Wang, Z., Xu, J.-Y., Xu, H.-J., & Zhang, C.-X. (2014). Brown planthopper nudivirus DNA integrated in its host genome. *Journal of Virology*, 88(10), 5310–8. <http://doi.org/10.1128/JVI.03166-13>
- Czech, B., & Hannon, G. J. (2016). One Loop to Rule Them All: The Ping-Pong Cycle and piRNA-Guided Silencing. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(4), 324–337. <http://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.008>
- De Bruyne, L., Höfte, M., & De Vleeschauwer, D. (2014). Connecting growth and defense: The emerging roles of brassinosteroids and gibberellins in plant innate immunity. *Molecular Plant*, 7(6), 943–959. <http://doi.org/10.1093/mp/ssu050>
- del V. Di Feo, L., Laguna, I. G., & Biderbost, E. B. (2010). Alteraciones fisiológicas asociadas a la infección con Mal de Río Cuarto virus (MRCV) y a fitotoxicidad provocada por su insecto vector (*Delphacodes kuscheli* Fennah) en trigo. *Tropical Plant Pathology*, 35(2), 79–87. <http://doi.org/10.1590/S1982-56762010000200002>
- Denancé, N. (2013). Disease resistance or growth : the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs, 4(May), 1–12. <http://doi.org/10.3389/fpls.2013.00155>
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., & Estelle, M. (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435(7041), 441–5. <http://doi.org/10.1038/nature03543>
- Di Rienzo, J. A. (2009). fgStatistics, version 2009. Available from: <Http://sites.google.com/site/fgstatistics>.

- Dinman, J. D. (2012). Mechanisms and implications of programmed translational frameshifting. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 3(5), 661–73. <http://doi.org/10.1002/wrna.1126>
- Distéfano, A. J. (2004). *Caracterización molecular del Mal de Río Cuarto virus (MRCV) del maíz: estudio de los segmentos genómicos S1-S6, S8 y S10 y de las proteínas codificadas por los mismos*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN), Universidad de Buenos Aires.
- Distéfano, A. J., Conci, L. R., Hidalgo, M. M., Guzmán, F. A., Hopp, H. E., & Del Vas, M. (2002). Sequence analysis of genome segments S4 and S8 of Mal de Río Cuarto virus (MRCV): Evidence that the virus should be a separate Fijivirus species. *Archives of Virology*, 147(9), 1699–1709. <http://doi.org/10.1007/s00705-002-0840-4>
- Distéfano, A. J., Conci, L. R., Hidalgo, M. M., Guzmán, F. A., Hopp, H. E., del Vas, M., ... del Vas, M. (2002). Sequence analysis of genome segments S4 and S8 of Mal de Río Cuarto virus (MRCV): Evidence that the virus should be a separate Fijivirus species. *Archives of Virology*, 147(9), 1699–1709. <http://doi.org/10.1007/s00705-002-0840-4>
- Distéfano, A. J., Conci, L. R., Muñoz Hidalgo, M., Guzmán, F. A., Hopp, H. E., & Del Vas, M. (2003). Sequence and phylogenetic analysis of genome segments S1, S2, S3 and S6 of Mal de Río Cuarto virus, a newly accepted Fijivirus species. *Virus Research*, 92(1), 113–121. [http://doi.org/10.1016/S0168-1702\(02\)00325-8](http://doi.org/10.1016/S0168-1702(02)00325-8)
- Distéfano, A. J., Hopp, H. E., & del Vas, M. (2005). Sequence analysis of genome segments S5 and S10 of Mal de Río Cuarto virus (Fijivirus, Reoviridae). *Archives of Virology*, 150(6), 1241–8. <http://doi.org/10.1007/s00705-004-0477-6>
- Distéfano, A. J., Maldonado, S., Hopp, H. E., & Del Vas, M. (2009). Mal de Río Cuarto virus (MRCV) genomic segment S3 codes for the major core capsid protein. *Virus Genes*, 38(3), 455–60. <http://doi.org/10.1007/s11262-009-0345-2>
- Drezen, J.-M., Gauthier, J., Josse, T., Bézier, A., Herniou, E., & Huguet, E. (2016). Foreign DNA acquisition by invertebrate genomes. *Journal of Invertebrate Pathology*. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2016.09.004>
- Dunoyer, P., Brosnan, C. A., Schott, G., Wang, Y., Jay, F., Alioua, A., ... Voinnet, O. (2010). An endogenous, systemic RNAi pathway in plants. *The EMBO Journal*, 29(10), 1699–1712. <http://doi.org/10.1038/emboj.2010.65>
- Dunoyer, P., Schott, G., Humber, C., Meyer, D., Takeda, A., Carrington, J. C., & Voinnet, O. (2010). Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5980), 912–916. <http://doi.org/10.1126/science.1185880>
- Elena, S. F., Agudelo-Romero, P., & Lalić, J. (2009). The Evolution of Viruses in Multi-Host Fitness Landscapes. *The Open Virology Journal*, 3, 1–6. <http://doi.org/10.2174/1874357900903010001>
- Fajardo, T. J., AlShaikhahmed, K., & Roy, P. (2016). Generation of infectious RNA complexes in Orbiviruses: RNA-RNA interactions of genomic segments. *Oncotarget*, 7(45). <http://doi.org/10.18632/oncotarget.12496>
- Fajardo, T., Sung, P. Y., & Roy, P. (2015). Disruption of Specific RNA-RNA Interactions in a Double-Stranded RNA Virus Inhibits Genome Packaging and Virus Infectivity. *PLoS Pathogens*, 11(12). <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005321>
- Figueroa, C. M., Feil, R., Ishihara, H., Watanabe, M., Kölling, K., Krause, U., ... Lunn, J. E. (2016). Trehalose 6-phosphate coordinates organic and amino acid metabolism with carbon availability. *Plant Journal*, 85(3), 410–423. <http://doi.org/10.1111/tpj.13114>
- Figueroa, C. M., & Lunn, J. E. (2016). A tale of two sugars - trehalose 6-phosphate and sucrose. *Plant Physiology*, 172(September), pp.00417.2016. <http://doi.org/10.1104/pp.16.00417>
- Firth, a E., Jagger, B. W., Wise, H. M., Nelson, C. C., Parsawar, K., Wills, N. M., ... Atkins, J. F. (2012). Ribosomal frameshifting used in influenza A virus expression occurs within the sequence UCC\_UUU\_CGU and is in the +1 direction. *Open Biology*, 2(10), 120109. <http://doi.org/10.1098/rsob.120109>

- Firth, A. E. (2014). Mapping overlapping functional elements embedded within the protein-coding regions of RNA viruses. *Nucleic Acids Research*, 42(20), 12425–12439. <http://doi.org/10.1093/nar/gku981>
- Firth, A. E., & Atkins, J. F. (2009). Analysis of the coding potential of the partially overlapping 3' ORF in segment 5 of the plant fijiviruses. *Virology Journal*, 6, 32. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-6-32>
- Firth, A. E., & Brierley, I. (2012). Non-canonical translation in RNA viruses. *The Journal of General Virology*, 93(Pt 7), 1385–409. <http://doi.org/10.1099/vir.0.042499-0>
- Firth, A. E., & Brown, C. M. (2006). Detecting overlapping coding sequences in virus genomes. *BMC Bioinformatics*, 7(1), 75. <http://doi.org/10.1186/1471-2105-7-75>
- Fixsen, S. M., & Howard, M. T. (2010). Processive selenocysteine incorporation during synthesis of eukaryotic selenoproteins. *Journal of Molecular Biology*, 399(3), 385–396. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.04.033>
- Galiana-Arnoux, D., Dostert, C., Schneemann, A., Hoffmann, J. a, & Imler, J.-L. (2006). Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in drosophila. *Nature Immunology*, 7(6), 590–7. <http://doi.org/10.1038/ni1335>
- Gammon, D. B., & Mello, C. C. (2015). RNA interference-mediated antiviral defense in insects. *Current Opinion in Insect Science*, 8, 111–120. <http://doi.org/10.1016/j.cois.2015.01.006>
- Giménez Pecci, M.P. Laguna, I. G., Dagoberto, E., Truol, G., Conci, L. R., Ferrer, F., & Ornaghi, J. A. (1997). Cebada (*Hordeum vulgare* L.) , un nuevo hospedante natural del virus del Mal de Río Cuarto (MRCV) en Argentina. In *Revista Argentina de Microbiología*. Pergamino, Argentina.
- Godge, M. R., Purkayastha, A., Dasgupta, I., & Kumar, P. P. (2008). Virus-induced gene silencing for functional analysis of selected genes. *Plant Cell Reports*. <http://doi.org/10.1007/s00299-007-0460-2>
- Goic, B., Vodovar, N., Mondotte, J. a, Monot, C., Frangeul, L., Blanc, H., ... Saleh, M.-C. (2013). RNA-mediated interference and reverse transcription control the persistence of RNA viruses in the insect model *Drosophila*. *Nature Immunology*, 14(4), 396–403. <http://doi.org/10.1038/ni.2542>
- Gómez-aix, C., Pascual, L., Cañizares, J., Sánchez-pina, M. A., & Aranda, M. A. (2016). Transcriptomic profiling of Melon necrotic spot virus -infected melon plants revealed virus strain and plant cultivar-specific alterations. *BMC Genomics*, 1–17. <http://doi.org/10.1186/s12864-016-2772-5>
- Gridley, C. L., & Patton, J. T. (2014). Regulation of rotavirus polymerase activity by inner capsid proteins. *Current Opinion in Virology*, 9, 31–38. <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.08.008>
- Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neubock, R., & Hofacker, I. L. (2008). The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue). <http://doi.org/10.1093/nar/gkn188>
- Guo, H., Song, X., Xie, C., Huo, Y., Zhang, F., Chen, X., ... Fang, R. (2013). Rice yellow stunt rhabdovirus protein 6 suppresses systemic RNA silencing by blocking RDR6-mediated secondary siRNA synthesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 26(8), 927–36. <http://doi.org/10.1094/MPMI-02-13-0040-R>
- Guzmán, F. A., Arneodo, J. D., Saavedra Pons, A. B., Truol, G. A., Luque, A. V, & Conci, L. R. (2010). Immunodetection and subcellular localization of Mal de Río Cuarto virus P9-1 protein in infected plant and insect host cells. *Virus Genes*, 41(1), 111–117. <http://doi.org/10.1007/s11262-010-0480-9>
- Guzmán, F. A., Distéfano, A. J., Arneodo, J. D., Hopp, H. E., Lenardon, S. L., del Vas, M., & Conci, L. R. (2007). Sequencing of the bicistronic genome segments S7 and S9 of Mal de Río Cuarto virus (Fijivirus, Reoviridae) completes the genome of this virus. *Archives of Virology*, 152(3), 565–73. <http://doi.org/10.1007/s00705-006-0864-2>
- Halic, M., & Moazed, D. (2009). Transposon Silencing by piRNAs. *Cell*, 138(6), 1058–1060. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.030>
- Harding, R. M., Burns, P., Geijskes, R. J., McQualter, R. M., Dale, J. L., & Smith, G. R. (2006). Molecular analysis of Fiji disease virus segments 2, 4 and 7 completes the genome sequence. *Virus Genes*,

32(1), 43–47. <http://doi.org/10.1007/s11262-006-5844-x>

- Havecker, E. R., Wallbridge, L. M., Hardcastle, T. J., Bush, M. S., Kelly, K. A., Dunn, R. M., ... Baulcombe, D. C. (2010). The Arabidopsis RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *The Plant Cell*, 22(2), 321–34. <http://doi.org/10.1105/tpc.109.072199>
- He, Y., Zhang, H., Sun, Z., Li, J., Hong, G., Zhu, Q., ... Chen, J. (2016). Jasmonic acid-mediated defense suppresses brassinosteroid-mediated susceptibility to *Rice black streaked dwarf virus* infection in rice. *New Phytologist*, 1. <http://doi.org/10.1111/nph.14376>
- Heckman, K. L., & Pease, L. R. (2007). Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nature Protocols*, 2(4), 924–932. <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.132>
- Henderson, I. R., Zhang, X., Lu, C., Johnson, L., Meyers, B. C., Green, P. J., & Jacobsen, S. E. (2006). Dissecting Arabidopsis thaliana DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nat Genet*, 38. <http://doi.org/10.1038/ng1804>
- Herranz, M. C., Navarro, J. A., Sommen, E., & Pallas, V. (2015). Comparative analysis among the small RNA populations of source, sink and conductive tissues in two different plant-virus pathosystems. *BMC Genomics*, 16(1), 117. <http://doi.org/10.1186/s12864-015-1327-5>
- Hess, A. M., Prasad, A. N., Ptitsyn, A., Ebel, G. D., Olson, K. E., Barbacioru, C., ... Campbell, C. L. (2011). Small RNA profiling of Dengue virus-mosquito interactions implicates the PIWI RNA pathway in anti-viral defense. *BMC Microbiology*, 11(1), 45. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-11-45>
- Hillung, J., García-García, F., Dopazo, J., Cuevas, J. M., & Elena, S. F. (2016). The transcriptomics of an experimentally evolved plant-virus interaction. *Scientific Reports*, 6(October 2015), 24901. <http://doi.org/10.1038/srep24901>
- Hirumi, H., Granados, R. R., & Maramorosch, K. (1967). Electron microscopy of a plant-pathogenic virus in the nervous system of its insect vector. *Journal of Virology*, 1(2), 430–444.
- Hong, W., Qian, D., Sun, R., Jiang, L., Wang, Y., Wei, C., ... Li, Y. (2015). OsRDR6 plays role in host defense against double-stranded RNA virus, Rice Dwarf Phytoreovirus. *Scientific Reports*, 5, 11324. <http://doi.org/10.1038/srep11324>
- Isogai, M., Uyeda, I., & Lee, B. C. (1998). Detection and assignment of proteins encoded by rice black streaked dwarf fijivirus S7, S8, S9 and S10. *The Journal of General Virology*, 79 ( Pt 6), 1487–1494. <http://doi.org/10.1099/0022-1317-79-6-1487>
- Jagger, B. W., Wise, H. M., Kash, J. C., Walters, K., Wills, N. M., & Xiao, Y. (2013). An Overlapping Protein-Coding Region In Influenza A Virus Segment 3 Modulates the Host Response, 337(6091), 199–204. <http://doi.org/10.1126/science.1222213>
- Jin, L., Qin, Q., Wang, Y., Pu, Y., Liu, L., Wen, X., ... Li, Y. (2016). Rice Dwarf Virus P2 Protein Hijacks Auxin Signaling by Directly Targeting the Rice OsIAA10 Protein, Enhancing Viral Infection and Disease Development. *PLoS Pathogens*, 12(9), 1–23. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005847>
- Joshi, N., & Fass, J. (2011). Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33) [Software]. Available at <https://github.com/najoshi/sickle>, 2011.
- Kanehisa, M., Goto, S., Furumichi, M., Tanabe, M., & Hirakawa, M. (2009). KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. *Nucleic Acids Research*, 38(SUPPL.1). <http://doi.org/10.1093/nar/gkp896>
- Karijovich, J., & Yu, Y.-T. (2011). Converting nonsense codons into sense codons by targeted pseudouridylation. *Nature*, 474(7351), 395–398. <http://doi.org/10.1038/nature10165>
- Kariko, K., Muramatsu, H., Keller, J. M., & Weissman, D. (2012). Increased erythropoiesis in mice injected with submicrogram quantities of pseudouridine-containing mRNA encoding erythropoietin. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 20(5), 948–953. <http://doi.org/10.1038/mt.2012.7>
- Kersey, P. J., Allen, J. E., Armean, I., Boddu, S., Bolt, B. J., Carvalho-Silva, D., ... Staines, D. M. (2016). Ensembl Genomes 2016: more genomes, more complexity. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D574–

- D580. <http://doi.org/10.1093/nar/gkv1209>
- Kieft, J. S. (2008). Viral IRES RNA structures and ribosome interactions. *Trends in Biochemical Sciences*. <http://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.04.007>
- Kim, W.-S., & Haj-Ahmad, Y. (n.d.). Evaluation of Plant RNA Integrity Number (RIN) generated using an Agilent BioAnalyzer 2100.
- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carsten, E. B., & Lefkowitz, E. J. (2012). *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Kosugi, S., Hasebe, M., Matsumura, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M., & Yanagawa, H. (2009). Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. *Journal of Biological Chemistry*, 284(1), 478–485. <http://doi.org/10.1074/jbc.M807017200>
- Koutmou, K. S., Schuller, A. P., Brunelle, J. L., Radhakrishnan, A., Djuranovic, S., & Green, R. (2015). Ribosomes slide on lysine-encoding homopolymeric A stretches. *eLife*, 2015(4), 1–18. <http://doi.org/10.7554/eLife.05534>
- Krasileva, K. V., Vasquez-Gross, H. A., Howell, T., Bailey, P., Paraiso, F., Clissold, L., ... Dubcovsky, J. (2017). Uncovering hidden variation in polyploid wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201619268. <http://doi.org/10.1073/pnas.1619268114>
- Krasileva, K. V., Buffalo, V., Bailey, P., Pearce, S., Ayling, S., Tabbita, F., ... Dubcovsky, J. (2013). Separating homeologs by phasing in the tetraploid wheat transcriptome. *Genome Biology*, 14(6), R66. <http://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-r66>
- Kutnjak, D., Rugar, M., Gutierrez-Aguirre, I., Curk, T., Kreuze, J. F., & Ravnikar, M. (2015). Deep sequencing of virus derived small interfering RNAs and RNA from viral particles shows highly similar mutational landscape of a plant virus population. *Journal of Virology*, 89(9), 4760–4769. <http://doi.org/10.1128/JVI.03685-14>
- Laguna, I. G., Giménez Pecci, M. P., Herrera, P. S., Borgogno, C., Ornaghi, J. A., & Rodriguez Pardina, P. (2000). Rol de los cereales en la epidemiología del virus del Mal de Río Cuarto en Argentina. *Fitopatología Brasileira*, 35, 41–49.
- Laguna, I. G., Remes Lenicov, A. M. M. de, Virla, E. G., Avila, A. O., Giménez Pecci, M. P., Herrera, P., ... Mariani, R. (2002). Diffusion of Mal de Rio Cuarto virus (MRCV) of maize, its vector, associated planthoppers and alternative hosts in Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 61(1/2), 87–97.
- Lan, H., Chen, H., Liu, Y., Jiang, C., Mao, Q., Jia, D., ... Wei, T. (2016). Small Interfering RNA Pathway Modulates Initial Viral Infection in Midgut Epithelium of Insect after Ingestion of Virus. *Journal of Virology*, 90(2), 917–929. <http://doi.org/10.1128/JVI.01835-15>
- Lan, H., Wang, H., Chen, Q., Chen, H., Jia, D., Mao, Q., & Wei, T. (2016). Small interfering RNA pathway modulates persistent infection of a plant virus in its insect vector. *Scientific Reports*, 6(October 2015), 20699. <http://doi.org/10.1038/srep20699>
- Léger, P., Lara, E., Jagla, B., Sismeiro, O., Mansuroglu, Z., Coppée, J. Y., ... Bouloy, M. (2012). Dicer-2 and Piwi Mediated Rna Interference in Rift Valley Fever Virus Infected Mosquito Cells. *Journal of Virology*, (November). <http://doi.org/10.1128/JVI.02795-12>
- Lenardon, S. L., March, G. J., Nome, S. F., & Ornaghi, J. a. (1998). Recent Outbreak of “Mal de Rio Cuarto” Virus on Corn in Argentina. *Plant Disease*, 82(4), 448–448. <http://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.4.448C>
- Li, C. X., Shi, M., Tian, J. H., Lin, X. D., Kang, Y. J., Chen, L. J., ... Zhang, Y. Z. (2015). Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. *eLife*, 4. <http://doi.org/10.7554/eLife.05378>
- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754–1760. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- Li, J., Andika, I. B., Shen, J., Lv, Y., Ji, Y., Sun, L., & Chen, J. (2013). Characterization of Rice Black-Streaked

- Dwarf Virus- and Rice Stripe Virus-Derived siRNAs in Singly and Doubly Infected Insect Vector *Laodelphax striatellus*. *PLoS One*, 8(6), e66007. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0066007>
- Li, J., Andika, I. B., Zhou, Y., Shen, J., Sun, Z., Wang, X., ... Chen, J. (2014). Unusual characteristics of dicistrovirus-derived small RNAs in the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*. *Journal of General Virology*, 95(PART3), 712–718. <http://doi.org/10.1099/vir.0.059626-0>
- Li, J., Xue, J., Zhang, H.-M., Yang, J., Lv, M.-F., Xie, L., ... Chen, J.-P. (2013). Interactions between the P6 and P5-1 proteins of southern rice black-streaked dwarf fijivirus in yeast and plant cells. *Archives of Virology*, 158(8), 1649–1659. <http://doi.org/10.1007/s00705-013-1660-4>
- Li, J., Xue, J., Zhang, H.-M., Yang, J., Xie, L., & Chen, J.-P. (2015). Characterization of homologous and heterologous interactions between viroplasm proteins P6 and P9-1 of the fijivirus southern rice black-streaked dwarf virus. *Archives of Virology*, 160(2), 453–457. <http://doi.org/10.1007/s00705-014-2268-z>
- Li, K., Xu, C., & Zhang, J. (2011). Proteome profile of maize (*Zea Mays* L.) leaf tissue at the flowering stage after long-term adjustment to rice black-streaked dwarf virus infection. *Gene*, 485(2), 106–113. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2011.06.016>
- Liu, B., Chen, Z., Song, X., Liu, C., Cui, X., Zhao, X., ... Cao, X. (2007). *Oryza sativa* dicer-like4 reveals a key role for small interfering RNA silencing in plant development. *The Plant Cell*, 19(9), 2705–18. <http://doi.org/10.1105/tpc.107.052209>
- Liu, H., Fu, Y., Jiang, D., Li, G., Xie, J., Cheng, J., ... Yi, X. (2010). Widespread horizontal gene transfer from double-stranded RNA viruses to eukaryotic nuclear genomes. *Journal of Virology*, 84(22), 11876–87. <http://doi.org/10.1128/JVI.00955-10>
- Liu, H., Wei, C., Zhong, Y., & Li, Y. (2007). Rice black-streaked dwarf virus minor core protein P8 is a nuclear dimeric protein and represses transcription in tobacco protoplasts. *FEBS Letters*, 581(13), 2534–2540. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.071>
- Liu, Y., Jia, D., Chen, H., Chen, Q., Xie, L., Wu, Z., & Wei, T. (2011). The P7-1 protein of southern rice black-streaked dwarf virus, a fijivirus, induces the formation of tubular structures in insect cells. *Archives of Virology*, 156(10), 1729–1736. <http://doi.org/10.1007/s00705-011-1041-9>
- Liu, Y., Zhou, J., & White, K. P. (2014). RNA-seq differential expression studies: More sequence or more replication? *Bioinformatics*, 30(3), 301–304. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt688>
- Llauger, G. (2015). *Estudio de la interacción hospedante-patógeno entre plantas y el virus de Mal de Río Cuarto (MRCV)*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, University of Buenos Aires (UBA).
- Llauger, G., de Haro, L. A., Alfonso, V., & del Vas, M. (2017). Interaction of Mal de Río Cuarto virus (Fijivirus genus) proteins and identification of putative factors determining viroplasm formation and decay. *Virus Research*, 230, 19–28. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.01.002>
- Llave, C., Kasschau, K. D., Rector, M. A., & Carrington, J. C. (2002). Endogenous and Silencing-Associated Small RNAs in Plants. *The Plant Cell*, 14(7), 1605–1619. <http://doi.org/10.1105/tpc.003210>
- Lourenco, S., & Roy, P. (2011). In vitro reconstitution of Bluetongue virus infectious cores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(33), 13746–51. <http://doi.org/10.1073/pnas.1108667108>
- Love, M. I., Anders, S., & Huber, W. (2014). *Differential analysis of count data - the DESeq2 package*. *Genome Biology* (Vol. 15). <http://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lu, J., Du, Z. X., Kong, J., Chen, L. N., Qiu, Y. H., Li, G. F., ... Zhu, S. F. (2012). Transcriptome Analysis of *Nicotiana tabacum* Infected by Cucumber mosaic virus during Systemic Symptom Development. *PLoS ONE*, 7(8). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0043447>
- Luo, W., & Brouwer, C. (2015). Pathview: pathway based data integration and visualization. *Bioinformatics*, 29(14), 1830–1831. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt285>
- Luque, D., Rivas, G., Alfonso, C., Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F., & Castón, J. R. (2009). Infectious bursal disease virus is an icosahedral polyploid dsRNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(7), 2148–2152.



<http://doi.org/10.1073/pnas.0808498106>

- Mallory, A., & Vaucheret, H. (2010). Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *The Plant Cell*, 22(12), 3879–89. <http://doi.org/10.1105/tpc.110.080671>
- Mandadi, K. K., & Scholthof, K.-B. G. (2013). Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease? *The Plant Cell*, 25(5), 1489–505. <http://doi.org/10.1105/tpc.113.111658>
- Mao, Q., Zheng, S., Han, Q., Chen, H., Ma, Y., Jia, D., ... Wei, T. (2013). New model for the genesis and maturation of viroplasm induced by fijiviruses in insect vector cells. *Journal of Virology*, 87(12), 6819–28. <http://doi.org/10.1128/JVI.00409-13>
- Marcussen, T., Sandve, S. R., Heier, L., Pfeifer, M., Kugler, K. G., Zhan, B., ... Olsen, O.-A. (2014). A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science (New York, N.Y.)*, 345(6194), 1250092. <http://doi.org/10.1126/science.1251788>
- Margis, R., Fusaro, A. F., Smith, N. A., Curtin, S. J., Watson, J. M., Finnegan, E. J., & Waterhouse, P. M. (2006). The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS Lett*, 580. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.03.072>
- Maroniche, G. A. (2011). *Estudio de la interacción hospedante-patógeno entre el Mal de Río Cuarto virus (MRCV) y el delfácido transmisor Delphacodes kuscheli*. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Maroniche, G., Mongelli, V. C., Llauger, G., Alfonso, V., Taboga, O., & del Vas, M. (2012). In vivo subcellular localization of Mal de Río Cuarto virus (MRCV) non-structural proteins in insect cells reveals their putative functions. *Virology*, 430(2), 81–9. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2012.04.016>
- Maroniche, G., Mongelli, V. C., Peralta, A. V., Distéfano, A. J., Llauger, G., Taboga, O. A., ... del Vas, M. (2010). Functional and biochemical properties of Mal de Río Cuarto virus (Fijivirus, Reoviridae) P9-1 viroplasm protein show further similarities to animal reovirus counterparts. *Virus Research*, 152(1-2), 96–103. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.06.010>
- Maroniche, G., Mongelli, V. C., Peralta, A. V., Distéfano, A. J., Llauger, G., Taboga, O. A., ... del Vas, M. (2010). Functional and biochemical properties of Mal de Río Cuarto virus (Fijivirus, Reoviridae) P9-1 viroplasm protein show further similarities to animal reovirus counterparts. *Virus Research*, 152(1-2), 96–103. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.06.010>
- Marques, J. T., & Imler, J. L. (2016). The diversity of insect antiviral immunity: Insights from viruses. *Current Opinion in Microbiology*, 32, 71–76. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.002>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal*, 17(1), 10. <http://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Mattio, M. F., Cassol, A., Remes Lenicov, A. M. de, & Truol, G. (2008). Tagosodes orizicolus: nuevo vector potencial del Mal de Río Cuarto virus. *Tropical Plant Pathology*, 33(3), 237–240. <http://doi.org/10.1590/S1982-56762008000300010>
- Maule, A. J., Caranta, C., & Boulton, M. I. (2007). Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. *Molecular Plant Pathology*, 8(2), 223–231. <http://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00386.x>
- McDonald, S. M., Nelson, M. I., Turner, P. E., & Patton, J. T. (2016). Reassortment in segmented RNA viruses: mechanisms and outcomes. *Nat Rev Micro*, 14(7), 448–460. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2016.46>
- McGinnis, J. L., Duncan, C. D. S., & Weeks, K. M. (2009). High-throughput SHAPE and hydroxyl radical analysis of RNA structure and ribonucleoprotein assembly. *Methods in Enzymology*, 468, 67–89. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)68004-6](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)68004-6)
- McQualter, R. B., Burns, P., Smith, G. R., Dale, J. L., & Harding, R. M. (2004). Molecular analysis of Fiji disease virus genome segments 5, 6, 8 and 10. *Archives of Virology*, 149(4), 713–721. <http://doi.org/10.1007/s00705-003-0243-1>
- McQualter, R. B., Smith, G. R., Dale, J. L., & Harding, R. M. (2003). Molecular analysis of Fiji disease Fijivirus genome segments 1 and 3. *Virus Genes*, 26(3), 283–289.

- Melnyk, C. W., Molnar, A., Bassett, A., & Baulcombe, D. C. (2011). Mobile 24 nt small RNAs direct transcriptional gene silencing in the root meristems of *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*, *21*(19), 1678–1683. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2011.08.065>
- Miedes, E., Vanholme, R., Boerjan, W., & Molina, A. (2014). The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. *Frontiers in Plant Science*, *5*(August), 358. <http://doi.org/10.3389/fpls.2014.00358>
- Miesen, P., Girardi, E., & van Rij, R. P. (2015). Distinct sets of PIWI proteins produce arbovirus and transposon-derived piRNAs in *Aedes aegypti* mosquito cells. *Nucleic Acids Research*, *43*(13), 6545–6556. <http://doi.org/10.1093/nar/gkv590>
- Miesen, P., Joosten, J., & Rij, R. P. Van. (2016). PIWIs Go Viral : Arbovirus-Derived piRNAs in Vector Mosquitoes, *2*, 1–17. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006017>
- Milne, I., Bayer, M., Cardle, L., Shaw, P., Stephen, G., Wright, F., & Marshall, D. (2009). Tablet-next generation sequence assembly visualization. *Bioinformatics*. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp666>
- Moissiard, G., Parizotto, E. A., Humber, C., & Voinnet, O. (2007). Transitivity in *Arabidopsis* can be primed, requires the redundant action of the antiviral Dicer-like 4 and Dicer-like 2, and is compromised by viral-encoded suppressor proteins. *RNA (New York, N.Y.)*, *13*(8), 1268–78. <http://doi.org/10.1261/rna.541307>
- Molnar, A., Melnyk, C. W., Bassett, A., Hardcastle, T. J., Dunn, R., & Baulcombe, D. C. (2010). Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science (New York, N.Y.)*, *328*(5980), 872–875. <http://doi.org/10.1126/science.1187959>
- Mongelli, V. C. (2010). *Estudio funcional de las proteínas codificadas por el virus del Mal de Río Cuarto en hospedantes vegetales*. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Mongelli, V., & Saleh, M.-C. (2016). Bugs Are Not to Be Silenced: Small RNA Pathways and Antiviral Responses in Insects. *Annual Review of Virology*, *3*(1), 573–589. <http://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042447>
- Morazzani, E. M., Wiley, M. R., Murreddu, M. G., Adelman, Z. N., & Myles, K. M. (2012). Production of virus-derived ping-pong-dependent piRNA-like small RNAs in the mosquito soma. *PLoS Pathogens*, *8*(1). <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002470>
- Nakashima, N., Koizumi, M., Watanabe, H., & Noda, H. (1996). Complete nucleotide sequence of the Nilaparvata lugens reovirus: a putative member of the genus Fijivirus. *The Journal of General Virology*, *77* ( Pt 1), 139–146. <http://doi.org/10.1099/0022-1317-77-1-139>
- Nakashima, N., & Noda, H. (1995). Nonpathogenic Nilaparvata lugens reovirus is transmitted to the brown planthopper through rice plant. *Virology*, *207*(1), 303–7. <http://doi.org/10.1006/viro.1995.1082>
- Nault, L. R. (1994). Transmission Biology, Vector Specificity and Evolution of Planthopper-Transmitted Plant Viruses BT - Planthoppers: Their Ecology and Management. In R. F. Denno & T. J. Perfect (Eds.) (pp. 429–448). Boston, MA: Springer US. [http://doi.org/10.1007/978-1-4615-2395-6\\_13](http://doi.org/10.1007/978-1-4615-2395-6_13)
- Nault, L. R., & Ammar, E. D. (1989). Leafhopper and Planthopper Transmission of Plant Viruses. *Annual Review of Entomology*, *34*(1), 503–529. <http://doi.org/10.1146/annurev.en.34.010189.002443>
- Nelissen, H., Gonzalez, N., & Inzé, D. (2016). Leaf growth in dicots and monocots: So different yet so alike. *Current Opinion in Plant Biology*, *33*, 72–76. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.06.009>
- Ni, Y., & Kemp, M. C. (1994). Subgenomic S1 segments are packaged by avian reovirus defective interfering particles having an S1 segment deletion. *Virus Research*, *32*(3), 329–342.
- Nibert, M. L., Pyle, J. D., & Firth, A. E. (2016). A +1 ribosomal frameshifting motif prevalent among plant amalgaviruses. *Virology*, *498*, 201–208. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2016.07.002>
- Nome, S. F. (1981). Association of Reovirus like particles with “Enfermedad de Río Cuarto” of Maize in Argentina. *Phytopathologische Zeitschrift*, *101*, 7–15.

- Olsper, A., Chung, B. Y., Atkins, J. F., Carr, J. P., & Firth, A. E. (2015). Transcriptional slippage in the positive-sense RNA virus family Potyviridae, 1–10.
- Ornaghi, J. A., March, G. J., Moschini, R. C., Martínez, M. I., Boito, G. T., Mal, T., & Cuarto, D. R. (2011). Predicting population level of *Delphacodes kuscheli*, vector of Mal de Río Cuarto virus, and climate risk in the Argentine Pampas using meteorological models, 36(June), 160–168.
- Palukaitis, P., & Carr, J. P. (2008). Plant resistance responses to viruses. *Journal of Plant Pathology*, 90(2), 153–171. <http://doi.org/10.4454/jpp.v90i2.650>
- Parent, J.-S., Bouteiller, N., Elmayan, T., & Vaucheret, H. (2015). Respective contributions of Arabidopsis DCL2 and DCL4 to RNA silencing. *The Plant Journal*, 81, 223–232. <http://doi.org/10.1111/tpj.12720>
- Pearce, S., Huttly, A. K., Prosser, I. M., Li, Y., Vaughan, S. P., Gallova, B., ... Phillips, A. L. (2015). Heterologous expression and transcript analysis of gibberellin biosynthetic genes of grasses reveals novel functionality in the GA3ox family. *BMC Plant Biology*, 15, 130. <http://doi.org/10.1186/s12870-015-0520-7>
- Pearce, S., Tabbita, F., Cantu, D., Buffalo, V., Avni, R., Vazquez-Gross, H., ... Dubcovsky, J. (2014). Regulation of Zn and Fe transporters by the GPC1 gene during early wheat monocarpic senescence. *BMC Plant Biology*, 14(1), 368. <http://doi.org/10.1186/s12870-014-0368-2>
- Periz, J., Celma, C., Jing, B., Pinkney, J. N. M., Roy, P., & Kapanidis, A. N. (2013). Rotavirus mRNAs are released by transcript-specific channels in the double-layered viral capsid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(29), 12042–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.1220345110>
- Petit, M., Mongelli, V., Frangeul, L., Blanc, H., Jiggins, F., & Saleh, M.-C. (2016). piRNA pathway is not required for antiviral defense in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201607952. <http://doi.org/10.1073/pnas.1607952113>
- Pfaffl, M. W. (2002). Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30, 36e–36. <http://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>
- Pu, L., Xie, G., Ji, C., Ling, B., Zhang, M., Xu, D., & Zhou, G. (2012). Transmission characteristics of Southern rice black-streaked dwarf virus by rice planthoppers. *Crop Protection*, 41, 71–76. <http://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.04.026>
- Pu, Y., Kikuchi, A., Moriyasu, Y., Tomaru, M., Jin, Y., Suga, H., ... Omura, T. (2011). Rice dwarf viruses with dysfunctional genomes generated in plants are filtered out in vector insects: implications for the origin of the virus. *Journal of Virology*, 85(6), 2975–9. <http://doi.org/10.1128/JVI.02147-10>
- Pumplin, N., & Voinnet, O. (2013). RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nat Rev Micro*, 11(11), 745–760. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3120>
- Qu, F. (2010). Antiviral role of plant-encoded RNA-dependent RNA polymerases revisited with deep sequencing of small interfering RNAs of virus origin. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 23(10), 1248–1252. <http://doi.org/10.1094/MPMI-06-10-0124>
- Rajeswaran, R., Golyaev, V., Seguin, J., Zvereva, A. S., Farinelli, L., & Pooggin, M. M. (2014). Interactions of rice tungro bacilliform pararetrovirus and its protein P4 with plant RNA silencing machinery. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2(12), 1–45. <http://doi.org/10.1094/MPMI-07-14-0201-R>
- Remes Lenicov, A. M. . (1985). Hallazgo de uno de los vectores del Mal de Río Cuarto en maíz. *Gac. Agropecuaria*, 25, 251–258.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(1), 139–40. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Rossi, E. A., Borghi, M. L., Renzo, M. A. Di, & Bonamico, N. C. (2015). Quantitative Trait loci ( QTL ) Identification for Resistance to Mal de Río Cuarto Virus ( MRCV ) in Maize Based on Segregate Population. *The Open Agriculture Journal*, 48–55.

- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. B., & Moorman, A. F. M. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, *37*(6), e45. <http://doi.org/10.1093/nar/gkp045>
- Saavedra Pons, A. (2012). *Inmunodetección y localización subcelular in vivo de las proteínas codificadas por el segmento bicistrónico S7 del Mal de Río Cuarto virus (MRCV) en hospedantes vegetales*. Universidad Nacional de Córdoba.
- Sade, D., Shriki, O., Cuadros-Inostroza, A., Tohge, T., Semel, Y., Haviv, Y., ... Brotman, Y. (2014). Comparative metabolomics and transcriptomics of plant response to Tomato yellow leaf curl virus infection in resistant and susceptible tomato cultivars. *Metabolomics*, *11*(1), 81–97. <http://doi.org/10.1007/s11306-014-0670-x>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning - Sambrook & Russel*. Human Mutation (Vol. 18). <http://doi.org/10.1002/humu.1186.abs>
- Sarkar, A., Volff, J.-N., & Vaury, C. (2016). piRNAs and their diverse roles: a transposable element-driven tactic for gene regulation? *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, fj.201600637RR. <http://doi.org/10.1096/fj.201600637RR>
- Schnettler, E., Donald, C. L., Human, S., Watson, M., Siu, R. W. C., McFarlane, M., ... Fragkoudis, R. (2013). Knockdown of piRNA pathway proteins results in enhanced Semliki Forest virus production in mosquito cells. *The Journal of General Virology*, *94*(Pt 7), 1680–1689. <http://doi.org/10.1099/vir.0.053850-0>
- Schnettler, E., Ratniner, M., Watson, M., Shaw, A. E., McFarlane, M., Varela, M., ... Kohl, A. (2013). RNA interference targets arbovirus replication in Culicoides cells. *Journal of Virology*, *87*(5), 2441–54. <http://doi.org/10.1128/JVI.02848-12>
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., ... Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, *7*(1), 3. <http://doi.org/10.1186/1471-2199-7-3>
- Schurch, N. J., Schofield, P., Gierliński, M., Cole, C., Sherstnev, A., Singh, V., ... Barton, G. J. (2016). How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should you use? *RNA (New York, N.Y.)*, 1–13. <http://doi.org/10.1261/rna.053959.115>
- Schwartz, S., Bernstein, D. A., Mumbach, M. R., Jovanovic, M., Herbst, R. H., Leon-Ricardo, B. X., ... Regev, A. (2014). Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic-regulated pseudouridylation of ncRNA and mRNA. *Cell*, *159*(1), 148–162. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.028>
- Schofield, S. R., Huang, L., Brandt, A. S., & Gill, B. S. (2005). Development of a Virus-Induced Gene-Silencing System for Hexaploid Wheat and Its Use in Functional Analysis of the Lr21 -Mediated Leaf Rust Resistance Pathway 1. *Plant Physiology*, *138*(August), 2165–2173. <http://doi.org/10.1104/pp.105.061861.1>
- Seila, A. C., & Sharp, P. a. (2008). Small RNAs tell big stories in Whistler. *Nat Cell Biol*, *10*(6), 630–633. <http://doi.org/10.1038/ncb0608-630>
- Sekhar Nandety, R., Fofanov, V. Y., Koshinsky, H., Stenger, D. C., & Falk, B. W. (2013). Small RNA populations for two unrelated viruses exhibit different biases in strand polarity and proximity to terminal sequences in the insect host Homalodisca vitripennis. *Virology*, 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.005>
- Shabalina, S. A., & Koonin, E. V. (2008). Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends in Ecology & Evolution*, *23*(10), 578–587. <http://doi.org/10.1016/j.tree.2008.06.005>
- Shen, J., Chen, X., Chen, J., & Sun, L. (2016). A phloem-limited fijivirus induces the formation of neoplastic phloem tissues that house virus multiplication in the host plant. *Scientific Reports*, *6*(May), 29848. <http://doi.org/10.1038/srep29848>
- Smillie, R. M. B., & Andersen, K. S. (1971). The Photosynthetic Electron Transfer System in Agranal Chloroplasts. In *11nd international Congress on Photosynthesis (Stresa)*.

- Song, X., Li, P., Zhai, J., Zhou, M., Ma, L., Liu, B., ... Cao, X. (2012). Roles of DCL4 and DCL3b in rice phased small RNA biogenesis. *Plant Journal*, *69*(3), 462–474. <http://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04805.x>
- Soo, H. M., Handley, J. A., Maugeri, M. M., Burns, P., Smith, G. R., Dale, J. L., & Harding, R. M. (1998). Molecular characterization of Fiji disease fijivirus genome segment 9. *The Journal of General Virology*, *79* ( Pt 12, 3155–3161. <http://doi.org/10.1099/0022-1317-79-12-3155>
- Spielmeier, W., Ellis, M. H., & Chandler, P. M. (2002). Semidwarf (sd-1), “green revolution” rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(13), 9043–9048. <http://doi.org/10.1073/pnas.132266399>
- Spoel, S. H., & Dong, X. (2008). Making Sense of Hormone Crosstalk during Plant Immune Responses. *Cell Host and Microbe*, *3*(6), 348–351. <http://doi.org/10.1016/j.chom.2008.05.009>
- Spoel, S. H., Johnson, J. S., & Dong, X. (2007). Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(47), 18842–18847. <http://doi.org/10.1073/pnas.0708139104>
- Sun, F., Yuan, X., Xu, Q., Zhou, T., Fan, Y., & Zhou, Y. (2013). Overexpression of rice black-streaked dwarf virus P7-1 in Arabidopsis results in male sterility due to non-dehiscent anthers. *PLoS ONE*, *8*(11). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0079514>
- Sun, Z., Zhang, S., Xie, L., Zhu, Q., Tan, Z., Bian, J., ... Chen, J. (2012). The secretory pathway and the actomyosin motility system are required for plasmodesmatal localization of the P7-1 of rice black-streaked dwarf virus. *Archives of Virology*. <http://doi.org/10.1007/s00705-012-1585-3>
- Sung, P.-Y., & Roy, P. (2014). Sequential packaging of RNA genomic segments during the assembly of Bluetongue virus. *Nucleic Acids Research*, *42*(22), 13824–13838. <http://doi.org/10.1093/nar/gku1171>
- Supyani, S., Hillman, B. I., & Suzuki, N. (2007). Baculovirus expression of the 11 mycoreovirus-1 genome segments and identification of the guanylyltransferase-encoding segment. *Journal of General Virology*, *88*(1), 342–350. <http://doi.org/10.1099/vir.0.82318-0>
- Szittyá, G., Moxon, S., Pantaleo, V., Toth, G., Rusholme Pilcher, R. L., Moulton, V., ... Dalmay, T. (2010). Structural and functional analysis of viral siRNAs. *PLoS Pathogens*, *6*(4), e1000838. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000838>
- Tatineni, S., Riethoven, J. J. M., Graybosch, R. A., French, R., & Mitra, A. (2014). Dynamics of small RNA profiles of virus and host origin in wheat cultivars synergistically infected by wheat Streak Mosaic Virus and Triticum Mosaic Virus: Virus infection caused a drastic shift in the endogenous small RNA profile. *PLoS ONE*, *9*(11). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0111577>
- Thompson, G. A., & Goggin, F. L. (2006). Transcriptomics and functional genomics of plant defence induction by phloem-feeding insects. *Journal of Experimental Botany*, *57*(4), 755–766. <http://doi.org/10.1093/jxb/erj135>
- Tolia, N. H., & Joshua-Tor, L. (2007). Slicer and the Argonautes. *Nat Chem Biol*, *3*(1), 36–43. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio848>
- Tordable, M. C., Tavecchio, N., Lorenzo, E., & Abdala, G. (1991). Histology and gibberellin levels in Healthy and diseased maize (*Zea mays* L.) roots affected by “Mal de Río Cuarto.” *Revista Interamericana de Ciencias Agrícolas*.
- Trask, S. D., Boehme, K. W., Dermody, T. S., & Patton, J. T. (2013). Comparative analysis of Reoviridae reverse genetics methods. *Methods*, *59*(2), 199–206. <http://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.05.012>
- Trask, S. D., McDonald, S. M., & Patton, J. T. (2012). Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(3), 165–177. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2673>
- Truol, G. A., Usugi, T., Hirao, J., Arnodeo, J. D., Giménez Pecci, M. P., & Laguna, I. G. (2001). Transmisión experimental del virus del mal de Río Cuarto por *Delphacodes kuscheli*. *Fitopatologia Brasileira*, *26*, 39–44. Retrieved from [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-)

41582001000100007&nrm=iso

- Ullrich, C. I., & Aloni, R. (2000). Vascularization is a general requirement for growth of plant and animal tumours. *Journal of Experimental Botany*, *51*(353), 1951–1960.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, *40*(15), 1–12. <http://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Untiveros, M., Olsper, A., Artola, K., Firth, A. E., Kreuze, J. F., & Valkonen, J. P. T. (2016). A novel sweet potato potyvirus open reading frame (ORF) is expressed via polymerase slippage and suppresses RNA silencing. *Molecular Plant Pathology*, *17*(7), 1111–1123. <http://doi.org/10.1111/mpp.12366>
- Valiente-Echeverría, F., Melnychuk, L., & Moulard, A. J. (2012). Viral modulation of stress granules. *Virus Research*, 4–11. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.06.004>
- Van Rij, R. P., Saleh, M. C., Berry, B., Foo, C., Houk, A., Antoniewski, C., & Andino, R. (2006). The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes and Development*, *20*(21), 2985–2995. <http://doi.org/10.1101/gad.1482006>
- Varet, H., Brillet-Guéguen, L., Coppée, J.-Y. Y., Dillies, M.-A. A., Love, M., Huber, W., ... Kingsford, C. (2016). SARTools: A DESeq2- and EdgeR-Based R Pipeline for Comprehensive Differential Analysis of RNA-Seq Data. *PLoS One*, *11* VN - r(6), e0157022. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0157022>
- Vaucheret, H. (2008). Plant ARGONAUTES. *Trends in Plant Science*, *13*(7), 350–358. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.04.007>
- Velázquez, P. D. (2010). *Transmisión experimental y detección del virus del Mal de Río Cuarto (MRCV) en diferentes especies de delfácidos (Insecta: Hemiptera)*. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Vigliocco, A., Bonamico, B., Alemano, S., Miersch, O., & Abdala, G. (2002). Stimulation of jasmonic acid production in *Zea mays* L. infected by the maize rough dwarf virus-Río Cuarto. Reversion of symptoms by salicylic acid. *Biocell: Official Journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopia Electronica ... Et. Al*, *26*(3), 369–374.
- Viruses of plants. Descriptions and lists from the VIDE database.* (1996). Wallingford: CAB INTERNATIONAL.
- Vodovar, N., Bronkhorst, A. W., van Cleef, K. W. R., Miesen, P., Blanc, H., van Rij, R. P., & Saleh, M. C. (2012). Arbovirus-derived piRNAs exhibit a ping-pong signature in mosquito cells. *PLoS ONE*, *7*(1). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0030861>
- Voinnet, O. (2008). Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends in Plant Science*, *13*(7), 317–328. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.05.004>
- Vrána, J., Kubaláková, M., Simková, H., Cíhalíková, J., Lysák, M. A., & Dolezel, J. (2000). Flow sorting of mitotic chromosomes in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetics*, *156*(4), 2033–2041. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1461381/>
- Walsh, D., Mathews, M. B., & Mohr, I. (2013). Tinkering with Translation: Protein Synthesis in Virus-Infected Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(1), a012351. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a012351>
- Walsh, D., & Mohr, I. (2011). Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(12), 860–875. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2655>
- Wang, Q., Tao, T., Zhang, Y., Wu, W., Li, D., Yu, J., & Han, C. (2011). Rice black-streaked dwarf virus P6 self-interacts to form punctate, viroplasm-like structures in the cytoplasm and recruits viroplasm-associated protein P9-1. *Virology Journal*, *8*, 24. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-8-24>
- Wang, Q., Yang, J., Zhou, G.-H., Zhang, H.-M., Chen, J.-P., & Adams, M. J. (2010). The Complete Genome Sequence of Two Isolates of Southern rice black-streaked dwarf virus, a New Member of the Genus Fijivirus. *Journal of Phytopathology*, *158*(11-12), 733–737. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01679.x>

- Wang, X.-H., Aliyari, R., Li, W.-X., Li, H.-W., Kim, K., Carthew, R., ... Ding, S.-W. (2006). RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science (New York, N.Y.)*, *312*(5772), 452–4. <http://doi.org/10.1126/science.1125694>
- Wassenegger, M., & Krczal, G. (2006). Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends in Plant Science*, *11*(3), 142–151. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.01.003>
- Weber, F., Wagner, V., Simon, B., Hartmann, R., Paludan, S. R., & Rasmussen, S. B. (2006). Double-Stranded RNA Is Produced by Positive-Strand RNA Viruses and DNA Viruses but Not in Detectable Amounts by Negative-Strand RNA Viruses Double-Stranded RNA Is Produced by Positive-Strand RNA Viruses and DNA Viruses but Not in Detectable Amounts by Neg. *Journal of Virology*, *80*(10), 5059–5064. <http://doi.org/10.1128/JVI.80.10.5059>
- Wei, L., Gu, L., Song, X., Cui, X., Lu, Z., Zhou, M., ... Cao, X. (2014). Dicer-like 3 produces transposable element-associated 24-nt siRNAs that control agricultural traits in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111* (10), 3877–3882. <http://doi.org/10.1073/pnas.1318131111>
- Wu, D., Qi, T., Li, W.-X., Tian, H., Gao, H., Wang, J., ... Xie, D. (2017). Viral effector protein manipulates host hormone signaling to attract insect vectors. *Nature Publishing Group*, 1–14. <http://doi.org/10.1038/cr.2017.2>
- Wu, L., Zhang, Q., Zhou, H., Ni, F., Wu, X., & Qi, Y. (2009). Rice MicroRNA effector complexes and targets. *The Plant Cell*, *21*(11), 3421–35. <http://doi.org/10.1105/tpc.109.070938>
- Wu, L., Zhou, H., Zhang, Q., Zhang, J., Ni, F., Liu, C., & Qi, Y. (2010). DNA Methylation Mediated by a MicroRNA Pathway. *Molecular Cell*, *38*(3), 465–475. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.03.008>
- Wu, T. D., & Nacu, S. (2010). Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads. *Bioinformatics*, *26*(7), 873–881. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq057>
- Wu, T. D., & Watanabe, C. K. (2005). GMAP: A genomic mapping and alignment program for mRNA and EST sequences. *Bioinformatics*, *21*(9), 1859–1875. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti310>
- Xiao, J., Jin, X., Jia, X., Wang, H., Cao, A., Zhao, W., ... Wang, X. (2013). Transcriptome-based discovery of pathways and genes related to resistance against *Fusarium* head blight in wheat landrace Wangshuibai. *BMC Genomics*, *14*(1), 197. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-14-197>
- Xu, H.-J., Chen, T., Ma, X.-F., Xue, J., Pan, P.-L., Zhang, X.-C., ... Zhang, C.-X. (2013). Genome-wide screening for components of small interfering RNA (siRNA) and micro-RNA (miRNA) pathways in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Insect Molecular Biology*, *22*(6), 635–647. <http://doi.org/10.1111/imb.12051>
- Xu, J., & Cherry, S. (2014). Viruses and antiviral immunity in *Drosophila*. *Developmental and Comparative Immunology*, *42*(1), 67–84. <http://doi.org/10.1016/j.dci.2013.05.002>
- Xu, Y., Huang, L., Fu, S., Wu, J., & Zhou, X. (2012). Population diversity of rice stripe virus-derived siRNAs in three different hosts and RNAi-based antiviral immunity in *Laodelphax striatellus*. *PloS One*, *7*(9), e46238. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0046238>
- Xu, Y., Huang, L., Wang, Z., Fu, S., Che, J., Qian, Y., & Zhou, X. (2014). Identification of Himetobi P virus in the small brown planthopper by deep sequencing and assembly of virus-derived small interfering RNAs. *Virus Research*, *179*, 235–240. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2013.11.004>
- Yadav, U. P., Ivakov, A., Feil, R., Duan, G. Y., Walther, D., Giavalisco, P., ... Lunn, J. E. (2014). The sucrose-trehalose 6-phosphate (Tre6P) nexus: Specificity and mechanisms of sucrose signalling by. *Journal of Experimental Botany*, *65*(4), 1051–1068. <http://doi.org/10.1093/jxb/ert457>
- Yan, F., Zhang, H., Adams, M. J., Yang, J., Peng, J., Antoniw, J. F., ... Chen, J. (2010). Characterization of siRNAs derived from rice stripe virus in infected rice plants by deep sequencing. *Archives of Virology*, *155*(6), 935–40. <http://doi.org/10.1007/s00705-010-0670-8>
- Yang, J., Zhang, H.-M., Ying, L., Li, J., Lv, M.-F., Xie, L., ... Chen, J.-P. (2014). Rice black-streaked dwarf virus genome segment S5 is a bicistronic mRNA in infected plants. *Archives of Virology*, *159*(2), 307–14. <http://doi.org/10.1007/s00705-013-1832-2>

- Yuan, H., Zhao, K., Lei, H., Shen, X., Liu, Y., Liao, X., & Li, T. (2013). Genome-wide analysis of the GH3 family in apple (*Malus × domestica*). *BMC Genomics*, *14*(1), 297. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-14-297>
- Zhang, C., Liu, Y., Liu, L., Lou, Z., Zhang, H., Miao, H., ... Qiu, B. (2008). Rice black streaked dwarf virus P9-1, an alpha-helical protein, self-interacts and forms viroplasm in vivo. *The Journal of General Virology*, *89*(Pt 7), 1770–1776. <http://doi.org/10.1099/vir.0.2008/000109-0>
- Zhang, H. M., Chen, J. P., & Adams, M. J. (2001). Molecular characterisation of segments 1 to 6 of Rice black-streaked dwarf virus from China provides the complete genome. *Archives of Virology*, *146*(12), 2331–2339.
- Zhang, K., Niu, S., Di, D., Shi, L., Liu, D., Cao, X., ... Zhang, Y. (2013). Selection of reference genes for gene expression studies in virus-infected monocots using quantitative real-time PCR. *Journal of Biotechnology*, *168*(1), 7–14. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.08.008>
- Zhang, L., Wang, Z., Wang, X., Li, D., Han, C., Zhai, Y., & Yu, J. (2005). Two virus-encoded RNA silencing suppressors, P14 of Beet necrotic yellow vein virus and S6 of Rice black streak dwarf virus. *Chinese Science Bulletin*, *50*(4), 305. <http://doi.org/10.1007/BF02897570>
- Zhang, X.-Y., Lu, K., Zhou, J.-L., & Zhou, Q. (2013). Molecular characterization and gene functional analysis of Dicer-2 gene from *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Geometroidea). *Insect Science*, *20*(1), 61–68. <http://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2012.01539.x>
- Zhao, B. S., & He, C. (2014). Pseudouridine in a new era of RNA modifications. *Cell Research*, *25*(2), 1–2. <http://doi.org/10.1038/cr.2014.143>
- Zheng, W., Ma, L., Zhao, J., Li, Z., Sun, F., & Lu, X. (2013). Comparative transcriptome analysis of two rice varieties in response to rice stripe virus and small brown planthoppers during early interaction. *PLoS ONE*, *8*(12). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0082126>
- Zheng, X., Zhu, J., Kapoor, A., & Zhu, J.-K. (2007). Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *The EMBO Journal*, *26*(6), 1691–1701. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601603>
- Zhou, G., Ren, N., Qi, J., Lu, J., Xiang, C., Ju, H., ... Lou, Y. (2014). The 9-lipoxygenase Osr9-LOX1 interacts with the 13-lipoxygenase-mediated pathway to regulate resistance to chewing and piercing-sucking herbivores in rice. *Physiologia Plantarum*, *152*(1), 59–69. <http://doi.org/10.1111/ppl.12148>
- Zilberman, D., Cao, X., & Jacobsen, S. E. (2003). ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science (New York, N.Y.)*, *299*(5607), 716–719. <http://doi.org/10.1126/science.1079695>
- Zografidis, A., Van Nieuwerburgh, F., Kolliopoulou, A., Apostolou-Karampelis, K., Head, S. R., Deforce, D., ... Swevers, L. (2015). Viral small RNA analysis of *Bombyx mori* larval midgut during persistent and pathogenic cytoplasmic polyhedrosis virus infection. *Journal of Virology*, (September), JVI.01695–15. <http://doi.org/10.1128/JVI.01695-15>
- Zong, J., Yao, X., Yin, J., Zhang, D., & Ma, H. (2009). Evolution of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) genes: Duplications and possible losses before and after the divergence of major eukaryotic groups. *Gene*, *447*(1), 29–39. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2009.07.004>



# Material suplementario

Segmento	Hospedante	Posición	FAM	Efecto
S01	Dk	796	0.151	F -> L
S01	Dk	1056	0.205	P -> L
S01	Dk	1151	0.258	N -> Y
S01	Dk	1519	0.241	S -> R
S01	Dk	2164	0.137	L -> F
S01	Dk	3287	0.326	F -> I
S01	Dk	4310	0.234	Syn
S01	Dk	4326	0.234	Y -> F
S02	Dk	2639	0.145	STOP
S02	Dk	2895	0.205	Syn
S02	Dk	3507	0.186	Syn
S03	Dk	319	0.13	Syn
S03	Dk	2073	0.171	V -> E
S03	Dk	3509	0.161	F -> I
S03	Dk	3514	0.271	N -> Y
S03	Dk	3515	0.157	Syn
S04	Dk	279	0.144	Syn
S04	Dk	1897	0.158	N -> Y
S04	Dk	2123	0.12	I -> N
S04	Dk	2371	0.142	P -> S
S04	Dk	3267	0.14	S -> R
S04	Dk	3440	0.297	I -> N
S05	Dk	108	0.188	L -> F
S05	Dk	109	0.301	N -> Y
S05	Dk	302	0.199	K -> I
S05	Dk	1751	0.168	A -> E
S05	Dk	2843	0.15	F -> I
S05	Dk	3098	0.143	Syn
S05	Dk	3100	0.185	Syn
S05	Dk	3101	0.303	G -> R
S05	Dk	3102	0.192	G -> E
S06	Dk	1909	0.176	L -> F
S07	Dk	3	0.184	-
S07	Dk	973	0.225	Syn
S07	Dk	1196	0.12	STOP
S07	Dk	1798	0.314	G -> V
S08	Dk	108	0.162	Syn
S08	Dk	170	0.231	S -> L
S08	Dk	223	0.324	Syn
S08	Dk	363	0.161	M -> I
S08	Dk	942	0.134	Syn
S08	Dk	1013	0.137	STOP
S09	Dk	42	0.314	-
S09	Dk	66	0.346	E -> D
S09	Dk	232	0.17	N -> Y
S10	Dk	1798	0.202	-
S10	Dk	894	0.224	V -> D

Segmento	Hospedante	Posición	FAM	Efecto
S01	Wheat	471	0.133	E -> V
S01	Wheat	517	0.178	F -> L
S01	Wheat	853	0.202	Syn
S01	Wheat	2934	0.148	D -> V
S02	Wheat	124	0.15	S -> T
S02	Wheat	1132	0.123	STOP
S02	Wheat	2725	0.129	H -> N
S02	Wheat	2886	0.171	M -> I
S03	Wheat	426	0.108	D -> V
S03	Wheat	486	0.131	A -> V
S03	Wheat	561	0.394	V -> E
S03	Wheat	1278	0.145	D -> V
S03	Wheat	1282	0.257	W -> C
S03	Wheat	3064	0.142	Syn
S03	Wheat	3133	0.214	N -> K
S04	Wheat	1172	0.207	D -> V
S04	Wheat	1665	0.199	F -> L
S04	Wheat	2308	0.479	S -> T
S05	Wheat	1145	0.142	G -> D
S05	Wheat	1246	0.15	A -> T
S05	Wheat	1550	0.134	H -> L
S05	Wheat	3017	0.122	N -> Y
S06	Wheat	2075	0.22	S -> C
S06	Wheat	2505	0.403	Syn
S07	Wheat	271	0.124	STOP
S07	Wheat	1192	0.159	H -> L
S07	Wheat	1215	0.143	N -> Y
S07	Wheat	1861	0.106	F -> Y
S08	Wheat	666	0.126	Syn
S09	Wheat	362	0.334	D -> V
S10	Wheat	630	0.168	D -> V

Tabla 15. Detalle de las mutaciones identificadas en el perfil mutacional de *D. kuscheli* (izquierda) y trigo (derecha). Se indica el segmento, el hospedante, la posición de la mutación, la frecuencia del alelo menor (FAM) y el tipo de mutación.