



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Caracterización de las proteínas codificadas por el
Cotton leafroll dwarf virus y de un
clon infectivo del virus.**

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

Lic. Verónica Cecilia Delfosse

Director: Dra. Ana Julia Distéfano

Consejero de estudios: Dr. H. Esteban Hopp

Instituto de Biotecnología
CICVyA, INTA-Castelar

Abril 2017

RESUMEN

Caracterización de las proteínas codificadas por el cotton leafroll dwarf virus y de un clon infectivo del virus

El algodón (*Gossypium spp.*) es un cultivo regional económicamente clave en el noreste argentino, cubriendo en la actualidad 500.000 hectáreas. La enfermedad azul es la principal enfermedad viral del algodón y causa importantes pérdidas en el cultivo si no se implementan medidas adecuadas de control consistentes en la siembra de cultivares resistentes a la enfermedad y en el control de los insectos vectores mediante insecticidas. La enfermedad es producida por el cotton leafroll dwarf virus (CLRDV), una especie dentro del género *Polerovirus* de la familia *Luteoviridae*. Los síntomas característicos de la enfermedad son enanismo, enrollamiento de las hojas, textura coriácea con coloración verde oscura-azulada y clorosis en las nervaduras. El virus es transmitido en forma circulativa y no propagativa por el pulgón del algodón *Aphis gossypii*, no siendo posible su transmisión mecánica. El CLRDV posee un genoma de RNA de simple cadena (ssRNA) positiva de 5,866 kb. El genoma de los virus pertenecientes al género *Polerovirus* está formado por siete marcos abiertos de lectura (ORFs). Los ORFs 0, 1 y 2 se traducen a partir del RNA viral dando como producto las proteínas P0, P1 y la proteína P1-P2 a partir de un cambio de marco traduccional. La proteína P0 corresponde en algunos virus del género al supresor del silenciamiento génico, las proteínas P1 y P1-P2 serían componentes de la RNA polimerasa dependiente de RNA. Los ORFs 3, 3a, 4 y 5, se traducen a partir de un RNA subgenómico, dando lugar a las proteínas P3, P3a, P4 y P3-P5. La proteína P3 corresponde a la cápside viral, P3a y P4 corresponderían a las proteínas de movimiento viral y P3-P5 al dominio *readthrough* de la proteína de cápside que estaría implicada en la transmisión del virus por el insecto vector.

En los programas de mejoramiento del cultivo de algodón, la selección de variedades de algodón con resistencia genética a la enfermedad azul se realiza mediante la infección de las plantas con insectos vectores que son criados en el laboratorio y que poseen el virus. En el presente trabajo se construyó y caracterizó un clon infectivo de cDNA del CLRDV. Este sistema permitió desarrollar una estrategia alternativa de infección mediante la inoculación del virus vía agroinfección, independizándose de la transmisión por el insecto vector, y por otro lado es esencial para el desarrollo de un sistema de genética reversa que permita el estudio de la expresión y función de los genes virales, de la replicación del virus y la interacción planta-virus a nivel molecular. Se caracterizó el clon infectivo del virus mediante ensayos de agroinfección en

plantas de *G. hirsutum* NC33B (variedad susceptible a la infección por CLRDV). Se registró la aparición de síntomas típicos de la enfermedad en las plantas bajo estudio y se confirmó la infección a distintos tiempos postinfiltración en las hojas sistémicas mediante las técnicas de RT-PCR, *Northern* y *Western blot*. A su vez, se demostró la transmisibilidad del virus desde plantas agroinfiltradas hacia plantas sanas mediada por áfidos, corroborando así que las partículas virales producidas por la agroinfección son infectivas y transmisibles por el vector natural. Además, se agroinfiltraron plantas de *G. hirsutum* variedad Guazuncho 2 (resistentes a la infección por CLRDV) y se comprobó que el virus no logra infectar esta variedad. Realizando el mismo tipo de ensayos, se comprobó que el clon infectivo del CLRDV tiene la capacidad de infectar las plantas modelo *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana*. Si bien en ambas especies los ensayos moleculares demostraron la infección y la movilidad del virus sistémicamente, solo se observaron síntomas (clorosis internerval) en *N. benthamiana*. El estudio y la caracterización del clon infectivo de CLRDV permitieron desarrollar una técnica más sencilla de infección, que actualmente se está utilizando como sistema de infección de rutina en el programa de mejoramiento de algodón del INTA para la selección de germoplasma resistente a CLRDV.

Para la caracterización de las proteínas CLRDV, se estudiaron las interacciones entre proteínas virales mediante el sistema de doble híbrido en levaduras. Se detectó interacción entre la proteína de cápside viral (P3) entre sí y con la proteína minoritaria de capsid P3P5 y además se observó interacción de la proteína de movimiento (P4) entre sí.

El silenciamiento génico constituye un mecanismo de defensa antiviral en plantas desencadenado por el RNA doble cadena. Como mecanismo de contra defensa, la mayoría de los virus vegetales poseen proteínas con función supresora del silenciamiento. Con el fin de avanzar en la comprensión de las bases moleculares de la enfermedad se investigó si el CLRDV posee una proteína capaz de suprimir el silenciamiento génico. Para ello se utilizaron dos sistemas basados en el silenciamiento de la proteína GFP, que permiten describir el mecanismo de acción y la etapa en la vía del silenciamiento que estaría afectada por el supresor. Estos estudios permitieron determinar que la proteína P0 del CLRDV es un supresor de silenciamiento local, que actúa bloqueando la vía del silenciamiento río arriba del proceso de amplificación. A su vez, no es capaz de inhibir la síntesis de RNAs pequeños (siRNAs) a partir de RNA de doble cadena ni es capaz de bloquear la movilidad sistémica de la señal de silenciamiento. Utilizando los mismos sistemas de silenciamiento se probó la actividad supresora del silenciamiento del clon infectivo de cDNA del CLRDV y se observó que la proteína P0 expresada en el contexto viral conserva la misma actividad supresora. Mediante un software de predicción se identificaron las

proteínas P3 y P4 del CLRDV como otros potenciales supresores del silenciamiento génico postranscripcional, y se analizó su actividad de la misma forma que fue evaluada la proteína P0, pero estas proteínas no presentaron actividad supresora del silenciamiento en ninguno de los sistemas utilizados.

Además, se evaluó comparativamente la virulencia de la proteína P0 del CLRDV y la proteína P0 del *Cotton leafroll dwarf virus-at* (CLRDV-at). Este virus es una variante nueva del CLRDV que quiebra la resistencia del germoplasma local estableciendo una infección suave con síntomas diferentes a enfermedad azul. Para ello se estudió la virulencia de P0 en el contexto de la infección de un virus heterólogo. Se analizó la exacerbación de los síntomas de PVX en presencia de las proteínas P0 en plantas de *N. benthamiana*. Se observó que la construcción PVX-P0^{CLRDV} desarrollaba síntomas severos con respecto al PVX salvaje y el PVX-P0^{CLRDV-at} desarrollaba síntomas suaves, mostrando que P0^{CLRDV} presenta mayor virulencia que P0^{CLRDV-at}.

Según se describe en bibliografía la proteína P0 de algunos polerovirus interactúan con la proteína ASK1 del sistema SCF ubiquitina ligasa. Al interactuar con dicho complejo median la degradación de la proteína ARGONAUTA 1 (AGO1) de la vía de silenciamiento génico de la planta. Utilizando la técnica de doble híbrido en levaduras se determinó que la proteína P0 del CLRDV también interactúa con el sistema SCF ubiquitina ligasa. Para ello se evaluó la interacción de las proteínas ASK de *A. thaliana* y sus correspondientes ortólogos: SKP1 de *N. benthamiana* y GSK1 de *Gossypium hirsutum*. Se determinó que la proteína P0 es capaz de interactuar con SKP1 y GSK1, pero no fue posible determinar su interacción con ASK mediante la técnica utilizada.

Estudios previos indican que la interacción entre la proteína P0 y ASK ocurre a través del dominio F-box (LPXXL/IX₁₀₋₁₃P) de la proteína P0. Con el objetivo de determinar si la interacción con el sistema SCF ubiquitina ligasa de la proteína P0 del CLRDV es dependiente de la conservación del dominio F-Box se realizaron mutantes en la región consenso del dominio. A partir del dominio F-box de P0^{CLRDV} (LPFIIX₁₀P) se desarrollaron las mutantes P0^{mut1} (LPFIvX₁₀P), P0^{mut2} (**aaFIIX₁₀a**) y P0^{mut3} (**aaFIIX₁₀P**). Teniendo en cuenta la secuencia del P0^{CLRDV-at} (LPFLvX₁₀P) se desarrolló el mutante P0^{mut1} sobre la secuencia del P0^{CLRDV} y el mutante P0^{mut4} (LPFLiX₁₀P) sobre la secuencia del P0^{CLRDV-at}. Se analizó la actividad supresora de los mutantes en el dominio mediante ensayos basados en el silenciamiento de la proteína GFP, en los cuales los mutantes P0^{mut2} y P0^{mut3} perdieron completamente la actividad supresora mientras que los mutantes P0^{mut1} y P0^{mut4} conservaron su actividad supresora con una leve variación en las intensidades de supresión. Mientras P0^{mut1} disminuyó su actividad respecto de P0^{CLRDV}, P0^{mut4} la aumentó respecto de

P0^{CLR_{at}}. Consistente con los resultados *in planta* las mutantes P0^{mut2} y P0^{mut3} perdieron la interacción con las proteínas SKP1 y GSK1 en el sistema de doble híbrido en levaduras, mientras que P0^{mut1} y P0^{mut4} conservaron la capacidad de interactuar con ellas. Estos resultados indican que la conservación del consenso LP de dicho dominio es indispensable para que ocurra la interacción y para que la proteína P0 posea su actividad supresora. Por último, mediante ensayos de coagroinfiltración de las proteínas P0 y AGO1, se logró determinar que en presencia de la proteína P0 la proteína AGO1 es degradada. De esta manera se confirmó que el mecanismo de acción de la proteína P0^{CLR_{at}} es conservado respecto de otras proteínas P0 caracterizadas previamente. A su vez, aquellos mutantes que perdieron su capacidad supresora tampoco fueron capaces de inducir la degradación de AGO1 señalando que el dominio F-box está implicado en el mecanismo de patogenicidad de la proteína P0.

Finalmente, se analizó la localización subcelular de la proteína P0 mediante la expresión de P0 fusionada a GFP. Mediante microscopia confocal se determinó que la proteína P0 se localiza en citoplasma y núcleo de células del mesófilo foliar de *N. benthamiana*.

El clon infectivo del CLR_{at} constituye una herramienta que permitirá avanzar en el estudio de la expresión y función de los genes virales y de la replicación viral por genética reversa. Se trata del primer clon infectivo capaz de infectar plantas de algodón y permite acelerar los procesos de búsqueda de genes de resistencia en bancos de germoplasma de algodón. Además, facilitará el trabajo en plantas modelo utilizadas para el estudio de la interacción planta-patógeno tales como *N. benthamiana*, así como el uso de las colecciones de mutantes de *A. thaliana* para profundizar en el estudio de las funciones virales y su interacción con el hospedador. Estos resultados representan un importante avance en el conocimiento de la función de las proteínas codificada por el CLR_{at}, especialmente en la comprensión de la función e interacciones de P0 con proteínas de sus hospedantes. En conclusión, proporcionan un punto de partida para la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la enfermedad azul producida por la infección del CLR_{at}.

Palabras clave: enfermedad azul del algodón, CLR_{at}, clon infectivo, proteína P0, silenciamiento del RNA, interacción de proteínas virales.

ABSTRACT

Characterization of the cotton Leafroll dwarf virus encoded proteins and a cDNA infectious clone

Cotton blue disease is the most important viral disease of cotton in the southern part of South America. Its etiological agent, cotton leafroll dwarf virus (CLRDV), is specifically transmitted to host plants by the aphid vector (*Aphis gossypii*) and any attempt to perform mechanical inoculations of this virus into its host has failed. This limitation has held back the study of this virus and the disease it causes. In this study, a full-length cDNA of CLRDV was constructed and expressed *in vivo* under the control of cauliflower mosaic virus 35S promoter. An agrobacterium-mediated inoculation system for the cloned cDNA construct of CLRDV was developed. Northern and immune blot analyses showed that after several weeks the replicon of CLRDV delivered by *Agrobacterium tumefaciens* in *Gossypium hirsutum* plants gave rise to a systemic infection and typical blue disease symptoms correlated to the presence of viral RNA and P3 capsid protein. We also demonstrated that the virus that accumulated in the agroinfected plants was transmissible by the vector *A. gossypii*. This result confirms the production of biologically active transmissible virions. In addition, the clone was infectious in *Nicotiana benthamiana* plants which developed interveinal chlorosis three weeks postinoculation and CLRDV was detected both in the inoculated and systemic leaves. Attempts to agroinfect *Arabidopsis thaliana* plants were successful too. Although no symptoms were observed, the P3 capsid protein as well as the genomic and subgenomic RNAs were detected in systemic leaves of some agroinfiltrated plants. This is the first report on the construction of a biologically-active infectious full-length clone of a cotton RNA virus showing successful agroinfection of host and non-host plants. The system herein developed will be useful to study CLRDV viral functions and plant-virus interactions using a reverse genetic approach.

To continue with the characterization of viral proteins, interactions between proteins were studied using the two-hybrid system in yeast. By this method, we detected the interaction between viral capsid protein (P3) with one another, P3 with the minor capsid protein P3P5 readthrough and the movement protein (P4) each other.

Plants employ RNA silencing as a natural defense mechanism against viruses. As a counter-defense, viruses encode silencing suppressor proteins (SSPs) that suppress RNA silencing. Most, but not all, the P0 proteins encoded by poleroviruses have been identified as SSP. In this study, we demonstrated that *Cotton leafroll dwarf virus* (CLRDV, genus *Polerovirus*) P0 protein

suppressed local silencing that was induced by sense or inverted repeat transgenes in *Agrobacterium* co-infiltration assay in *Nicotiana benthamiana* plants. A CLRDV full-length infectious cDNA clone that is able to infect *N. benthamiana* through *Agrobacterium*-mediated inoculation also inhibited local silencing in co-infiltration assays, suggesting that the P0 protein exhibits similar RNA silencing suppression activity when expressed from the full-length viral genome. On the other hand, the P0 protein did not efficiently inhibit the spread of systemic silencing signals. Moreover, Northern blotting indicated that the P0 protein inhibits the generation of secondary but not primary small interfering RNAs. The study of CLRDV P0 suppression activity may contribute to understanding the molecular mechanisms involved in the induction of cotton blue disease by CLRDV infection.

Using an *in silico* tool, MP and CP protein were identified as other potential SSPs. Their activity was analyzed as was evaluated for P0 protein, but these proteins did not show suppressive activity silencing in either system used.

An outbreak of a new disease occurred in cotton fields in northwest Argentina starting in the 2009/10 growing season and is still spreading steadily Argentina. The new leafroll disease in CBD-resistant cotton plants is caused by an atypical strain of CLRDV called *Cotton leafroll dwarf virus-at* (CLRDV-at). We evaluated the virulence of P0 protein from CLRDV end P0 from CLRDV-at in the context of a heterologous virus infection. The exacerbation of symptoms of PVX was analyzed in the presence of the protein P0 in *N. benthamiana* plants. It was noted that the construction PVX-P0^{CLRDV} developed severe symptoms than wild PVX or PVX-P0^{CLRDV-at} while PVX-P0^{CLRDV-at} developed mild symptoms, showing that P0^{CLRDV} presents greater virulence.

Previous studies showed that turnip yellows virus P0 protein interacts with S-phase kinase-associated protein 1 (SKP1), a core subunit of SCF-ubiquitin ligase complex, through the F-Box (LPXXL/IX₁₀₋₁₃P) domain and the inhibitory effect of polerovirus P0s on the production of secondary siRNAs is mediated by destabilization of ARGONAUTE 1 (AGO1) protein. We employed two hybrid yeast system to investigate whether P0^{CLRDV} interacts with SKP1 from *N. benthamiana* or the orthologue in cotton GSK1. We showed that P0^{CLRDV} interacts with both SKP1 and GSK1. In addition, point mutations in the F-Box-like motif of P0^{CLRDV}, P0^{mut2} (**aaFIIX₁₀a**) and P0^{mut3} (**aaFIIX₁₀P**) abolish the P0-SKP1 and P0-GSK1 interactions. Besides, the suppressive activity of the mutants was analyzed by methods based on the silencing of the GFP protein assays, in which P0^{mut2} and P0^{mut3} mutants completely lost their suppressive activity while P0^{mut1} (P0^{CLRDV} with the CLRBV F-Box motif: LPFLVX₁₀P) and P0^{mut4} (P0^{CLRDV-at} with the CLRDV F-Box motif: LPFLIX₁₀P) mutants retained their suppressive activity with a slight variation in suppression

intensities. While P0^{mut1} decreased, their activity regarding P0^{CLR DV} and P0^{mut4} increased respect P0^{CLR DV-at}. Consistent with the *in planta* results the P0^{mut3} and P0^{mut2} do not interacts with GSK1 or SKP1, while P0^{mut4} and P0^{mut1} retained the ability to interact with them. Finally, to test if P0^{CLR DV} and the mutants can also induce AGO1 decay, a FLAG-tagged AGO1 was agroinfiltrated into *N. benthamiana* leaves in the presence or absence of P0^{CLR DV} or the mutants. Expression of P0^{CLR DV} induced a strong reduction on the levels of AGO1-FLAG protein. These results indicate that the LP consensus of the F-Box domain is essential for P0 to hold suppressive activity and to interact with the plant proteins. The study of P0^{CLR DV} mechanism contributes to understanding the induction of cotton blue disease.

Lastly, the subcellular localization of the P0 protein was analyzed by expressing P0 fused to GFP. Employing confocal microscopy, we determined that P0 is localized in cytoplasm and nucleus of mesophyll leaf cells of *N. benthamiana*. The infectious clone of CLR DV is a tool that will let to advance in the study of viral genes and viral replication by reverse genetics. This is the first infectious clone capable of infecting cotton plants and speeds up screening processes of resistance genes in cotton germplasm banks. It will facilitate the work on model plants used for the study of plant-pathogen interaction such as *N. benthamiana* and the use of collections of *A. thaliana* mutants to extend the study of viral functions and their interaction with the host. These results represent a significant advance in understanding the function of the proteins encoded by the CLR DV, especially in understanding the function and interaction of proteins P0 with their hosts. In conclusion, they provide a starting point for understanding the molecular mechanisms involved in the blue disease caused by CLR DV.

Key words: Cotton blue disease, CLR DV, full-length cDNA, P0 protein, RNA silencing, viral protein interactions

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer al INTA y las excelentes personas que integran el Instituto de Biotecnología que me han recibido y brindado la oportunidad de trabajar en esta institución. Al CONICET y a Bec.AR por las becas que me han otorgado para realizar este trabajo.

A Ana, por la confianza, la dedicación, la motivación y el esmero por superarnos día a día. Porque no solo me acompañó laboralmente, sino también en lo personal y afectivo. Gracias por guiarme, enseñarme y comprenderme en todo momento.

A Yami, por hacer de este camino algo mucho mejor, acompañándome, bancándome, queriéndome y a veces no tanto! Porque de eso también aprendemos. Por compartir conmigo formalmente la mesada pero informalmente viajes, picardías, congresos, risas, llantos, entre tantas otras cosas.

A mis amigos del INTA, Sole, Luisa, Moschi, La Pola, las Gabis, Andre, Dami, Yami, Pili B.B., Pili C., Marina, Emi, Jere, Luis, Estani, Juan, Lau M., Diego, Nati Alonso por todos los momentos que se han vuelto inolvidables por su compañía.

A Andre G. por ayudarme, guiarme y haberme brindado la posibilidad de conocer el Instituto de Biotecnología.

Je remercie chaleureusement à Véronique Ziegler-Graff pour m'avoir accueilli dans son équipe et pour m'avoir guidé et conseillé au cours de mon stage.

A los chicos del invernáculo, Martín, Nacho, Matías y Agustín, a las chicas del lavadero Elena y Roxana y a Laura R. y las chicas del TEM por la predisposición, la ayuda y el cuidado de nuestros experimentos.

A mis padres Ana y Luis, y mi suegra Inés porque me acompañaron en todo este tiempo, me entendieron y fueron una ayuda invaluable con el cuidado de Juan Vicente durante la etapa de escritura.

A Kechu, por entenderme, ayudarme, darme la confianza que necesito cuando las cosas no van bien y por Juan Vicente que es la luz que nos ilumina y nos motiva cada día.

A Ana, Luis, Kechu y a mi hijo Juan Vicente.

PUBLICACIONES DERIVADAS DEL PRESENTE TRABAJO:

- Delfosse, V. C., Agrofoglio, Y. C., Casse, M. F., Kresic, I. B., Hopp, H. E., Ziegler-Graff, V., & Distéfano, A. J. (2014). The P0 protein encoded by cotton leafroll dwarf virus (CLRDV) inhibits local but not systemic RNA silencing. *Virus research*, *180*, 70-75.
- Delfosse, V. C., Casse, M. F., Agrofoglio, Y. C., Kresic, I. B., Hopp, H. E., Ziegler-Graff, V., & Distéfano, A. J. (2013). Agroinoculation of a full-length cDNA clone of cotton leafroll dwarf virus (CLRDV) results in systemic infection in cotton and the model plant *Nicotiana benthamiana*. *Virus research*, *175*(1), 64-70

Otras publicaciones realizadas durante el período de la tesis doctoral:

- Agrofoglio, Y. C., Delfosse, V. C., Casse, M. F., Hopp, H. E., Kresic, I. B., & Distéfano, A. J. (2017). Identification of a New Cotton Disease Caused by an Atypical Cotton Leafroll Dwarf Virus in Argentina. *Phytopathology* *107*, 369-376.

ÍNDICE

Resumen.....	2
Abstract	6
Agradecimientos	9
Índice.....	12
Acrónimos	16
Abreviaturas	17
1. Introducción	19
1.1. Generalidades del cultivo de algodón y de la enfermedad azul	19
1.1.1. Cultivo de algodón.....	19
1.1.2. Principales enfermedades que afectan al cultivo de algodón en la Argentina.....	21
1.1.3. Enfermedad azul del algodnero	22
1.1.4. Pulgón del algodnero: <i>Aphis gossypii</i>	23
1.1.5. Cotton leafroll dwarf virus (CLRDV)	24
1.1.6. Resistencia a la enfermedad azul del algodnero.....	25
1.1.7. Desarrollo de métodos alternativos de infección a través de clones infectivos.....	28
1.2. Generalidades de los polerovirus.....	29
1.2.1. Familia <i>Luteoviridae</i>	29
1.2.2. Ciclo viral de los polerovirus en la planta.....	30
1.2.3. Ciclo viral de los polerovirus en el insecto vector	32
1.2.4. Características de las proteínas codificadas por los polerovirus	33
1.2.4.1. Proteína P0	33
1.2.4.2. Proteína P1	34
1.2.4.3. Proteína P1P2	35
1.2.4.4. Proteína P3	36
1.2.4.5. Proteína P4	38
1.2.4.6. Proteína P3P5	39
1.2.4.7. Proteína P3a	40
1.3. Mecanismos de defensa antiviral	41
1.3.1. Mecanismos de defensa.....	41
1.3.2. Ubiquitinación de proteínas y complejos SCF.....	44
1.3.3. Silenciamiento del RNA endógeno en <i>Arabidopsis thaliana</i>	45
1.3.4. Silenciamiento de RNA como mecanismo de defensa antiviral.....	47
1.3.5. Supresores del silenciamiento generales.....	48
1.3.5.1. Actividad supresora de la proteína P38	49
1.3.5.2. Actividad supresora de la proteína P19	50

1.3.5.3. Actividad supresora de la proteína HcPro.....	50
1.3.5.4. Actividad supresora de la proteína 2b	50
1.3.5.5. Mecanismo de acción descrita de P0.....	51
1.3.6. Proteína AGO1.....	54
1.3.7. Degradación de proteínas y autofagia	56
1.4. Antecedentes que enmarcan el trabajo de tesis	58
2. Hipótesis y Objetivos.....	60
3. Materiales y Métodos	62
3.1. Material vegetal	62
3.2. Técnicas generales de biología molecular.....	62
3.3. Construcción del clon infectivo	63
3.4. Construcciones obtenidas en el vector pBin61.....	65
3.5. Construcciones empleando el sistema de clonado <i>Gateway</i>	65
3.6. Ensayos de agroinfección y agroinfiltraciones en <i>G. hirsutum</i> , <i>N. benthamiana</i> y <i>A. thaliana</i>	67
3.7. Extracción de RNA de plantas de algodón	68
3.8. Síntesis de cDNA.....	68
3.9. Amplificación de los extremos del cDNA (RACE: <i>Rapid Amplification of cDNA 3' and 5' Ends</i>).....	68
3.10. Transmisión viral mediante áfidos desde plantas agroinfectadas	69
3.11. Confirmación molecular de la infección viral por PCR	70
3.12. <i>Northern blot</i>	70
3.12.1 RNA de alto peso molecular	70
3.12.2. RNA de bajo peso molecular	71
3.13. Extracción de proteínas a partir de <i>G. hirsutum</i>	72
3.14. Extracción de proteínas a partir de <i>N. benthamiana</i> y <i>A. thaliana</i>	72
3.15. SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio	72
3.16. Detección de proteínas por <i>Western blot</i>	72
3.16.1. Anticuerpos utilizados.....	73
3.17. Técnica de doble híbrido en levaduras	73
3.18. Preparación de células de levaduras competentes y transformación	75
3.19. <i>Screening</i> de una biblioteca de cDNA de células acompañantes de floema de <i>A. thaliana</i> en levaduras	76
3.20. Mutagénesis de las proteínas P0 ^{CLRDV} y P0 ^{CLRDV-at}	76
3.21. Mutagénesis dirigida para el clonado de la proteína P3P5 (RT)	77
3.22. Clonado del ORF0 del CLRDV y del CLRDV-at en el clon infectivo del PVX	77
3.23. Infecciones con el virus PVX.....	78
3.24. Programas y plataformas virtuales empleadas	78
4. Resultados	80

4.1. Construcción y estudio de la capacidad de replicación de un clon infectivo de cDNA del cotton leafroll dwarf virus en plantas de algodón y plantas modelo	80
4.1.1. Construcción de un clon infectivo de cDNA del cotton leafroll dwarf virus	80
4.1.2. Estudio de la capacidad de replicación del clon infectivo de cDNA del cotton leafroll dwarf virus en plantas de algodón	82
4.1.3. Optimización del método de infección de plantas de <i>G. hirsutum</i> con el clon infectivo del CLRDV	86
4.1.4. Estudio de la transmisibilidad por áfidos de los viriones producidos a partir del clon infectivo del CLRDV	88
4.1.5. Agroinfiltración del clon infectivo del CLRDV en plantas modelo: <i>Nicotiana benthamiana</i> y <i>Arabidopsis thaliana</i>	88
4.1.6. Optimización de las condiciones de infección en plantas modelo	93
4.1.6.1. Coagroinfiltración del clon infectivo de CLRDV con supresores del silenciamiento del RNA heterólogos en <i>N. benthamiana</i>	93
4.1.6.2. Optimización de las condiciones de infección en <i>A. thaliana</i>	94
4.2. Estudio de la interacción entre sí de las proteínas codificadas por el CLRDV y con potenciales blancos moleculares del hospedante.	96
4.2.1. Estrategias de amplificación y clonado de los ORFs virales.	97
4.2.2. Evaluación de las interacciones entre proteínas virales del CLRDV	99
4.2.3. Identificación de proteínas de células acompañantes del floema de <i>A. thaliana</i> con capacidad de interactuar con la proteína PO ^{CLRDV}	102
4.3. Identificación y caracterización del supresor de silenciamiento del RNA del CLRDV y caracterización del mecanismo de acción	103
4.3.1. Búsqueda de proteínas del CLRDV con actividad supresora del silenciamiento del RNA.....	103
4.3.2. Construcción de los vectores plasmídicos utilizados para la expresión transitoria de proteínas del CLRDV en plantas	104
4.3.3. Identificación y caracterización de la proteína P0 del CLRDV como supresor de silenciamiento génico del RNA.....	104
4.3.4. Caracterización de la proteína PO ^{CLRDV} como supresor del silenciamiento del RNA en el sistema de <i>N. benthamiana</i> línea 16c.	105
4.3.5. Respuesta hipersensible de <i>N. benthamiana</i> línea 16c a PO ^{CLRDV} y el clon infectivo de CLRDV	110
4.3.6. Caracterización de la proteína PO ^{CLRDV} como supresor de silenciamiento del RNA en el sistema de <i>N. benthamiana</i>	111
4.3.7. Estudio de la actividad supresora del silenciamiento del RNA de las proteínas P3 y P4 del CLRDV	116
4.3.8. Estudio del mecanismo de acción de la proteína P0 del CLRDV	118
4.3.9. Construcción de vectores para evaluar interacciones por doble híbrido en levaduras	119
4.3.10. Análisis de la interacción de la proteína PO ^{CLRDV} con las proteínas ASK1 y ASK2 de <i>A. thaliana</i> , SKP1 de <i>N. benthamiana</i> y GSK1 de <i>G. hirsutum</i>	120
4.3.11. Construcción de vectores para la expresión de PO ^{CLRDV} con tag de c-Myc y HA. ...	123

4.3.12. Evaluación de la funcionalidad de la proteína PO ^{CLRDV} fusionada a los <i>tags</i> c-Myc y HA en posición amino y carboxilo terminal	124
4.3.13. Estudio de la desestabilización de la proteína ARGONAUTA 1 mediada por la proteína PO ^{CLRDV}	126
4.3.14. Estudio de la localización subcelular de la proteína PO ^{CLRDV}	128
4.3.15. Caracterización del dominio F-Box de la proteína PO del CLRDV	130
4.3.16. Análisis de la actividad supresora del silenciamiento de los mutantes en el dominio F-Box de las proteínas PO ^{CLRDV} y PO ^{CLRDV-at} en el sistema de <i>N. benthamiana</i> línea 16c.....	132
4.3.17. Análisis de la interacción de los mutantes de las proteínas PO ^{CLRDV} y PO ^{CLRDV-at} en el dominio F-Box con las proteínas SKP1 de <i>N. benthamiana</i> y GSK1 de <i>G. hirsutum</i>	135
4.3.18. Evaluación in planta de la desestabilización de AGO1 mediada por los mutantes en el dominio F-Box de las proteínas PO ^{CLRDV} y PO ^{CLRDVat}	138
4.3.19. Estudio del efecto de la expresión de PO ^{CLRDV} y de PO ^{CLRDV-at} sobre el desarrollo de la infección por PVX en <i>N. benthamiana</i>	139
5. Discusión	144
5.1. Construcción y estudio de la capacidad de replicación de un clon infeccioso de cDNA del cotton leafroll dwarf virus en plantas de algodón y plantas modelo	145
5.2. Estudio de la interacción entre sí de las proteínas codificadas por el CLRDV y con potenciales blancos moleculares del hospedante.	151
5.3. Identificación del supresor del silenciamiento del RNA del CLRDV y caracterización del mecanismo de acción.....	153
5.4. Perspectivas	164
6. Conclusiones.....	165
7. Bibliografía	167
Anexo I. Alineamiento de las proteínas P4	179
Anexo II. Alineamiento de las proteínas PO ^{CLRDV} y PO ^{CLRDVat}	180
Anexo III. Alineamiento ASK1, SKP1 y GSK1	181
Anexo IV. Alineamiento de la región carboxilo terminal de las proteínas PO.....	182

ACRÓNIMOS

Acrónimo	Nombre (Familia, Genero)
AbMV:	Abutilon mosaic virus (<i>Geminiviridae, Begomovirus</i>)
AMV:	Alfalfa mosaic virus (<i>Bromoviridae, Alfamovirus</i>)
BBTV:	Banana bunchy top virus (<i>Nanoviridae, Babuvirus</i>)
BChV:	Beet chlorosis virus (<i>Luteoviridae, Polerovirus</i>)
BMYV:	Beet mild yellowing virus (<i>Luteoviridae, Polerovirus</i>)
BSCTV:	Beet severe curly top virus (<i>Geminiviridae, Curtovirus</i>)
BWYV:	Beet western yellows virus (<i>Luteoviridae, Polerovirus</i>)
BYDV:	Barley yellow dwarf virus (<i>Luteoviridae, Luteovirus</i>)
CABYV:	Cucurbit aphid borne yellows virus (<i>Luteoviridae, Polerovirus</i>)
CaMV:	Cauliflower mosaic virus (<i>Caulimoviridae, Caulimovirus</i>)
CaMV:	Cauliflower mosaic virus (<i>Caulimoviridae, Caulimovirus</i>)
CAV:	Cotton anthocyanosis virus
CBTV:	Cotton bunchy top virus (<i>Luteoviridae, Polerovirus</i>)
CLCuV:	Cotton leaf curl virus (<i>Geminiviridae, Begomovirus</i>)
CLRDV:	Cotton leafroll dwarf virus (<i>Luteoviridae, Polerovirus</i>)
CMV:	Cucumber mosaic virus (<i>Bromoviridae, Cucumovirus</i>)
CpCSV:	Chickpea chlorotic stunt virus (<i>Luteoviridae, Polerovirus</i>)
CtRLV:	Carrot red leaf virus (<i>Luteoviridae, Polerovirus</i>)
CTV:	Citrus tristeza virus (<i>Closteroviridae, Closterovirus</i>)
CYDV:	Cereal yellow dwarf virus (<i>Luteoviridae, Polerovirus</i>)
FBNYV:	Faba bean necrotic yellows virus (<i>Nanoviridae, Nanovirus</i>)
MABYV:	Melon aphid-borne yellows virus (<i>Luteoviridae, Polerovirus</i>)
MaYMV:	Maize yellow mosaic virus (<i>Potyviridae, Potyvirus</i>)
PEMV-1:	Pea enation mosaic virus-1 (<i>Luteoviridae, Enamovirus</i>)
PLRV:	Potato leafroll virus (<i>Luteoviridae, Polerovirus</i>)
PVM:	Potato virus M (<i>Betaflexiviridae, Carlavirus</i>)
PVX:	Potato virus X (<i>Alphaflexiviridae, Potexvirus</i>)
PVY:	Potato virus Y (<i>Potyviridae, Potyvirus</i>)
SCYLV:	Sugarcane yellow leaf virus (<i>Luteoviridae, Polerovirus</i>)
TAV:	Tomato aspermy virus (<i>Bromoviridae, Cucumovirus</i>)
TBSV:	Tomato bushy stunt virus (<i>Tombusviridae, Tombusvirus</i>)
TCV:	Turnip crinkle virus (<i>Tombusviridae, Carmovirus</i>)
TMV:	Tobacco mosaic virus (<i>Virgaviridae, Tobamovirus</i>)
TSV:	Tobacco streak virus (<i>Bromoviridae, Ilarvirus</i>)
TuYV:	Turnip yellows virus (<i>Luteoviridae, Polerovirus</i>) Antiguamente denominado BWYV-FL1
TVDV:	Tobacco vein distorting virus (<i>Luteoviridae, Polerovirus</i>)
WYDV:	Wheat yellow dwarf virus (<i>Luteoviridae, Polerovirus</i>)

ABREVIATURAS

µg	microgramos	ml	mililitros
µl	microlitros	mM	milimolar
A	Adenina	MP	Proteína de movimiento
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	mRNA	RNA mensajero
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	MVB	cuerpos multivesiculares
AD	Dominio de activación	N.	<i>Nicotiana benthamiana</i>
AG	glándula salival accesoria	<i>benthamiana</i>	
AGO	ARGONAUTE	NB-LRR	<i>nucleotide-binding y leucine-rich repeat domain</i>
AMSH3	Associated molecule with the SH3 domain of STAM3	NBR1	Neighbour of BCRA1 gene1
APS	Ammonium Persulfate	NBT	Azul de nitrotetrazolio
ASK1	Arabidopsis SKP1-like 1	ng	Nanogramos
ATG8a	<i>Autophagy-specific gene 8a</i>	NLS	Señal de localización nuclear
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato	Nm	Nanómetros
BD	binding domain	NO	óxido nítrico
BiFC	<i>Bimolecular Fluorescence Complementation</i>	NPR1	NON-RACE SPECIFIC DISEASE RESISTANCE 1
BS	<i>bundle sheath</i> , células de la vaina	nt	Nucleotidos
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i> .	ORF	marco abierto de lectura
CC	células acompañantes	PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
cDNA	DNA copia	PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> : patrones moleculares asociados a patógenos
citosinas	C	Pb	pares de bases
CP	Proteína de cápside	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
CUL1	CULLIN 1	PD	plasmodesmos
DAS-ELISA	<i>Double antibody sandwich-Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>	PKC	proteínas quinasas C
DCL	Proteína <i>Dicer-like</i>	Pol V	RNA polimerasa V
DEPC	Dietil Pirocarbonato	PPUs	<i>Pore Plasmodesmal Units</i>
dNTP	desoxiribonucleósido trifosfato	PRPs	Receptores transmembrana de reconocimiento de PAMPs
DO	densidad óptica	PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i> : inmunidad desencadenada por PAMPs
DRB4	DOUBLE STRANDED-RNA BINDING PROTEIN 4	R	Arginina
DRM	DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE	raziRNA	siRNAs asociados a repeticiones
dsRNA	RNA cadena doble	RdDM	metilación de DNA dirigida por RNA
dsRNA	RNA doble cadena	RDR	RNA polimerasa dependiente de RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	RE	retículo endoplásmico
E1	enzima activadora de ubiquitina	<i>Rghv1</i>	<i>Resistance to Gossypium hirsutum Virus 1</i>
E2	enzima de conjugación de ubiquitina	RISC	complejo mediador del silenciamiento inducido por RNA
E3	ligasa ubiquitina	RNP	ribonucleoproteínas
EDTA	Ácido Etildiaminotetracético	ROS	especies reactivas de oxígeno
ESCRT-III	Endosomal complex required for transport-III	rpm	revoluciones por minuto
ET	etileno	RR	<i>Roundup Ready</i> ,
Et Br	Bromuro de etidio	rRNA	RNA ribosomal
ETI	<i>Effector-triggered immunity</i> : inmunidad desencadenada por efectores fenilalanina	RT	<i>readthrough</i>
F	fenilalanina	S	Serina
FC	canal de alimentación	SA	ácido salicílico
FG	intestino anterior	SAR	resistencia sistémica adquirida
<i>G. hirsutum</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	SCF	SKP-Cullin-proteína F-Box
GFP	Green fluorescent protein	SD	conducto salivar
H	Histidina	SDS	dodecil sulfato de sodio
H ₂ O miliQ	Agua calidad biología molecular	SE	<i>sieve elements</i> , floema
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno	seg	segundos
HA	Hemoaglutinina	SEL	límite de exclusión de tamaño más alto
HC	hemocele	SGS3	SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3
HEN1	HUA ENHANCER 1	siRNA	RNA pequeño
HG	Intestino posterior	SKP1	S PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 1
HR	respuesta hipersensible	snRNA	RNA pequeño nuclear
hs	horas	ssp.	especie
HYL1	HYPONASTIC LEAVES 1	TAE	Tris Acetato EDTA
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses	tasiRNA	siRNA de acción en <i>trans</i>
IPTG	isopropil-b-tiogalactopiranosido	TBE	Tris Borato EDTA
IR	<i>inverted-repeat</i> , repeticiones invertidas	TF	factores de transcripción
JA	ácido jasmónico	TRIS	hidroximetilaminometano
K	Lisina	tRNA	RNA de transferencia
kbp	Kilopares de bases	U	unidades enzimáticas
kDa	kilodaltons	Ub	ubiquitina
Km	Kanamicina	UPS	Ubiquitin proteasome system
L	Leucina	UV	ultra violeta
LAMP-2A	proteína de membrana asociada a los lisosomas tipo 2A	vol	Volúmenes
LB	medio de Luria-Delbrück	VP	parénquima vascular
LMW	RNA de bajo peso molecular	VPg	<i>genome-linked protein</i>
LRR	repetición rica en leucina	vsRNA	siRNA derivados de virus
M	marcador de peso molecular	W	triptófano
mA	miliamper	X	xilema
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i> , quinasas activadas por mitógenos	Y2H	<i>Yeast Two Hybrid</i> : doble híbrido en levaduras
MES	2-(N-morpholino)-ethane sulfonic acid		
mg	miligramos		
MG	intestino medio		
min	minutos		
miRNA	microRNA		

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades del cultivo de algodón y de la enfermedad azul

1.1.1. Cultivo de algodón

El algodón (*Gossypium* spp.) representa una de las especies de más amplia difusión como fuente de fibra natural para la industria textil y es uno de los cultivos económicamente más importantes del mundo. No solo se utiliza la fibra vegetal, la semilla se emplea en la elaboración de aceites comestibles e industriales y el residuo de extracción se utiliza en la alimentación de animales por su alto contenido de proteínas (36 a 40%) (Mondino y col., 2006).

El algodón es una especie dicotiledónea de la familia de las malváceas. El género *Gossypium* al cual pertenece consta de 45 especies (Hutchinson y col., 1947, Fryxell 1984). Los diversos germoplasmas del género pueden agruparse según el número de cromosomas en diploides y tetraploides. Las especies cultivadas tetraploides representan los algodones más importantes para la producción de fibra ocupando el 96% de la superficie destinada al cultivo en el mundo. La especie *G. hirsutum*, también conocida como algodón “*upland*” o de fibra corta, tiene su centro de origen en América Central y es responsable del 90% de la producción con una amplia distribución en todos los países productores del mundo (Mondino y col., 2006). La otra especie es *Gossypium barbadense* y la principal diferencia entre ambas es la longitud de la fibra individual de algodón. *G. barbadense* tiene fibras muy finas, de calidad *premium*, de 5 cm de largo en comparación con las fibras por lo general más cortas, de 2-3 cm de longitud de la especie *G. hirsutum*.

La producción mundial actual es de 25,5 millones de toneladas de algodón, y se cultiva en 34,8 millones de hectáreas en todo el mundo. Estados Unidos, China e India son los principales productores de algodón del mundo y representan casi el 60% de la producción global. El algodón se cultiva en más de 100 países y constituye el 40% del mercado mundial de fibra (página web Comité Consultivo Internacional del Algodón, enero 2016).

En nuestro país es un cultivo regional clave para el Noreste de Argentina (NEA) siendo la cadena agroindustrial del algodón muy importante en el aspecto económico y social de la región. Se cultiva en una amplia zona ecológica entre los 25° y 31° de latitud sur y comprende las provincias de Catamarca, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Salta, Santa Fe y Santiago del Estero (Figura 1). Dentro de ésta zona se presenta una gran diversidad ambiental con regiones climáticas que van desde la húmeda en el extremo noreste (más de 1.000 mm anuales de precipitaciones) hasta la semiárida del noroeste (menos de 500 mm anuales) (Mondino y col., 2006). Chaco es la principal provincia aldonera, con una participación promedio del 50% de la

superficie total sembrada en el país cubriendo, en los últimos años, aproximadamente 500.000 hectáreas (Sistema Integrado de Información Agropecuaria. <http://www.siiia.gov.ar/>).

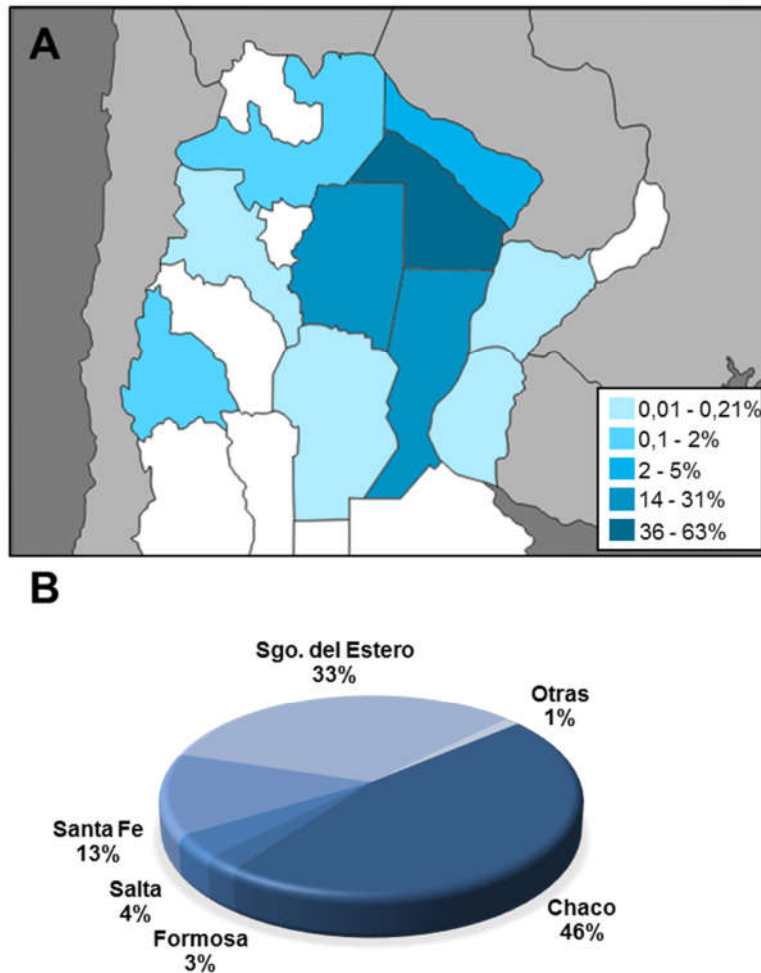


Figura 1. Producción algodonera argentina. A) Los porcentajes fueron calculados a partir de las hectáreas sembradas de algodón en cada provincia desde la campaña 2010/11 hasta la campaña 2014/15. Los intervalos corresponden a los valores máximos y mínimos registrados entre esos cinco períodos. B) Producción de algodón por provincia en la campaña 2016/17. Fuente: Sistema Integrado de Información Agropecuaria, febrero 2017.

Al igual que otros cultivos de interés agronómicos, el algodón ha sido blanco de desarrollos biotecnológicos para obtener variedades que presentan resistencia a herbicidas e insectos. Deltapine (402) es una variedad comercial resistente a la infección por CLRDV y genéticamente modificada para ser resistente al herbicida glifosato y algunos insectos como el barrenador del tallo (lepidópteros) y es el cultivar de algodón que se siembra de manera casi exclusiva en la Argentina (Tabla 1). Esta variedad proviene de Estados Unidos donde no hay registros de enfermedad azul, pero tiene muy buenos rendimientos, es por ello que se ha trabajado en la introgresión del gen de resistencia a la enfermedad azul del algodonero.

Cultivar	Resistencias	Superficie sembrada
Deltapine 402	Bt* - RR**	94 %
NuOpal	RR	3 %
Guazuncho 2000 (INTA)	RR	2 %
Otros	-	1 %

Tabla 1. Principales variedades de algodón sembradas en Argentina.

*Bt: expresa una proteína cristalina de origen bacteriano, producida naturalmente por *Bacillus thuringiensis*. Esta proteína es tóxica para las larvas de insectos barrenadores del tallo, que mueren al comer hojas o tallos.

**RR: *Roundup Ready*, resistente al herbicida glifosato.

1.1.2. Principales enfermedades que afectan al cultivo de algodón en la Argentina

La planta de algodón posee características de prolongada vegetación y fructificación, es por ello que el cultivo extensivo está expuesto a diferentes enfermedades, malezas y plagas en distintos momentos de su ciclo (Brown 1992). Hasta el momento fueron descritas al menos 20 virosis que afectan el cultivo de algodón. Su ocurrencia esta reportada en zonas tropicales como África, Caribe, América del Sur, Asia, América Central y regiones sub-tropicales como México y Estados Unidos (Brown 1992). Dentro de la región, en Brasil, se confirmó la presencia de cinco de ellas: mosaico común causado por el abutilon mosaic virus (AbMV), mosaico tardío causado por tobacco streak virus (TSV), mosaico de las nervaduras y mosaico de las nervaduras f. Riberão Bonito siendo ambos asociados al cotton leafroll dwarf virus (CLRDV) y el enrojecimiento causado por cotton anthocyanosis virus (CAV) (Galbieri y col., 2010). En Argentina existen numerosas enfermedades que afectan al cultivo de algodón, sin embargo, sólo algunas resultan de importancia económica por su prevalencia y daños ocasionados (Bonacic Kresic, 2006). En la Tabla 2 se detallan las principales enfermedades que afectan al cultivo de algodón en Argentina y los microorganismos causales.

Patógeno	Síntomas	
Hongos	<i>Rhizoctonia solani</i>	Damping-off
	<i>Phythium ultimum</i>	Damping-off
	<i>Fusarium oxysporum f. sp. p. vasinfectum</i>	Marchitamiento
	<i>Alternaria macrospora</i>	Mancha foliar
	<i>Ramularia areola</i>	Ramulariosis o Falso mildiu
	<i>Colletotrichum gossypii var. cephalosporioides</i>	Ramulosis o superbrotamiento
Bacterias	<i>Xanthomonas citri pv malvacearum</i>	Mancha angular
Virus	Cotton leafroll dwarf virus (CLRDV)	Enfermedad azul
	Cotton leafroll dwarf virus (CLRDVat)	Enfermedad azul atípica
	Abutilon mosaic virus (AbMV)	Mosaico común

Tabla 2. Principales enfermedades que afectan al cultivo del algodón en Argentina.

1.1.3. Enfermedad azul del algodnero

En Argentina y en Brasil la enfermedad azul representa un serio problema para la producción de algodón, ocasionando elevadas pérdidas de rendimiento si las plantas se infectan en estadios tempranos de su desarrollo volviéndose improductivas. Esta enfermedad fue descrita por primera vez en la República Centroafricana en el año 1949 y partir de ese momento se reportó en varias regiones de África, Asia y América (Cauquil y Follin 1983). En Argentina puede señalarse como antecedente lo que durante la campaña agrícola 1982/83 se denominó "mal de Misiones" y afectó en la provincia de Misiones a variedades de algodón producidas por INTA (Campagnac y col., 1986, Bonasic Kresic 1997). Los síntomas de la enfermedad azul del algodón son enrollamiento de hojas hacia abajo, textura coriácea, coloración verde oscura con tonalidades azuladas en las hojas, clorosis en las nervaduras y enanismo debido al acortamiento de los entrenudos (Figura 2) (Cauquil 1977, Cauquil y Vaissayre 1971).

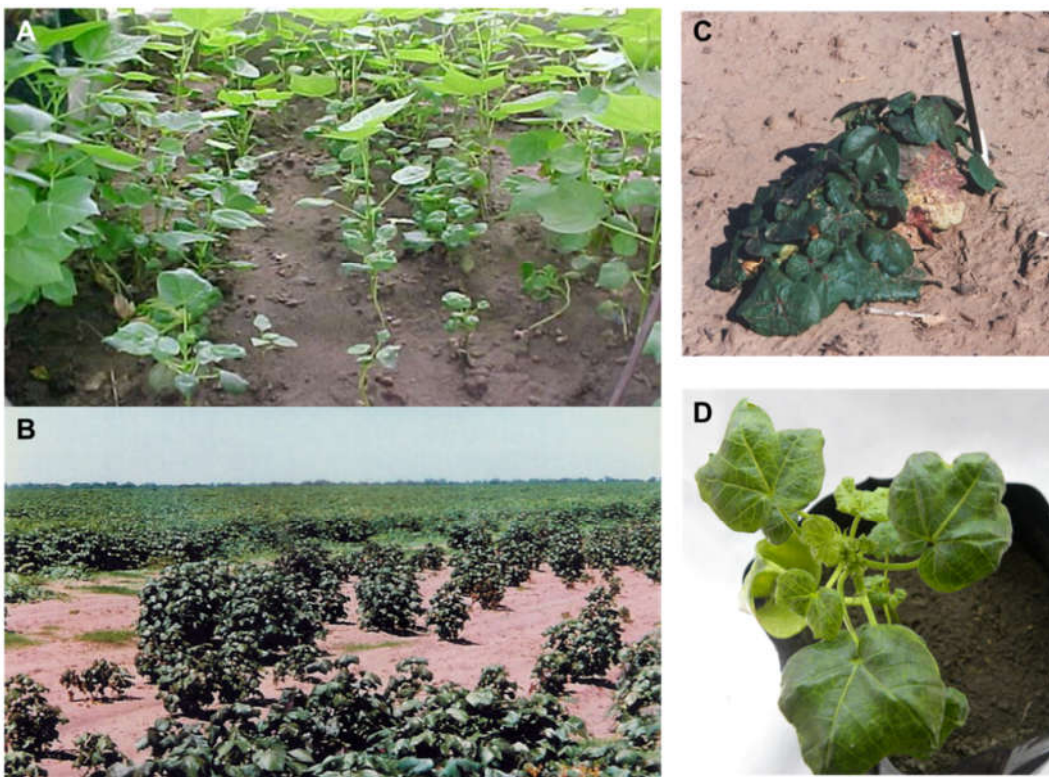


Figura 2. Infecciones por CLRVD. Síntomas típicos de la enfermedad azul del algodnero en infecciones naturales a campo en variedades susceptibles. A) Infección natural a campo. B) Epifitía de la campaña 1994/1995. C) Planta individual proveniente de la infección a campo de la campaña 1994/1995. D) Infección natural en invernáculo. Las fotos fueron tomadas por Ivan Bonasic Kresic y Maria Florencia Casse.

La enfermedad es producida por el cotton leafroll dwarf virus (CLRVD) perteneciente a la familia *Luteoviridae* (Corrêa y col., 2005, Distéfano y col., 2010). El virus es transmitido en forma circulativa y no propagativa por el pulgón del algodón *Aphis gossypii* (Cauquil 1977). La

transmisión es mediada por áfidos que se alimentan de plantas infectadas con CLRDV, adquieren el virus y luego al alimentarse en plantas sanas lo transmiten. La colonización inicial de los áfidos puede ocurrir en una planta aún muy joven generando los síntomas más graves de la enfermedad. No existe evidencia de transmisión por semillas de esta virosis (Cauquil y Vaissayre 1971, Cauquil y Follin 1983, Campagnac y col., 1986, Bonacic Kresic 2006).

Si los áfidos transmisores no son controlados durante la época de siembra del algodón, la infección viral puede llegar a afectar la productividad del material susceptible hasta en un 80%, causando importantes pérdidas económicas. Las plantas infectadas tempranamente por el virus se vuelven completamente estériles y aun cuando las plantas sean afectadas durante el período de floración las pérdidas son significativas (Michelotto y Busoli 2007). En las plantas infectadas que logran producir capullos se observa disminución en la calidad de las semillas y de la fibra (Campagnac y col., 1986), la cual no cumple con los estándares exigidos en el mercado. Los insecticidas son efectivos para el control de los áfidos transmisores de la enfermedad, pero son caros, potencialmente tóxicos para el ambiente y no proveen protección durante todo el ciclo del cultivo. El desarrollo y uso de cultivares de algodón resistentes a la enfermedad constituyen la mejor herramienta de control (Bonacic Kresic 1997, Silva y col., 2008).

1.1.4. Pulgón del algodonero: *Aphis gossypii*

El pulgón del algodonero es la principal plaga del cultivo en todo el mundo (Rummel y col., 1995). *Aphis gossypii* (Hemíptera: *Aphididae*) tiene más de 80 especies de plantas hospedantes y puede transmitir más de 50 virus fitopatógenos entre los cuales se encuentra el CLRDV (Ebert y Cartwright 1997). Una de sus principales características es la estrecha asociación con sus plantas hospedantes, su polimorfismo y habilidad para reproducirse tanto sexual como asexualmente. Los áfidos presentan un ciclo de vida complejo debido a las diversas fases por las que atraviesan y a las formas que adoptan (Figura 3). Viven en colonias localizadas en la cara abaxial de las hojas alimentándose del floema. Ninfas y adultos se alimentan succionando jugos vegetales lo que ocasiona un daño directo como el debilitamiento de las plantas y la detención del crecimiento.



Figura 3. Insecto vector del CLRDV, *Aphis gossypii*. A) Ninfa. B) Formas adultas del insecto vector áptera. C) Adulto alado. Figura tomada del trabajo de Tesis de Maestría de María Florencia Casse.

Las infestaciones de áfidos en cultivos de algodón se registran desde la emergencia de plántulas hasta el estadio final del ciclo del cultivo (Santos 1999). La población de áfidos aumenta rápidamente provocando escasez de alimento y surgimiento de formas aladas que buscan colonizar otras plantas para reiniciar la colonia (Gallo y col., 1988). Los adultos alados migran desde áreas contaminadas con el CLRDV hacia nuevos lotes sanos donde se producirá un nuevo foco de plantas infectadas (Cauquil 1977). Las demás etapas del ciclo del insecto transcurren en la planta infectada y desde esas colonias se infectan las plantas adyacentes (Miranda y col., 2008). Cuando los áfidos adultos alados dejan la planta inicial e infectan las plantas próximas, las cuales se encuentran en un estadio de crecimiento más avanzado, estas presentan síntomas menos severos. Por lo tanto, conforme a la distancia al foco inicial de la enfermedad existe un patrón decreciente en la severidad de los síntomas (Silva y col., 2008).

El tipo de transmisión es circulativa y no propagativa (Cauquil 1977), es decir durante la transmisión, las partículas virales no replican dentro del insecto vector, pero circulan a través del cuerpo del insecto. Para ello requiere un reconocimiento, penetración y transporte celular en el áfido.

1.1.5. Cotton leafroll dwarf virus (CLRDV)

En el año 1994 el Dr. Lenardón mediante ensayos serológicos de DAS-ELISA determinó la existencia de una relación serológica entre el virus causal de la enfermedad azul del algodón y virus de la familia *Luteoviridae* (Lenardon 1994). En el año 2005, Corrêa y col. publicaron la secuencia de una región de 1400 pb del genoma del virus asociado a la enfermedad azul del algodón en Brasil y, mediante análisis filogenético, determinaron que el virus pertenece al género *Poleovirus*, de la familia *Luteoviridae* y propusieron denominarlo *Cotton leafroll dwarf virus* (CLRDV). En el año 2010, nuestro grupo obtuvo por primera vez la secuencia completa del genoma del CLRDV presente en Argentina (Distéfano y col., 2010), confirmando que el CLRDV

debe clasificarse como una nueva especie dentro del género *Polerovirus*. Recientemente el comité de taxonomía viral (ICTV) reconoció a este virus como una nueva especie del género *Polerovirus* (ICTV, 2012). El CLRDV posee un genoma de RNA de simple cadena (ssRNA) positiva de 5,866 kb (Figura 4). Los viriones de los polerovirus son icosaédricos, de aproximadamente 25 nm de diámetro, limitados a las células acompañantes del floema de su planta hospedadora. El genoma de los virus pertenecientes al género *Polerovirus* está formado por siete marcos abiertos de lectura (ORFs). Los ORFs 0, 1 y 2 se traducen a partir del RNA viral dando como producto las proteínas P0, P1 y la proteína P1-P2 a partir de un cambio de marco traslacional. La proteína P0 corresponde en algunos virus del género al supresor de silenciamiento génico, las proteínas P1 y P1-P2 serían componentes de la RNA polimerasa dependiente de RNA. Los ORFs 3, 4 y 5, se traducen a partir de un RNA subgenómico, dando lugar a las proteínas P3, P3a, P4 y P3-P5. La proteína P3 correspondería a la cápside viral, P3a se encontraría involucrada en el movimiento sistémico del virus, P4 correspondería a la proteína de movimiento viral de célula a célula y P3-P5 al dominio *readthrough* de la proteína de cápside y estaría implicada en la transmisión del virus por el insecto vector (Mayo y Ziegler-Graff 1996, Pfeffer y col., 2002, van der Wilk y col., 1997). En el CLRDV se identificaron los siete ORFs descritos para los polerovirus y se detectó el RNA genómico y subgenómico (Distéfano y col., 2010).

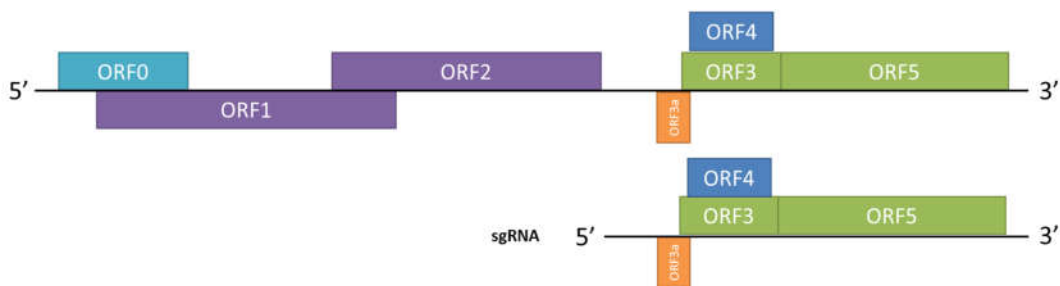


Figura 4. Representación esquemática del genoma del cotton leafroll dwarf virus. Se esquematiza la estructura genómica del CLRDV indicando los ORFs: ORF0, probable proteína supresora del silenciamiento; ORF1 + ORF2, probable RNA polimerasa dependiente de RNA; ORF3a, probable proteína P3a implicada en el movimiento sistémico del virus; ORF3, probable proteína mayoritaria de cápside; ORF4, probable proteína de movimiento; ORF3 + ORF5, probable dominio *readthrough* de la proteína de cápside.

1.1.6. Resistencia a la enfermedad azul del algodón

La especie silvestre *Gossypium arboreum* mostró resistencia contra la enfermedad azul y otras enfermedades virales como la producida por el *Cotton leaf curl virus* (CLCuV) y bacteriosis (Nateshan y col., 1996). Con el objetivo de introgresar la fuente de resistencia en el algodón cultivado *G. hirsutum* se desarrolló un algodón híbrido derivado del cruzamiento entre tres especies, *G. hirsutum*, *G. arboreum* y *G. raimondii* (HAR) (Innes 1983). Los materiales genéticos

derivados de cruzamientos del híbrido tri-específico "HAR" manifiestan resistencia a la enfermedad azul del algodón (Bonacic Kresic 1997). Hoy en día todas las variedades producidas por el INTA llevan incorporado germoplasma HAR.

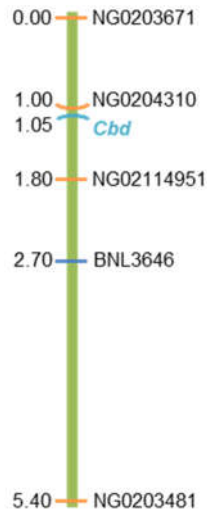


Figura 5. Mapa genético del cromosoma 10 de *G. hirsutum*. NG0203671, NG0204310, NG0211495 y NG0203481 corresponden a marcadores del tipo SNP (polimorfismo de un nucleótido, SNP de sus siglas en inglés *single nucleotide polymorphism*). Mientras que BNL3646 es un SSR (repeticiones de secuencias cortas, SSR de sus siglas en inglés *simple sequence repeat*). *Cbd* gen único dominante asociado a la resistencia del algodón a CLRDV. Adaptado de Fang y col., 2010.

Royo y col. (2003) realizaron un relevamiento de 283 variedades de algodón contra enfermedad azul bajo condiciones de infección natural a campo y encontraron que la gran mayoría de las variedades provenientes de Estados Unidos son susceptibles y la resistencia existe en el germoplasma proveniente de los países africanos como así también en nuevos materiales genéticos derivados del germoplasma africano. En el año 2008 Pupim y col. realizaron el primer reporte sobre la herencia de la resistencia a enfermedad azul y determinaron que la resistencia en dos variedades de algodón, CD401 y Delta Opal, está controlada por un único gen dominante y lo denominaron *Rghv1* (*Resistance to Gossypium hirsutum Virus 1*); sin embargo, no pudieron determinar si es el mismo gen presente en ambas variedades o son genes diferentes. Dos años después, Fang y col. (2010) demostraron que la resistencia a enfermedad azul en la variedad Delta Opal está controlada por un único gen dominante denominado *Cbd*, identificaron dos marcadores SSR ligados al gen mediante *bulked segregant analysis* y encontraron que el gen se encuentra en la región telomérica del cromosoma 10 (Figura 5). Recientemente, se publicó la secuenciación del genoma de *G. raimondii* (Wang y col., 2012) y de *G. hirsutum* (Zhang y col., 2015) a partir de los cuales se pueden realizar estudios genómicos para la búsqueda de los genes de resistencia. Asimismo, el gen de resistencia al polerovirus virus cotton bunchy top virus (CBTV) también fue mapeado en la región telomérica del cromosoma 10 y se identificaron 11 genes en

esa región que presentaban un dominio NB-LRR, típicos de los genes R (Ellis y col., 2016). Sin embargo, no fue posible asegurar que sea el mismo gen el que confiere resistencia a ambos polerovirus.

Las variedades de algodón que se siembran en Argentina son resistentes a la infección por CLRDV (NuOpal, Deltapine 402 y Guazuncho 2, Tabla 1). Sin embargo, en las campañas algodoneras del 2009-10 se detectó una virosis en cultivares de algodón resistentes al CLRDV (Figura 6). La secuencia del genoma completo del virus determinó que las proteínas codificadas tienen una identidad de secuencia respecto a las proteínas codificadas por el CLRDV que varía del 88% al 98%. Se trata de una variante del CLRDV capaz de quebrar la resistencia presente en las variedades sembradas a campo denominada CLRDV-at (Agrofoglio y col., 2017). Fue identificado en plantas de todas las variedades de algodón que se siembran localmente resistentes y susceptibles (variedad NC33B) a la infección por CLRDV. Desde la campaña del 2010, la nueva enfermedad se dispersó a las principales áreas de cultivo de algodón en el NEA, con una incidencia del 20%, mostrando que constituye un serio problema y un nuevo desafío para el manejo del cultivo, debido a que todas las variedades que se siembran actualmente son susceptibles al CLRDV-at. CLRDV-at es una nueva variante, con una alta identidad de secuencia en sus proteínas con el CLRDV, sin embargo, ambos virus establecen una infección diferente y con distinta sintomatología en las plantas de algodón. Mientras que el CLRDV produce marcado enanismo de la planta por acortamiento de entrenudos, enrollamiento de las hojas y las nervaduras se ponen amarillas, el CLRDV-at no produce reducción de la altura de la planta, el enrollamiento de las hojas es leve y desregula la dominancia apical (Figura 6) (Agrofoglio y col., 2017).

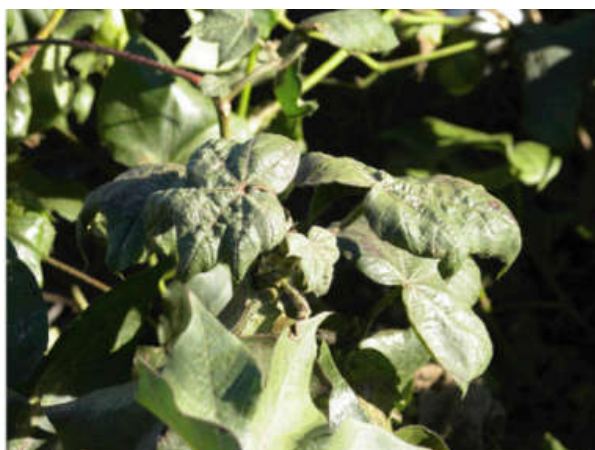


Figura 6. Síntomas asociados a la nueva enfermedad producida por CLRDV-at. Se observa desregulación apical con achaparramiento en el segmento superior de la planta, hojas enrolladas y arrugadas en planta de *G. hirsutum*, variedad NuOpal cultivada a campo.

1.1.7. Desarrollo de métodos alternativos de infección a través de clones infectivos

Tradicionalmente, en los programas de mejoramiento del cultivo de algodón, la selección de variedades con resistencia genética a la enfermedad azul se realiza mediante la infección de las plantas con insectos vectores virulíferos que fueron criados en el laboratorio y que adquirieron el virus de plantas infectadas. Este método es complejo porque requiere de mucho tiempo para mantener la población de áfidos viable durante todo el año, instalaciones especiales para evitar el escape de los insectos y a su vez la cantidad de vectores disponible limita el número de material a evaluar (Delfosse y col., 2015). Otra estrategia para la evaluación del material es la siembra bajo condiciones de infección natural a campo. Estas determinaciones son dependientes de las infestaciones naturales de áfidos, las cuales no presentan una distribución uniforme en el campo. Esta variabilidad puede alterar el resultado y otorgar características resistentes a plantas susceptibles que no han sido infectadas. Por otro parte, la incidencia de la infección, dependiente de la presencia del áfido, es variable en cada campaña. Más aún, la sincronización entre la presencia de los vectores y el estadio de desarrollo de la planta es indispensable para la identificación de genotipos resistentes (Paliwal 2001). Es por ello que es necesario el desarrollo de técnicas de infección artificiales de las plantas de algodón que permitan reproducir los síntomas de enfermedad azul y permitan la evaluación en forma sencilla y eficiente de los materiales mejorados.

La construcción de clones infectivos de cDNA constituye un paso esencial para desarrollar sistemas alternativos de infección no natural por el virus. Estos sistemas permiten independizarse de la transmisión por el insecto vector y constituyen una herramienta fundamental para el estudio de la expresión y función de los genes virales, de la replicación del virus, la interacción planta-virus-vector a nivel molecular y finalmente para la evaluación y selección de plantas tolerantes y/o resistentes al virus en los programas de mejoramiento genético del algodón. Uno de los métodos más eficientes de inoculación de los clones infectivos es la agroinoculación (también llamada agroinfección). La técnica de agroinfección es un proceso a través del cual se introduce el clon infectivo de un virus en el DNA-T (DNA transferente) presente en el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. Luego se realiza la transformación de una cepa específica de *Agrobacterium* con el vector binario y la inoculación en las hojas de la planta hospedante. La bacteria libera el DNA viral infectivo en la célula de la planta hospedante, donde se transfiere el DNA-T a la planta y se inicia la infección. La agroinfección ha sido ampliamente utilizada para la inoculación de clones infectivos de virus de RNA y es el principal método utilizado para iniciar la infección viral con virus de la familia *Luteoviridae* al cual

pertenece el CLRDV (Leiser y col., 1992, Prüfer y col., 1995, Franco-Lara y col., 1999, Stephan y Maiss 2006, Klein y col., 2014). En general, el cDNA viral se expresa a partir de un promotor constitutivo como puede ser el 35S del *Cauliflower mosaic virus* (CaMV). Una vez que el cDNA viral es liberado a la célula por la bacteria, la RNA Polimerasa II del huésped utiliza dicho promotor para iniciar la síntesis del RNA infectivo. La agroinfección de cDNA infectivos es un método muy eficiente y barato, dado que evita la transcripción *in vitro*, siendo además un sistema muy conveniente que no requiere equipos de biobalística y a su vez se obtienen infecciones más permisivas en la hoja inoculada. En los últimos años se han desarrollado con éxito clones infectivos para varios polerovirus como *Potato leafroll virus* (PLRV) (Franco-Lara y col., 1999, Sadowy y col., 1998), *Beet western yellows virus* (BWYV) (Leiser y col., 1992), *Beet mild yellow virus* (BMYV) (Stevens y Viganó 2007, Stephan y Maiss 2006, Klein y col., 2014) y *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) (Prüfer y col., 1995).

1.2. Generalidades de los polerovirus

1.2.1. Familia *Luteoviridae*

Los virus pertenecientes a la familia *Luteoviridae* poseen un genoma de RNA lineal de simple cadena positiva de entre 5 a 6 kb y presentan al menos un RNA subgenómico a partir del que se traducen los ORFs del extremo 3' (Ali y col., 2014).

Los virus pertenecientes a esta familia poseen tropismo vascular, limitando la replicación viral y el movimiento a las células acompañantes del floema, las células del parénquima floemático y los tubos cribosos de plantas hospedadoras (Mutterer y col., 1999). Los virus de la familia *Luteoviridae* se agrupan en tres géneros en base a su organización genómica, sus estrategias de replicación y sus mecanismos de expresión: *Luteovirus*, *Polerovirus* y *Enamovirus* (D'Arcy y Domier 2000). En la Tabla 3 se detallan todas las especies pertenecientes a los tres géneros reconocidas por el *International Committee of Taxonomy of Viruses* (ICTV *master species list 2016*).

Genero	Especie	
<i>Enamovirus</i>	Pea enation mosaic virus-1	PEMV-1
	<i>Alfalfa enamovirus-1</i>	
<i>Luteovirus</i>	Barley yellow dwarf virus-PAV	BYDV-PAV
	<i>Barley yellow dwarf virus-kerII</i>	BYDV-kerII
	<i>Barley yellow dwarf virus-kerIII</i>	BYDV-kerIII
	<i>Barley yellow dwarf virus-MAV</i>	BYDV-MAV
	<i>Barley yellow dwarf virus-PAS</i>	BYDV-PAS
	<i>Bean leafroll virus</i>	BLRV
	<i>Rose spring dwarf-associated virus</i>	RSDaV
	<i>Soybean dwarf virus</i>	SbDV
<i>Polerovirus</i>	<i>Beet chlorosis virus</i>	BChV
	<i>Beet mild yellowing virus</i>	BMV
	<i>Beet western yellows virus</i>	BWYV
	<i>Carrot red leaf virus</i>	CtRLV
	<i>Cereal yellow dwarf virus-RPS</i>	CYDV-RPS
	<i>Cereal yellow dwarf virus-RPV</i>	CYDV-RPV
	<i>Chickpea chlorotic stunt virus</i>	CpCSV
	<i>Cotton leafroll dwarf virus</i>	CLRDV
	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	CABYV
	<i>Maize yellow dwarf virus-RMV</i>	MYDV-RMV
	<i>Maize yellow mosaic virus</i>	MaYMV
	<i>Melon aphid-borne yellows virus</i>	MABYV
	<i>Pepper vein yellows virus</i>	PeVYV
	Potato leafroll virus	PLRV
	<i>Suakwa aphid-borne yellows virus</i>	SABYV
	<i>Sugarcane yellow leaf virus</i>	SCYLV
	<i>Tobacco vein distorting virus</i>	TVDV
<i>Turnip yellows virus</i>	TuYV (BWYV-FL1)	
No asignados	<i>Barley yellow dwarf virus-GPV</i>	BYDV-GPV
	<i>Barley yellow dwarf virus-SGV</i>	BYDV-SGV
	<i>Chickpea stunt disease associated virus</i>	CpSDaV
	<i>Groundnut rosette assistor virus</i>	GRAV
	<i>Indonesian soybean dwarf virus</i>	SbDV
	<i>Sweet potato leaf speckling virus</i>	SPLSV
	<i>Tobacco necrotic dwarf virus</i>	TNDV

Tabla 3. Taxonomía de la familia *Luteoviridae*. La familia *Luteoviridae* se divide en tres géneros: *Enamovirus*, *Luteovirus* y *Polerovirus*. En color negro se indican los miembros tipo de cada género. Fuente: ICTV

1.2.2. Ciclo viral de los polerovirus en la planta

Los polerovirus virus entran en el tejido vegetal a través de vectores biológicos. Una vez dentro de las células vegetales, acompañantes del floema, las células del parénquima floemático o los tubos cribosos se desensambla el virión y comienza la traducción y replicación del genoma (Figura 7). Primero se traducen los genes de expresión temprana entre los cuales se encuentran las proteínas implicadas en la replicación viral que inducen la formación de complejos de replicación mediante invaginaciones de membrana (den Boon y Ahlquist 2010). A continuación, a partir de moléculas de RNA subgenómico se expresan las proteínas de cápside y aquellas involucradas en el movimiento viral. Una vez sintetizadas las proteínas virales y replicadas las moléculas del genoma viral se organizan los complejos de transporte, ya sea viriones o

ribonucleoproteínas (RNP). El movimiento a corta distancia de célula a célula requiere de la modificación de los plasmodesmos (PD) mediada por las proteínas de movimiento viral (MP). Una vez en floema (SE, de las siglas en inglés *sieve elements*), el virus es transportado sistémicamente en la savia del floema, luego sale de floema para iniciar la infección en regiones distales y diseminarse a lo largo de toda la planta (Oparka y Cruz 2000, Niehl y Heinlein 2011, Ueki y Citovsky 2011). Para moverse local y sistémicamente los virus aprovechan las rutas de transporte existentes (plasmodesmos y el floema) siguiendo el transporte de fuente a sumidero de carbohidratos de la planta (Hipper y col., 2013).

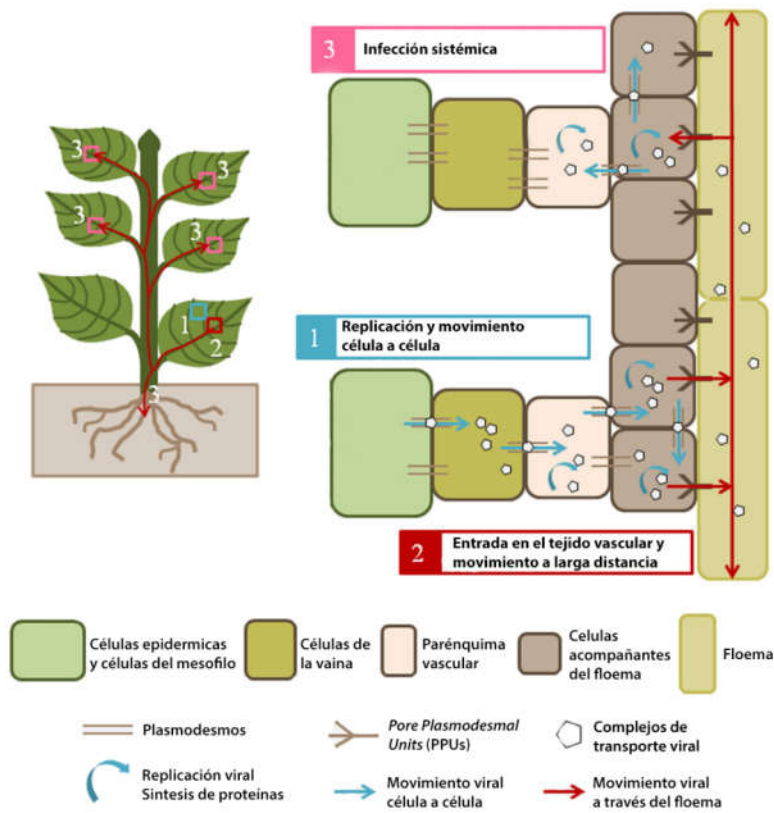


Figura 7. Esquema del movimiento viral de célula a célula y a larga distancia en tejidos vegetales. Una vez en las células del parénquima floematico o acompañantes del floema los viriones se desensamblan para la replicación y la traducción del genoma viral (1). Las proteínas virales forman los viriones o complejos de ribonucleoproteínas (RNP) con el genoma viral que permiten el movimiento del virus de célula a célula a través de plasmodesmos. (2) Los complejos de transporte (viriones o RNP) alcanzan el floema y se inicia el movimiento a larga distancia. (3) Finalmente alcanzan los tejidos sistémicos para iniciar la infección en un nuevo sitio. Figura adaptada de Hipper y col., (2013).

Los miembros de la familia *Luteoviridae* presentan un particular tropismo por las células acompañantes del floema, la estructura y la composición de estas células reflejan su alta especialización funcional en el transporte de moléculas desde los tejidos fuente hacia los tejidos sumideros (Figura 8A). El floema (SE) está formado por células anucleadas, modificadas por degradación selectiva de organelas, que se encuentran interconectadas entre sí por poros (*wide*

sieve pores) formando un conducto celular con baja resistencia que favorece el flujo de savia (Turgeon y Wolf 2009). Las células acompañantes del floema (CC) son las encargadas de suministrar nutrientes al floema y se caracterizan por una alta actividad metabólica (van Bel 2003). Ambos tipos celulares se encuentran estrechamente conectados a través de los denominados *Pore Plasmodesmal Units* (PPUs) (Figura 8B) que consisten en plasmodesmos especializados formados por múltiples canales que nacen en las CC y desembocan en un solo canal en los SE (Oparka y Turgeon 1999). Las PPU presentan un límite de exclusión de tamaño más alto (SEL) y son más permeables que los PD de las células del mesófilo. Si bien algunas macromoléculas, como proteínas o RNA, pueden difundirse hacia el SE sin regulación específica (Stadler y col., 2005), tal difusión pasiva no puede explicar la movilidad de las partículas virales o los complejos de ribonucleoproteína (RNP, formados por la asociación del genoma viral con proteínas celulares y/o virales) ya que son demasiado grandes para atravesar libremente por los PPU.

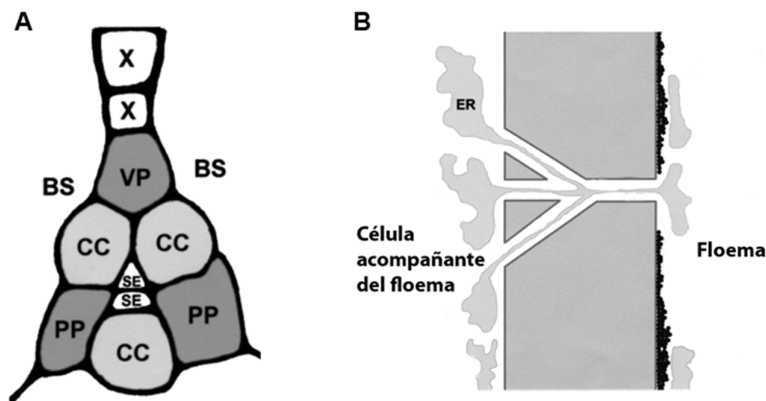


Figura 8. Complejos floema-células acompañantes. A) Arquitectura de la vena menor del tabaco compuesta por: dos elementos floemáticos (SE), tres células acompañantes (CC), dos elementos del parénquima flemático (PP), células de la vaina (BS), parénquima vascular (VP) y xilema (X). B) Esquema de una estructura de *Pore Plasmodesmal Units* (PPUs) que conecta a las células acompañantes del floema con el floema. Figura adaptada de Oparka & Cruz 2000.

1.2.3. Ciclo viral de los polerovirus en el insecto vector

El tipo de transmisión de las partículas virales de los polerovirus por medio del insecto vector es circulativa y no propagativa (Cauquil 1977) ya que el virus no replica en tejidos del insecto vector pero las partículas virales circulan a través de los tejidos del insecto. Los áfidos al alimentarse del tejido floemático de las plantas ingieren los virus incluso aquellos que normalmente no son transmitidos por áfidos que serán eliminados a través del excremento. Las partículas virales de los polerovirus atraviesan el estilete y alcanzan el lumen del intestino del insecto donde son reconocidas específicamente y transportadas por el tejido epitelial del intestino hacia el hemocele (Figura 9). La adquisición de las partículas virales en las células intestinales ocurre a

través de estructuras como vesículas revestidas de clatrina, vesículas tubulares y endosomas que contienen a los viriones (Reinbold y col., 2003). Una vez liberado, en la hemolinfa puede sobrevivir por varias semanas y luego ser transportado a la glándula salival donde completa la transmisión circulativa. Sólo aquellos virus, como los polerovirus, que son capaces de penetrar en la glándula salival y entrar en los conductos salivares son transmisibles. En las glándulas salivales accesorias, el transporte de viriones a través de las células ocurre por un mecanismo de transcitosis que implica la formación de vesículas tubulares y recubiertas antes de la liberación de viriones libres en el canal salival (Reinbold y col., 2003). Durante la alimentación y penetración en el tejido vegetal se secretan enzimas y otras sustancias a través del canal salival de los estiletes, de esta manera, los virus que se encuentran en el material de secreción salival, se inoculan en las células del hospedador durante la alimentación (Gray y Gildow 2003).

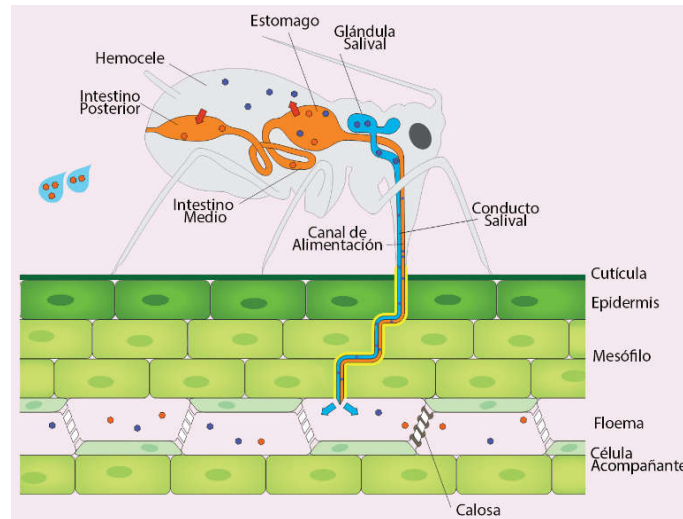


Figura 9. Esquema de la ruta circulativa de los polerovirus a través del áfido. Los virus son ingeridos y se mueven por el canal de alimentación (FC) del insecto, el intestino anterior (FG) y se acumulan en el intestino medio (MG) o posterior (HG) desde donde son adquiridos y liberados dentro del hemocele (HC). En el hemocele permanecen viables por varias semanas. Los virus aptos para ser transmitidos (hexágonos negros) son transportados dentro de la glándula salival accesoria (AG) desde donde alcanzan el conducto salival (SD) para ser inyectados en las plantas cuando los áfidos se alimentan (Gray y Gildow 2003). Figura adaptada de Züst & Agrawal (2016).

1.2.4. Características de las proteínas codificadas por los polerovirus

1.2.4.1. Proteína P0

La proteína P0 resulta de la traducción del primer ORF presente en el genoma de los polerovirus (ORF0) y posee un peso molecular aproximado de 29 kDa. Gran parte de la secuencia que codifica para esta proteína se superpone con el marco abierto de lectura de la proteína P1. A pesar de que el ribosoma encuentra primero el codón de inicio de la traducción de la proteína

P0, ambas proteínas son traducidas debido a que la secuencia en el entorno al AUG de P0 no es óptima para la traducción (turnip yellows virus; TuYV: UUGAUGCA, CLRDV: UGUAUGUU).



Figura 10. Esquema de los dominios presentes en la proteína P0 de los polerovirus. El dominio F-Box (LPXXL/IX₍₁₀₋₁₃₎P) próximo al terminal amino de la proteína mientras que en el extremo carboxilo terminal se encuentra otra secuencia conservada (K/R)YGEDGX₃FWR, (Anexo IV).

Mientras la mayoría de las proteínas virales contaban con funciones asignadas o por lo menos estimadas por sus dominios y secuencias, la función de la proteína P0 fue la última en ser determinada. Uno de los primeros estudios mostró que los mutantes de TuYV (antiguamente denominado BWYV-FL1 pero se lo definió como una nueva especie) nulos para P0 eran viables, pero en plantas inoculadas y protoplastos acumulaban entre 5 a 10 veces menos de progenie viral que el virus salvaje (Ziegler-Graff y col., 1996). El efecto estimulador de P0 en los niveles de acumulación de virus se pudo explicar años más tarde mediante ensayos de silenciamiento a través de la expresión transitoria de GFP (*Green fluorescent protein*) y la proteína en estudio en hojas de *Nicotiana. benthamiana* (línea 16c, que expresa constitutivamente GFP) asignándole la función de supresor del silenciamiento del RNA (Pfeffer y col. 2002). Se ha demostrado que las proteínas P0 de los polerovirus interactúan con las proteínas componentes del complejo SKP1-Cullin-proteína F-Box (SCF) ASK1 y/o ASK2 de *Arabidopsis thaliana*, que pertenece a la familia de las E3 ubiquitina ligasas responsables de la unión de ubiquitina a las proteínas blanco. ASK dentro del complejo media la interacción entre las proteínas con dominio F-Box, responsables de la especificidad de sustrato del complejo, y la proteína CUL1. La interacción entre P0-ASK ocurre a través del dominio F-Box que poseen las proteínas P0, indispensable para la actividad supresora del silenciamiento de P0 (Figura 10). La supresión del silenciamiento mediada por la proteína P0 está asociada a la desestabilización de la proteína AGO1 (Pazhouhandeh y col., 2006, Bortolamiol y col., 2008, Baumberger y col., 2007, Csorba y col., 2010, Almasi y col., 2015). Recientemente, Derrien y col., (2012) demostraron que la desestabilización de AGO1 inducida por P0 es mediada por la vía de la autofagia que degrada proteínas (El mecanismo completo y detallado se describe en la Sección 1.3.5.5.).

1.2.4.2. Proteína P1

El ORF1 codifica para la proteína P1, de unos 70 kDa de peso molecular y con una amplia variedad de funciones descritas, todas ellas asociadas a la replicación viral. A diferencia de lo que ocurre con el ORF0, el contexto de iniciación para la traducción de la proteína P1 (TuYV: AUAAUGUA,

CLRDV: UCCAUGAU) es más favorable debido a la presencia de dos adeninas (A) o citosina (C) río arriba del codón de iniciación. Sobre el extremo amino terminal se encuentran dos dominios transmembrana que posiblemente se encuentren asociados a la formación de complejos de replicación (Figura 11) (Hipper y col., 2013). A continuación en la secuencia se encuentra un motivo conservado de proteasa que incluye los residuos de la tríada catalítica de las serina proteasas de tipo quimotripsina H(X_{~25})[D/E](X₇₀₋₈₀)T[R/K]XGXSG (Miller y col., 1995). A diferencia de los mRNA celulares que presentan en el extremo 5' un Cap (m⁷G), el RNA viral posee una proteína de unión al genoma viral denominada *genome-linked protein* (VPg) unida covalentemente al extremo 5'. Dicha proteína se traduce dentro de la proteína P1 y es liberada gracias a la función serina proteasa presente también en la P1 (Li y col., 2007). Por último, en el extremo carboxilo terminal de la proteína se encuentra un dominio de interacción a ácidos nucleicos (Figura 11).

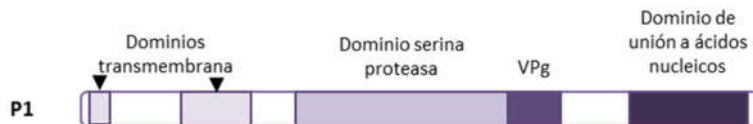


Figura 11. Proteína P1. A) Esquema de los dominios presentes en la proteína P1 de los poliovirus, sobre el extremo amino terminal se encuentran dos dominios transmembrana. A continuación, en la secuencia se encuentra un dominio con actividad serina proteasa e inmediatamente después le proteína VPg. Sobre el extremo carboxilo terminal se describió un dominio de interacción con ácidos nucleicos.

1.2.4.3. Proteína P1P2

La RNA polimerasa dependiente de RNA (RDR) de los luteovirus está codificada en el ORF2 debido a la presencia de la secuencia de aminoácidos GXXTXXXN(X₂₅₋₄₀)GDD, descrita en todas las RDRs conocidas (Kamer y Argos 1984). P2 se expresa fusionada a la proteína P1 mediante un desplazamiento -1 en el marco de lectura o *frameshift* ribosomal durante la traducción dando como producto una proteína de unos 119 kDa (Figura 12B). El ORF1 se superpone con el ORF2 (el gen de la polimerasa), requiriendo que los ribosomas que traducen el ORF1 se deslicen una base hacia la dirección 5' para traducir el ORF2. El *frameshift* que permite la síntesis de la proteína P1P2 depende de una estructura secundaria adoptada por el RNA viral denominada *pseudoknot* (Figura 12A). El sitio de *frameshift* tiene una secuencia consenso XXXYYYZ (heptanucleótido), donde X es cualquier base, Y es A o U y Z representa cualquier base excepto G. Esta secuencia consta habitualmente de una serie de tres residuos de adenina, uracilo o guanina seguidos por el tetranucleótido UUUU, AAAC o AAAU. A continuación, entre unas cinco o seis bases río abajo se encuentra el *pseudoknot* (Miller y col., 1995). El ribosoma se desliza una base hacia atrás sobre la secuencia del heptanucleótido para continuar traduciendo

en el marco -1 evitando el codón stop para P1 ubicado a unas 400 bases (CLRDV: 416 bases) río abajo del heptanucleotido.

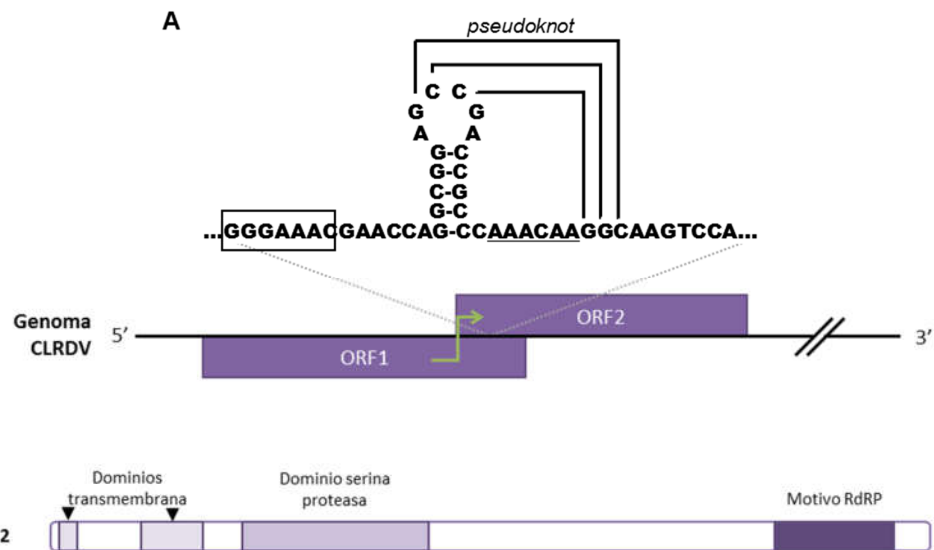


Figura 12. Proteína P1P2. A) Esquema de la estructura secundaria denominada *pseudoknot* que permite el *frameshift* y la traducción de P1P2. En el recuadro negro se indican las bases del heptanucleotido, seis bases después se esquematizan el *pseudoknot* y a continuación subrayada se encuentra otra secuencia conservada. **B)** Esquema de los dominios presentes en la proteína P1P2 de los polerovirus. El terminal amino conserva los dominios presentes en P1, próximo al extremo carboxilo se encuentra el motivo responsable de la actividad RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP).

Teniendo en cuenta que el *frameshifting* no ocurre con frecuencia durante la traducción, su ocurrencia permite regular las proporciones de ambas proteínas presentes en la célula. De esta manera, P1 está presente en gran exceso en relación con la proteína P1P2. Si bien, se desconoce la razón por la cual el virus necesita estas proteínas en esta proporción se sabe que sólo estas dos proteínas son necesarias para la replicación del gRNA del TuYV en protoplastos (Reutenauer y col., 1993). Es importante considerar que para la replicación viral probablemente no sean suficiente con las proteínas P1 y P1P2 sino que sean necesarios también productos génicos del huésped para la formación de una replicasa funcional (Miller y col., 1993).

1.2.4.4. Proteína P3

El ORF3 codifica para la proteína de cápside viral P3 o CP de aproximadamente 22 kDa. Al igual que los demás ORF del extremo 3' del genoma viral, CP se expresa a partir del RNA subgenómico (sgRNA) y su codón de inicio de la traducción (UUAAUGAA) se encuentra en un entorno desfavorable respecto del entorno de AUG del ORF4.

La CP de los polerovirus se puede dividir en dos dominios: el dominio amino terminal rico en arginina denominado dominio R, el cual probablemente se disponga en la cara interna del virión e interactúe con el gRNA viral y el dominio de envoltura o dominio S conservado que forma el núcleo del virión (Figura 13A). Se dispone de información sobre la estructura de la proteína CP del TuYV y del PLRV. La estructura tridimensional del dominio S tiene una configuración arrollada que forma un β -barril de ocho hebras mientras que en el dominio R se identificó mediante modelado informático una estructura de lámina β y se cree que el resto de la secuencia posee una estructura desordenada (Figura 13C y D) (Brault y col., 2003). Dentro del dominio R se encuentra una señal de localización (NLS) nuclear conservada entre diferentes polerovirus (PRRRRQSLRRRANR) que fue identificada como la responsable de la localización de CP del PLRV en nucléolo (Haupt y col., 2005).

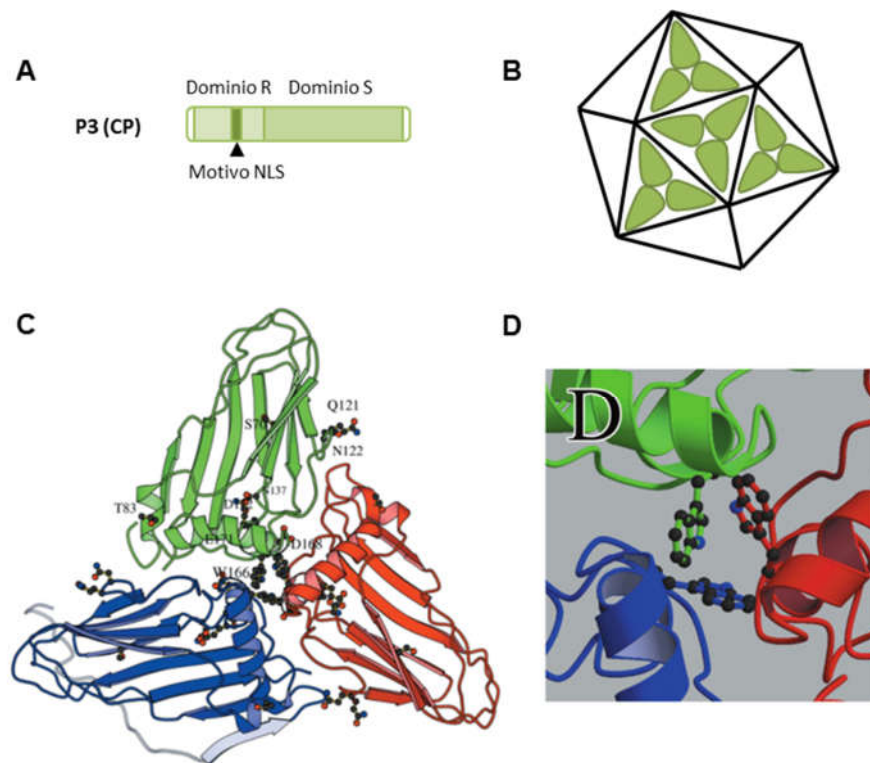


Figura 13. Proteína CP. **A)** Esquema de los dominios presentes en las proteínas CP de los polerovirus, en el extremo amino terminal se encuentra el dominio R rico en Argininas dentro del cual se encuentra la señal de localización nuclear (NLS). En el extremo carboxilo terminal se encuentra el dominio S. **B)** Disposición espacial de CP en la geometría icosaédrica de la cápside viral. **C)** Estructura tridimensional de la subunidad S de la proteína CP del TuYV obtenida por cristalografía y organización espacial en forma de trímero asimétrico para formar las caras del icosaedro. En las tres subunidades se observa la configuración arrollada en forma de β -barril de ocho hebras. La subunidad azul muestra el dominio R en azul más claro donde la lámina β se identificó por modelado informático y el resto de la secuencia del dominio R se representa como una estructura desordenada arbitrariamente dibujada. **D)** Disposición espacial de los residuos W166 de cada subunidad en el centro del trímero mostrado en el panel C. Las subunidades están coloreadas como en el panel C. Los paneles C y D fueron tomados de la publicación de Brault y col. del 2003.

La proteína de cápside (CP) es el componente primario del virión de los virus vegetales (Figura 13B) y está implicada en prácticamente todas las etapas del ciclo de la infección viral. Desempeña su función no solo en el movimiento viral sino también en la replicación y la traducción, así como en la modulación de las respuestas del huésped a la infección viral. Además, el ensamble de la partícula viral es esencial para la transmisión vectorial y determina qué insectos vectores son capaces de transmitir el virus (Doumayrou y col., 2016).

1.2.4.5. Proteína P4

El ORF4 codifica para la proteína de movimiento de aproximadamente 17 kDa. La secuencia se encuentra contenida en su totalidad dentro de la región codificante de CP. Tal como sucede en la traducción de P0 y P1, la secuencia en el entorno del codón de iniciación de P4 (UCAAUGGA) favorece su traducción respecto de la secuencia de la proteína CP (UUAAUGAA). De esta manera, a pesar de que el ribosoma encuentra primero al AUG de CP, ambas proteínas son traducidas.

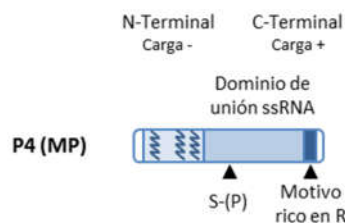


Figura 14. Proteína MP. Esquema de los dominios presentes en las proteínas MP de los polerovirus. La región amino terminal posee una carga neta negativa dentro de la cual se encuentran al menos tres α -hélices (Anexo I). La región carboxilo terminal posee un dominio de unión a RNA de cadena simple (ssRNA) con una carga neta positiva. En la región central de la proteína se encuentran los residuos de serinas (S) fosforilables y próximo al extremo carboxilo se describió un motivo rico en Argininas (R).

P4 o MP de los polerovirus presenta características en común con otras proteínas virales involucradas en el movimiento viral de una célula a otra (Figura 14, Anexo I). Se ha demostrado que la proteína P4 del PLRV tiene un dominio de afinidad por ácidos nucleicos monocatenarios de secuencia inespecífica situado en el extremo carboxilo terminal de la proteína (Tacke y col., 1993). La secuencia tiene una carga neta positiva y contiene regiones de hoja β plegada que favorecen dicha interacción (Mayo y Ziegler-Graff 1996). La unión a ácidos nucleicos es una característica común en varias MPs virales, incluyendo tobacco mosaic virus (TMV), cucumber mosaic virus (CMV) y alfalfa mosaic virus (AMV). Otra propiedad asociada a las proteínas de movimiento es la interacción MP-MP descrito para la proteína MP del TMV (Citovsky 1993) el PLRV que puede formar homodímeros (Tacke y col., 1993) y la MP del BYDV-GAV (Xia y col., 2012). El análisis de mutantes indicó que la región amino terminal es la responsable de la dimerización de MP^{PLRV} (Tacke y col., 1993) y en MP^{BYDV} se demostró que la segunda α -hélice

(Anexo I, conformada por los residuos 17-39) es suficiente para formar los homodímeros (Xia y col., 2012).

Otra característica bioquímica común en otras proteínas de movimiento es la fosforilación (por ejemplo, MP de TMV). Tanto en las plantas infectadas por PLRV como en plantas transgénicas que expresan P4, se halló que P4 sufre fosforilación (Sokolova y col., 1997) y que se encuentra predominantemente en forma fosforilada en plantas (Tacke y col., 1993). Esta modificación postraduccional podría controlar la localización de P4 en plasmodesmos o bien alterar la capacidad de unión al RNA. Si bien la introducción de restos fosfato en la región carboxilo terminal de P4 (que alberga la actividad de unión a RNA) reduciría la carga positiva neta de esta región y podría conducir a la disociación del complejo MP-RNA no se observó una inhibición en la actividad de unión de ácido nucleico de la proteína (Tacke y col., 1993). MP de PLRV es fosforilada cerca de su extremo carboxilo terminal por una proteína-quinasa de la familia de las proteínas quinasas C (PKC) y la fosforilación tiene lugar en estructuras membranosas, posiblemente en plasmodesmos (Sokolova y col., 1997). Por último, Schmitz y col. (1997) identificaron la localización subcelular de MP^{PLRV} en plasmodesmos de tejidos de floema y se observó un aumento en el tamaño de exclusión de los plasmodesmos (*size exclusion limits*: SEL) en células del mesófilo de plantas transgénicas que expresan distintos niveles de la proteína MP del PLRV (Hofius y col., 2001).

1.2.4.6. Proteína P3P5

El ORF5 se expresa producto de un mecanismo *readthrough*. Los codones de terminación UAG y UGA son reconocidos normalmente por un factor de terminación en lugar de un tRNA que detiene la traducción. En presencia de un mecanismo de *readthrough* estos codones son leídos de manera parcial por un tRNA permitiendo que la traducción continúe. Esta lectura es inducida por un *pseudoknot* o por la secuencia de pocos nucleótidos ubicadas después del codón de terminación. A diferencia de los *readthrough* conocidos, los miembros de la familia *Luteoviridae* presentan el codón *stop* de CP en un entorno muy atípico (CN AAA **UAG** GUA GAC). Sin embargo, se han identificado dos regiones dentro del ORF5 que favorecen la expresión del ORF5 (Brown y col., 1996, Bruyère y col., 1997). La primera de ellas se encuentra entre unas 6 a 15 bases a continuación del codón UAG y está formada por un bloque rico en citosinas (C) que contiene, según la especie, entre 7 a 16 repeticiones en tándem de CCN NNN. La segunda de ellas se encuentra entre 600 y 700 bases río arriba del codón UAG de CP (Figura 15A). El resultado es una proteína de fusión llamada proteína P3P5 o RT (*readthrough*) de 74 kDa (Figura 15B). Dentro de la estructura de esta proteína se encuentra CP y a continuación una zona en la cual aminoácido

de por medio se encuentra una prolina que se cree que funcionaría como una bisagra molecular entre la estructura de CP y el resto del dominio RT (Brown y col., 1996). A continuación, se encuentra una región muy conservada que estaría asociada con la interacción de la particular viral y el insecto vector (Bruyère y col., 1997). Por el contrario, la región carboxilo terminal presenta mucha variabilidad entre las especies de polerovirus, es estructuralmente desordenada y se supone que podría adoptar diferentes conformaciones en las células vegetales (Boissinot y col., 2014). Respecto a su función, se demostró que es importante para limitar la localización de PLRV en floema (Hipper y col., 2013) y estaría implicada en el desarrollo de los síntomas en el hospedador y en el título viral (Bruyère y col., 1997).

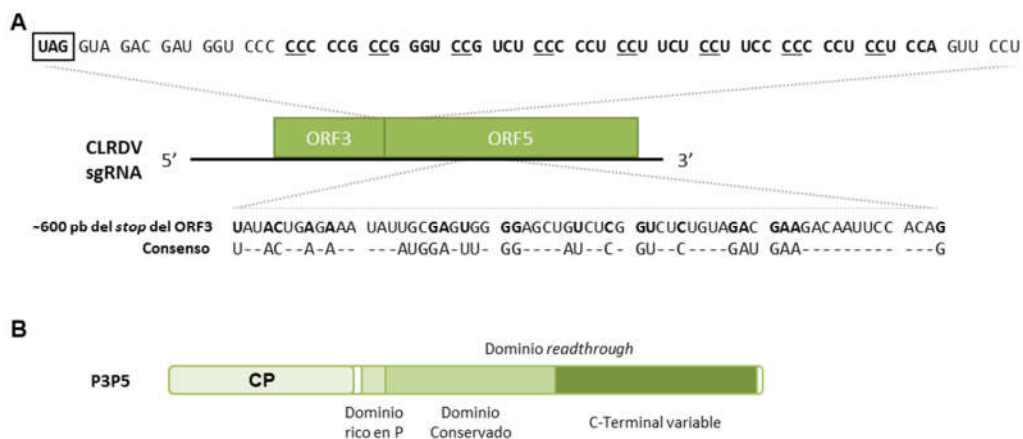


Figura 15. Proteína P3P5. A) Secuencias del genoma viral del CLRVDV implicadas en el mecanismo de *readthrough* que permite la traducción del ORF5 a continuación del ORF3. El consenso fue tomado de (Brown y col., 1996). **B)** Esquema de los dominios presentes en la proteína P3P5 de los polerovirus. El terminal amino conserva los dominios presentes en P3 a continuación, se encuentra una región rica en residuos de prolina (P) y la región más conservada de la RT. El extremo carboxilo es muy variable entre las especies de polerovirus.

Además de su compleja función en el movimiento del virus y la limitación del virus en el floema, la proteína RT es un factor clave en la transmisión viral mediada por los áfidos, ya que interviene en el transporte del virus a través de las células del intestino áfido (Peter y col., 2009, Brault y col., 1995, Wang y col., 1995).

1.2.4.7. Proteína P3a

Recientemente, a través de un análisis estadístico realizado sobre un gran número de secuencias virales de polerovirus alineadas se ha identificado un nuevo ORF localizado cerca del extremo 5' del sgRNA (Smirnova y col., 2015). Se denomina ORF3a y su traducción se inicia en un codón de inicio no canónico ubicado río arriba del ORF3. Es una proteína muy pequeña de 5,1 kDa y 45 residuos de aminoácidos. Presenta un dominio transmembrana que involucra 27 aminoácidos de la secuencia completa de la proteína (MDYKFLSGFTAGFLVAVPISTLGLYLIYLVKSAHV

RQIVNEYGRG). El análisis funcional de la proteína P3a se llevó a cabo en el TuYV en el cual la traducción del ORF3a comienza en un codón ACG. El ORF3a fue traducido *in vitro* a partir del sgRNA y ensayos de inmunodetección confirmaron la expresión de P3a en protoplastos infectados y en plantas agroinoculadas.

Las mutaciones que inhiben la expresión de P3a, o aquellas que promueven la sobreexpresión de P3a, no afectan a la replicación de TuYV ni en protoplastos ni en hojas de *A. thaliana* inoculadas con el virus. Sin embargo, ambas mutaciones afectan la movilidad viral de larga distancia, impidiendo la infección viral a nivel sistémico. La expresión de P3a en *trans*, a partir de un vector viral o un plásmido, complementa el movimiento de un mutante TuYV que carece del ORF3a. Estudios de localización subcelular empleando P3a fusionada a proteínas fluorescentes revelaron que P3a está localizada en Golgi y plasmodesmos, consistente con su función en el movimiento viral (Smirnova y col., 2015).

A partir del descubrimiento de esta proteína implicada en el movimiento sistémico del virus surgen nuevos interrogantes respecto del modo de acción combinado o independiente entre P3a y P4. Puede ser que actúen cooperativamente sobre la misma entidad viral (viriones o complejos ribonucleoproteicos, RNP), o que una de ellas promueva el movimiento de RNP y la otra de viriones completos. Es posible que cada una de ellas sea funcional en PD específicos de ciertas células del floema, en determinadas etapas de desarrollo o incluso en huéspedes específicos. Teniendo en cuenta que se ha demostrado que en ausencia de P3a el transporte de larga distancia de TuYV se ve afectado, parecería más probable que P3a desempeñe un papel en el movimiento viral a través de PPU (Smirnova y col., 2015).

1.3. Mecanismos de defensa antiviral

1.3.1. Mecanismos de defensa

De acuerdo a los conocimientos adquiridos en el estudio de patógenos bacterianos y fúngicos, la inmunidad en plantas se puede dividir dos niveles que se describen a través del modelo en zigzag (Figura 16). La primera de ellas denominada PTI (*PAMP-triggered immunity*: inmunidad desencadenada por PAMPs) se basa en la detección de moléculas altamente conservadas llamadas PAMP (*Pathogen-associated molecular patterns*: patrones moleculares asociados a patógenos) mediante receptores específicos en la célula vegetal (PRPs: receptores transmembrana de reconocimiento de PAMPs o citosólicos NB-LRR: *nucleotide-binding and leucine-rich repeat domain*). Ese reconocimiento desencadena la activación de proteínas quinasas (MAPK: *mitogen-activated protein kinases*, quinasas activadas por mitógenos) que median la

producción de especies reactivas de oxígeno y la síntesis de ácido salicílico. Para eludir esta primera defensa, muchos microorganismos adaptados al hospedador producen proteínas efectoras que suprimen el PTI. La segunda línea de defensa se denomina ETI (*Effector-triggered immunity*: inmunidad desencadenada por efectores) es desencadenada como respuesta a la supresión del PTI mediante proteínas R que reconocen directamente los efectores de virulencia patógena o detectan las consecuencias moleculares de su acción contra el PTI. La ETI resultante desencadena en un principio la muerte celular en un proceso conocido como respuesta hipersensible (HR), que restringe el crecimiento del patógeno y se acompaña de una potente respuesta de defensa sistémica mediada por ácido salicílico (SA).

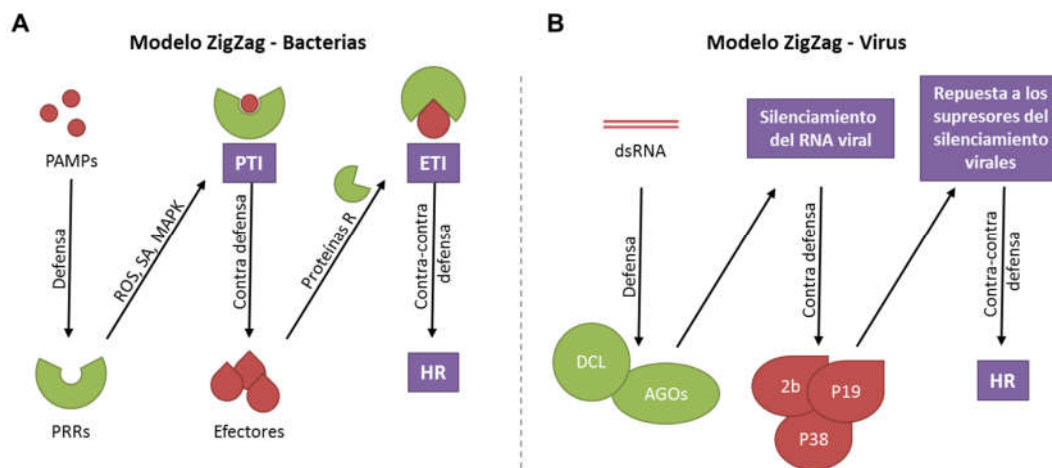


Figura 16. Inmunidad en plantas. Las respuestas inmunes de las plantas contra patógenos se describen a través del modelo en zigzag. **A) Representación esquemática de la respuesta inmune innata durante las interacciones planta-bacteria.** Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones transmembrana (PRRs) y activan la inmunidad desencadenada por PAMP (PTI). Los patógenos producen efectores que interfieren con el PTI. Algunos efectores, o sus consecuencias moleculares, son reconocidos o detectados por las proteínas de resistencia a enfermedades (R) resultando en el inicio de la inmunidad desencadenada por el efector (ETI). Esto da como resultado resistencia a la enfermedad y, usualmente, una respuesta hipersensible de muerte celular (HR) en el sitio de la infección. **B) Representación esquemática de la respuesta inmune innata del silenciamiento del RNA durante las interacciones planta-virus.** Los RNA doble cadena víricos (dsRNAs) son procesados por DCL y AGOs para desencadenar la defensa antiviral mediada por el silenciamiento del RNA. Para contrarrestar esta respuesta, los virus expresan supresores virales del silenciamiento del RNA que inhiben esta vía de defensa. Las plantas han desarrollado estrategias de contra-contra-defensa que detectan la presencia de las proteínas supresoras del silenciamiento, o sus consecuencias moleculares. Abreviaturas: ROS, especies reactivas de oxígeno; SA, ácido salicílico; MAPK, proteína-quinasa activada por mitógenos; PTI: *PAMP-triggered immunity*, inmunidad desencadenada por PAMPs; PAMP: *Pathogen-associated molecular patterns*, patrones moleculares asociados a patógenos; PRPs: receptores transmembrana de reconocimiento de PAMPs; MAPK: *mitogen-activated protein kinases*, quinasas activadas por mitógenos; ETI: *Effector-triggered immunity*, inmunidad desencadenada por efectores; HR: respuesta hipersensible. Figura adaptada de Incarbone & Dunoyer 2013.

En el escenario de una infección viral, el dsRNA (RNA doble cadena) viral es un PAMP, ya que se encuentra siempre asociado con la replicación viral. Similar a PTI, este PAMP viral será procesado por las enzimas DICER-LIKE (DCL) y cargada por las proteínas AGOs que median la respuesta antiviral mediante el silenciamiento génico. Por analogía con el modelo en zigzag, siendo los

supresores del silenciamiento del RNA efectores de virulencia que interfieren con la maquinaria de silenciamiento celular, las plantas han desarrollado genes *R* que, reconocen directamente estas proteínas o perciben las modificaciones producidas sobre la vía del silenciamiento. Estas proteínas desencadenan una respuesta hipersensible impidiendo la replicación y la propagación del virus y permitiendo que las plantas se recuperen de la infección. Existen al menos tres ejemplos de proteínas supresoras del silenciamiento P38 del turnip crinkle virus (TCV), 2b del tomato aspermy virus (TAV) y P19 del tomato bushy stunt virus (TBSV) que desencadenan respuestas del tipo ETI (Pallas y García 2011, Alvarado y Scholthof 2012).

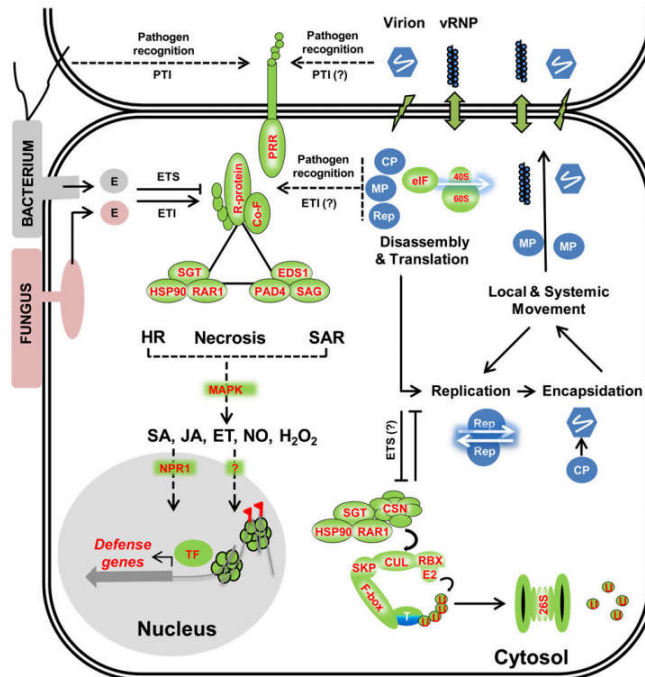


Figura 17. Mecanismos moleculares de la respuesta inmune. De forma similar a los eventos que se producen durante las respuestas inmunes desencadenadas por bacterias y hongos, las moléculas efectoras asociadas a virus (proteínas de la cápside viral o supresores del silenciamiento) son percibidos por receptores en la superficie de la célula (PRRs) o en el citosol (NB-LRR, proteínas R) y desencadenan las respuestas ETI culminando en HR, SAR (resistencia sistémica adquirida), y/o fenotipos de necrosis. Las respuestas ETI frente a patógenos implican la formación de los complejos SGT1/RAR1/HSP90 y EDS1/PAD4/SAG101 que, combinados con las proteínas virales, proteínas R, cofactores R (Co-F) desencadenan la señalización mediada por MAP quininas (MAPK) y median los cambios en los niveles de ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA), etileno (ET), óxido nítrico (NO) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). NPR1 (NON-RACE SPECIFIC DISEASE RESISTANCE 1), es una proteína de localización nuclear y citoplásmica crítica para las respuestas de defensa mediadas por SA, sin embargo, la mayoría de las respuestas de SA activadas por virus parecen ser independientes de NPR1. Además de los cambios transcripcionales mediados por factores de transcripción (TF), los virus también desencadenan modificaciones de la cromatina incluyendo cambios en la metilación del DNA (banderas rojas) y aumento de las tasas de recombinación homóloga. El complejo SGT1/RAR1/HSP90 también interactúa con los componentes de los complejos SCF ubiquitina ligasa para mediar la degradación de las proteínas víricas o del hospedador (T) en proteosoma 26S. Figura tomada de Mandadi & Scholthof 2013.

Ya sea que provienen de bacterias, hongos o virus, las moléculas efectoras alteran de manera similar el estado metabólico y fisiológico de las células del hospedador. Los componentes implicados en la señalización tales como los complejos SGT1/RAR1/HSP90 (SUPPRESSOR OF THE

G2 ALLELE OF SKP1/REQUIRED FOR MLA 12 RESISTANCE1/HEAT SHOCK PROTEIN 90) y EDS1/PAD4/SAG101 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1/PHYTOALEXIN DEFICIENT 4/SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 101) median las respuestas de resistencia frente a diversos patógenos virales y no virales sugiriendo que las plantas han desarrollado mecanismos de resistencia a enfermedades de amplio espectro para defenderse simultáneamente frente a diversos tipos de patógenos (Mandadi y Scholthof 2013).

1.3.2. Ubiquitinación de proteínas y complejos SCF

La unión de Ub a proteínas celulares (conocido como ubiquitinación) está implicada en la regulación de muchas vías de señalización, y juega un papel importante en la homeostasis de proteínas. La ubiquitinación consiste en tres fases, cada una de ellas dependiente de una enzima diferente: i) activación de Ub a través de una enzima activadora de ubiquitina (E1) durante la cual Ub se transfiere sobre la proteína de clase E1; ii) transferencia de Ub de la enzima E1 a una enzima de conjugación de ubiquitina (E2); iii) transferencia de Ub de la enzima E2 al sustrato proteico mediado por una ligasa E3, que coordina la ubiquitinación proporcionando una plataforma de acercamiento físico entre las enzimas E2 y los sustratos específicos. Las ligasas E3 constituyen una gran familia de proteínas que median la especificidad de la ubiquitinación, y como tales constituyen blancos moleculares muy atractivos para los patógenos virales (Alcaide-Loridan y Jupin 2012).

El complejo SCF ubiquitina ligasa debe su nombre a las siglas de las proteínas que lo componen: SCF, SKP1–CUL1–FBP (proteína F-box, Figura 20). La subunidad cullin (CUL1) funciona como un andamiaje capaz de interactuar simultáneamente en el extremo amino con la proteína adaptadora SKP1 (S-phase-kinase-associated protein-1, proteína asociada a la kinasa de fase S) y en el extremo carboxilo con una proteína RING-finger (Rbx1, que también es conocido como Roc1, o Roc2). A su vez la enzima específica E2 se asocia a CUL1 en el extremo carboxilo. Por otra parte, SKP1 se une a una de las muchas FBPs quien le confiere especificidad de sustrato al complejo interactuando con un número discreto de sustratos a través de un dominio de interacción proteína-proteína (Cardozo y Pagano 2004). La ubiquitinación de proteínas puede tener diferentes funciones en la célula dependiendo del tipo de evento de ubiquitinación (mono- o poly-ubiquitinación), la longitud (de alrededor de cuatro moléculas de Ub) y el tipo de ramificación de la cadena (Alcaide-Loridan y Jupin 2012).

1.3.3. Silenciamiento del RNA endógeno en *Arabidopsis thaliana*

El silenciamiento del RNA es activado por RNA doble cadena (dsRNA). Estas moléculas se producen endógenamente a partir de la transcripción de los genes MIR que codifican para microRNA (miARN) o bien el RNA autocplementario producido por *loci* de repetición invertida (IR) o por transcripción superpuesta, bidireccional o convergente. El RNA aberrante, producido especialmente por los transposones, también puede producir dsRNA por la acción de las RNA polimerasas dependientes de RNA (RDRs) codificadas por *A. thaliana*. El dsRNA es procesado en dúplex de 21-24 nucleótidos (nt) de RNA por una de cuatro enzimas DCL con actividad de ribonucleasa tipo III (Figura 18). Los siRNA doble cadena producidos son protegidos de la degradación por 2'-O-metilación mediada por la metiltransferasa HUA ENHANCER 1 (HEN1). Tras el clivaje por DCL, los siRNA o los dúplex de miRNA se incorporan en una de las diez proteínas AGO para formar el complejo RISC. Los RISC pueden dirigirse a los mRNA complementarios a los siRNA o miRNA cargados en el complejo e inducir su silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS), ya sea escindiendo el mRNA o bien reprimiendo la traducción (Figura 18). Los RISC también pueden inducir el silenciamiento génico transcripcional (TGS) por metilación del DNA y modificaciones de la cromatina (Vaucheret 2006, Pumplin y Voinnet 2013).

Los miembros de las familias DCL y AGO en *A. thaliana* son específicos de distintos mecanismos de silenciamiento. La mayoría de los miRNAs son procesados en dúplex de 21 nt, constituidos por una hebra guía y una hebra pasajera conocida como miRNA*, que generalmente se degrada. El procesamiento es producido en el núcleo por DCL1 acompañada de un cofactor de unión a dsRNA denominado HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1). En su transporte al citoplasma, los miRNAs maduros se cargan en AGO1 (Figura 18A). Por otra parte, los dsRNA largos producidos por la RDR2 a partir de transcriptos sintetizados por la RNA polimerasa IV son procesados por DCL3 en siRNA de 24-nt. Los transcriptos que dan origen a estos siRNA son codificados a partir de repeticiones presentes en el genoma de la planta es por ello que reciben el nombre de siRNAs asociados a repeticiones (rasiRNAs). Los rasiRNAs se cargan principalmente en AGO4 y en segunda medida en AGO6 o AGO9 para iniciar la metilación de DNA dirigida por RNA (RdDM) mediante las proteínas DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE (DRM). Los blancos de estas metilaciones son los mismos *loci* que dieron origen a los rasiRNA y utilizan transcritos producidos por Pol V como puente. Se trata de un mecanismo autoregulatorio para inhibir la transcripción de secuencias repetitivas en el genoma. El silenciamiento génico transcripcional

en estos *loci* también podría afectar a la expresión de genes vecinos que codifican proteínas funcionales (Figura 18B).

Los siRNAs de 21 y 22 nt producidos a partir del procesamiento de dsRNA derivado de RNA no codificante, mRNA o RNA antisentido, son procesados a través de la acción redundante, pero jerárquica de DCL4 y la DCL2 y posteriormente cargados en AGO1 o AGO2. Particularmente, la síntesis de siRNAs dependientes de DCL4 requiere de la participación de la DOUBLE STRANDED-RNA BINDING PROTEIN 4 (DRB4) que optimiza su actividad (Figura 18C).

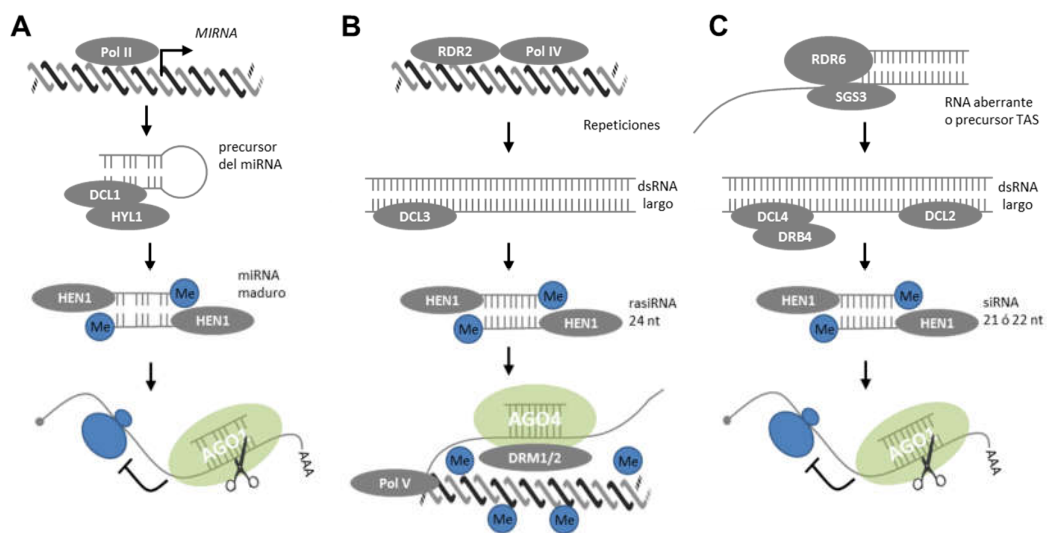


Figura 18. Rutas de silenciamiento del RNA endógeno en *A. thaliana*. A) Procesamiento de miRNA. B) Producción de rasiRNA. C) siRNA provenientes de RNA no codificante, mRNA o RNA antisentido. MIRNA: genes MIR que codifican para microRNA (miARN); Pol II, Pol IV, Pol V: RNA polimerasa II, IV y V; RDR: RNA polimerasas dependientes de RNA; DCL: proteína Dicer-like; HEN1: HUA ENHANCER 1; HYL1: HYPONASTIC LEAVES 1; rasiRNA: siRNAs asociados a repeticiones; DRM: DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE; SGS3: SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3; DRB4: DOUBLE STRANDED-RNA BINDING PROTEIN 4.

Dado que los siRNA derivados de transposones, virus y transgenes dirigen la degradación de los RNA de los que derivan, son siRNAs de acción *cis* y el fenómeno se denomina auto-silenciamiento (Bartel 2004). En contraste, los miRNAs son pequeños RNAs endógenos que son producidos por genes distintos de los genes que regulan se conoce como hetero-silenciamiento (Bartel 2004). Por último, los siRNA de acción en *trans* (tasiRNA) son procesados por DCL4 y derivan de los genes TAS. Los genes TAS se transcriben como RNA primarios largos que no codifican proteínas y funcionan como precursores para la producción de tasiRNA. Los RNA primarios de TAS son escindidos por miRNAs específicos, estos RNAs aberrantes promueven el reclutamiento de la RDR6 y su cofactor SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3 (SGS3) para convertir uno de los dos productos de la escisión en dsRNA que finalmente será procesado por DCL4 para

generar los tasiRNA de 21 nt que serán dirigidos a familias de múltiples genes (Vaucheret 2006, Pumplin y Voinnet 2013).

1.3.4. Silenciamiento de RNA como mecanismo de defensa antiviral

Además de su papel en el desarrollo y en el mantenimiento de la integridad del genoma, el silenciamiento del RNA constituye el principal sistema inmune de la planta contra los virus. El silenciamiento antiviral es desencadenado por intermediarios de dsRNA o estructuras intramoleculares producidas durante la replicación del genoma viral. Estos dsRNAs virales son procesados por DCL4 o su sustituto DCL2, para producir siRNA derivados de virus de 21 o 22 nt (vsRNAs). vsRNAs son posteriormente reclutados, principalmente por AGO1 y AGO2, para ensamblar RISCs antivirales y dirigir el silenciamiento del RNA contra el genoma viral (Figura 19).

Para contrarrestar la replicación y movimiento del virus, las plantas también han desarrollado medios para amplificar la respuesta silenciadora antiviral. Esto ocurre a través de la producción de los llamados vsRNAs secundarios. En contraposición a los vsRNAs primarios que se generan directamente a partir de las estructuras o intermedios de replicación del RNA viral, estos vsRNAs secundarios se producen a través de la actividad celular de RDRs, que convierten RNA simple cadena (ssRNA) en nuevo dsRNA que será sustrato para el procesamiento de DCLs (Figura 19). Las RDR1, RDR6 y, en menor medida, RDR2 han sido implicadas en este paso de amplificación de vsRNA que representa el mayor volumen de siRNAs antivirales producido en *A. thaliana*. La maquinaria del silenciamiento del RNA corta las estructuras de dsRNA viral, dando lugar a siRNAs que conducen a los complejos RISC a la degradación de genoma viral y/o inhibir su traducción. Sin embargo, mRNAs de algunos genes del hospedador también puede ser blanco de degradación de los RISC cargados con vsRNAs. Se ha demostrado recientemente que los síntomas de la enfermedad causados por el RNA satélite del CMV son la consecuencia del silenciamiento dirigido por vsRNA contra el gen de la biosíntesis de la clorofila CHLI (Pallas y García 2011). Asimismo, la respuesta antiviral no queda confinada a una célula autónoma infectada, sino que mediante el movimiento sistémico del RNA antiviral, el silenciamiento se vuelve sistémico incluso antes de que el virus colonice esas células. De esta manera la replicación o el movimiento del patógeno en esas células se retrasa o se inhibe (Incarbone y Dunoyer 2013).

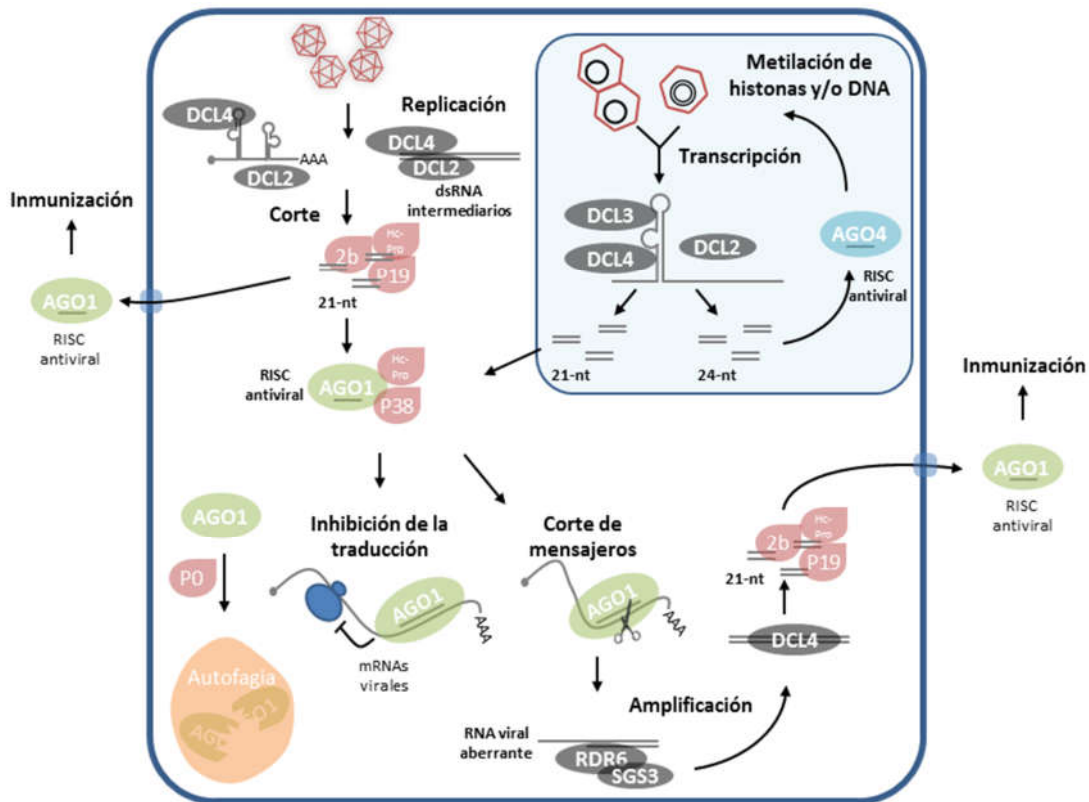


Figura 19. Silenciamiento génico antiviral y supresores del silenciamiento codificados por virus en plantas. El silenciamiento del RNA viral es desencadenado por intermediarios de RNA doble cadena producidos durante de la replicación del virus (dsRNA) o por estructuras apareadas intramoleculares. Son procesados en siRNA pequeños derivados de virus (vsRNAs) por las enzimas del tipo RNasaIII DCL4, DCL3 Y DCL2. Estos vsRNAs se cargan en AGO y le confieren especificidad de sustrato a los complejos RISC. El silenciamiento puede ocurrir a través de la inhibición de la traducción y/o por la escisión del RNA viral. Los RNAs virales clivados también son utilizados por RNA polimerasas dependientes de RNA celulares (RDRs) y sus cofactores (SGS3) para amplificar la respuesta de silenciamiento del RNA mediante la producción de más sustratos de dsRNA para el procesamiento de DCL. Tanto los siRNAs primarios como los secundarios tienen el potencial de pasar a las células vecinas a través de plasmodesmos para desencadenar la respuesta antiviral. Para los virus de DNA, también se produce una gran proporción de vsRNA de 24 nt por la acción de la DCL3. Estos vsRNAs 24 nt dirigen la metilación del DNA y/o histonas de los genomas virales. Los supresores virales del silenciamiento génico pueden inhibir varias etapas de esta vía, evitando así el cortado del dsRNA, la carga de vsRNA, la formación o actividad RISC, la amplificación y/o el movimiento sistémico de la señal. Se encuentran esquematizados los pasos en los que intervienen algunos de los supresores mencionados en el texto (P19, P38, 2b, P0). Figura adaptada de Incarbone & Dunoyer (2013).

En las plantas infectadas con virus de DNA (gemini- y pararetrovirus), también se produce una gran cantidad de vsRNA de 24 nt dependiente de la acción de DCL3. Estos 24 nt vsRNAs median la metilación de citosina y la condensación de cromatina viral presentes en el núcleo como episomas y mini-cromosomas, a través de la actividad de AGO4 (Figura 19) (Incarbone y Dunoyer 2013).

1.3.5. Supresores del silenciamiento generales

Aun cuando no se conocía el mecanismo con el cual interferían en el hospedador, las proteínas supresoras del silenciamiento habían sido identificadas como factores de virulencia asociadas a

la patogenicidad de los virus. Desde el descubrimiento de los supresores del silenciamiento, se han descrito tres estrategias principales de inhibición del silenciamiento génico. La primera de ellas implica la unión al dsRNA de cadena largo inhibiendo el procesamiento mediado por DCL. La segunda involucra la unión al dúplex de siRNA, evitando el ensamblado del complejo RISC. Este proceso también inhibe la propagación de la señal silenciadora a células vecinas y así también a regiones distantes de la planta. La tercera estrategia de los supresores es inhibir la acción o desestabilizar los efectores de la vía del silenciamiento. Por ejemplo, inhibiendo la proteína AGO1, impidiendo así el clivaje del RNA viral mediado por los siRNA primarios y la generación de nuevas señales silenciadoras antivirales por medio de la formación de siRNA secundarios (Hipper y col., 2013, Incarbone y Dunoyer 2013).

El mecanismo de silenciamiento génico no solo involucra el procesamiento viral, sino que es vital para la célula en la regulación génica mediada por miRNA. En este sentido, el análisis de siRNA cargados en las proteínas AGO1 durante una infección viral reveló la existencia de al menos dos grupos de AGO1, uno de ellos cargado con siRNA, y el otro con miRNA pero ambos están afectados de manera diferente por los supresores del silenciamiento virales (Schott y col., 2012). Por ejemplo, P38, P15 y HC-Pro, a diferencia de P19, previenen la carga de siRNA pero no de miRNA en AGO1, sin embargo, todos ellos inhiben eficazmente la actividad de los complejos siRISC y miRISC. El cofactor celular que permite diferenciar específicamente estos dos grupos de RISCs fue descrito recientemente y se trata de un factor de transcripción inducible por etileno denominado RAV2/EDF2 (Endres y col., 2010).

1.3.5.1. Actividad supresora de la proteína P38

La proteína P38 además de ser la proteína de cápside viral es el supresor del silenciamiento del turnip crinkle virus (TCV). Los primeros estudios de la proteína P38 realizados *in vitro* indicaban que este supresor ejercería su función mediante el secuestro o la protección del dsRNA largo del procesamiento mediado por las DCL. Sin embargo, hay evidencia que demuestra que P38 inhibe la actividad de DCL4 al mismo tiempo que se observó una fuerte acumulación vsRNA de 22 nt dependientes de la actividad de DCL2 en *A. thaliana* (Incarbone y Dunoyer 2013). A su vez, P38 interactúa directamente con AGO1 a través del dominio de glicina/triptófano (GW/WG) que presenta en común con las proteínas codificadas en el huésped requeridas para el ensamblaje y función de RISC. Esta unión de P38 a AGO1 afecta no solo la funcionalidad de AGO1 cargada con siRNA sino también de aquellas cargadas con miRNA. Por otro lado, la regulación de DCL1 mediada por miR162 es suprimida por P38 en una forma dependiente del motivo GW, dando lugar a un aumento de la acumulación de DCL1. Este aumento, a su vez, promueve un cambio

drástico en la homeostasis de las demás DCL por el cual se acumulan DCL3 y DCL4, pero no DCL2 (Azevedo y col., 2010).

1.3.5.2. Actividad supresora de la proteína P19

P19 es la proteína supresora del silenciamiento del tomate bushy stunt virus (TBSV) y otros miembros del género *Tombusvirus*. Actúa como un homodímero que se une selectivamente al dúplex de siRNA de 21-bp producidos por DCL4 impidiendo la carga del siRNA en AGO1 y bloqueando la difusión de la señal del silenciamiento a células vecinas (Csorba y col., 2015). No solo impide la incorporación de siRNA en AGO1 sino también de miRNA. Además, regula los niveles de AGO promoviendo la transcripción del miR168 que regula negativamente AGO1 (Várallyay y col., 2010).

1.3.5.3. Actividad supresora de la proteína HcPro

Hc-Pro es el supresor del silenciamiento de los potivirus. Los estudios funcionales sobre la actividad supresora del silenciamiento de Hc-Pro mostraron que la proteína es capaz de unirse a los siRNA y por lo tanto reprime la carga de nuevos siRNA en los complejos RISC impidiendo el paso de amplificación por los RDRs de planta (Lakatos y col., 2006). Actúa secuestrando siRNA pero a diferencia de P19, impide la incorporación de siRNA en AGO1 sin afectar la carga de los miRNA. A su vez, suprime la metilación del terminal 3' de siRNA mediada por HEN-1 (Ebhardt y col., 2005, Jamous y col., 2011). Recientemente, se identificó un factor de transcripción RAV2 inducido por la vía de defensa de etileno necesario para la supresión del silenciamiento mediada por Hc-Pro (Endres y col., 2010).

1.3.5.4. Actividad supresora de la proteína 2b

La proteína 2b es el supresor del silenciamiento del CMV y presenta dos mecanismos mediante los cuales inhibe el silenciamiento. El primero implica la interacción física con la proteína AGO1 mediante la cual bloquea su actividad endoribonucleasa (Zhang y col., 2006). En segundo lugar, secuestra siRNAs doble cadena impidiendo que sean cargados en AGO1 y bloqueando el movimiento sistémico de la señal del silenciamiento (Goto y col., 2007). Es difícil determinar la contribución de cada una de estas funciones en el proceso de infección del CMV sin embargo es evidente que además de suprimir el silenciamiento, la proteína 2b, facilita la propagación del virus en la planta a nivel local y sistémico.

1.3.5.5. Mecanismo de acción descrita de P0

Para dilucidar el mecanismo de acción de la proteína P0 se realizó un *screening* en una biblioteca de cDNA de *A. thaliana* mediante el cual se identificaron las proteínas componentes de los complejos SCF ASK2 (At5g42190) y ASK1 (ARABIDOPSIS SKP1-LIKE 1 y 2, donde SKP1 es S PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 1) como blancos de interacción con la proteína P0 del TuYV y CABYV. Además, identificaron mediante triple híbrido en levaduras (o *yeast-bridging assay*) que P0 se incorpora en un complejo trimérico con CUL1 (CULLIN 1) y ASK1 o ASK2 (Pazhouhandeh y col., 2006). Los complejos SCF dependen de la interacción de la proteína ASK el dominio F-box presente en la proteína P0 de los poliovirus. En ese mismo trabajo se identificó el dominio F-box como el responsable de dicha interacción mediante el análisis por doble híbrido de la interacción de mutantes de P0^{TuYV} sin este dominio y las proteínas ASK. Además, se identificó la vinculación de F-Box con la patogenicidad de P0 a través de ensayos de infección con PVX que expresan P0^{TuYV} y sus mutantes.

Hasta aquí se conocía la importancia del dominio F-box en la actividad supresora de P0^{TuYV} y su interacción con el complejo SCF ubiquitina ligasa pero restaba completar el mecanismo de acción y definir cómo podía interferir con la vía del silenciamiento génico postranscripcional. Años más tarde, se retomaron los estudios en TuYV y a partir de ensayos de expresión transitoria de GFP y una horquilla silenciadora denominada hpGF en *N. benthamiana* se logró dilucidar que P0^{TuYV} no afecta la producción siRNAs primarios si no que actúa a nivel de la proteína ARGONAUTA 1 (AGO1) (Bortolamiol y col., 2007, Baumberger y col., 2007). Además, el análisis de plantas transgénicas que expresan P0^{TuYV} reveló características similares a las observadas en un mutante hipomorfo para *ago1* (fuertes anomalías en el desarrollo y acumulación de mRNA de genes blanco de miRNA), brindando más evidencias de que P0 interfiere con el complejo mediador del silenciamiento inducido por RNA (RISC) siendo AGO1 su blanco molecular (Bortolamiol y col., 2007). Para comprobarlo dos grupos trabajando en paralelo emplearon dos estrategias diferentes. Bortolamiol y col. (2007) contando con una línea transgénica de *A. thaliana* que expresa P0^{TuYV} de manera inducible intrograsaron dicho gen en la línea que expresa AGO1 fusionada al *tag* FLAG (denominada *FLAG-AGO1/ago1-36*). Una vez obtenida la doble mutante la inducción de la expresión de P0 conduce a una caída en los niveles de FLAG-AGO1, sin modificar los niveles de transcritos de AGO1. Para comprobar la existencia de una interacción física entre ambas proteínas realizaron ensayos de coimmunoprecipitación *in vitro* y experimentos de BiFC que proporcionaron pruebas concretas de una interacción física entre P0 y AGO1 *in vitro* e *in vivo*. Además, BiFC permitió localizar la interacción entre P0 y AGO1 en el

núcleo lo cual es consistente con la localización subcelular de ASK1, ASK2 y AtCUL1 y la noción de que la ubiquitinación por los complejos SCF ocurre principalmente en este compartimento celular (Bortolamiol y col., 2007). Por otra parte, en paralelo Baumberger y col. (2007) observaron el efecto de P0^{TuYV} sobre la estabilidad de AGO1 a través de la expresión transitoria de ambas proteínas en *N. benthamiana*. Además, identificaron al dominio PAZ junto con el dominio N-terminal adyacente de AGO1 como los responsables de la susceptibilidad a P0. Empleando inhibidores del proteosoma pudieron definir que P0^{TuYV} desestabiliza a la proteína AGO1 mediante un mecanismo independiente de la vía clásica de degradación en proteosoma. Otros autores en un abordaje diferente lograron identificar que la P0^{TuYV} impide el ensamblaje de nuevos RISC sin afectar los complejos preexistentes al momento de iniciada la infección (Csorba y col., 2010).

Las proteínas F-Box endógenas de plantas interactúan con los blancos moleculares a través del carboxilo terminal donde poseen algún motivo conocido de interacción con proteínas, tales como una repetición rica en leucina (LRR) o un dominio Kelch. Pero, esos motivos no están presentes en P0, sin embargo, posee una secuencia carboxilo terminal (K/R)IYGEDGX₃FWR (Figura 10) que podría representar un tipo de dominio de interacción con sustrato no descrito previamente (Pazhouhandeh y col., 2006). Los análisis de mutantes en este dominio de la proteína P0 del *Melon aphid-borne yellows virus* (MABYV) y del PLRV revelan que la actividad supresora es dependiente principalmente de los residuos F211 (fenilalanina) y W212 (triptófano) (Han y col., 2010, Zhuo y col., 2014).

Finalmente, utilizando la línea transgénica inducible para la expresión P0^{TuYV} se determinó que la degradación de AGO1 mediada por P0^{TuYV} es dependiente de la vía de la autofagia. Además, estudios de localización subcelular de la proteína AGO1 fusionada a GFP y marcadores de autofagia demostraron que AGO1 colocaliza con los cuerpos positivos de la proteína 8a (ATG8a) relacionada con la autofagia (Derrien y col., 2012).

Si bien se cree que hay un mecanismo de acción general para las proteínas P0 que ha sido verificado en diferentes especies dentro del género, en bibliografía se encuentran descritas diferentes características de la actividad supresora dependiendo de la especie de la cual provenga la proteína P0. Se han hallado desde proteínas sin actividad supresora del silenciamiento o con intensidades de supresión variable hasta actividad supresora del silenciamiento a nivel local o local y sistémico para aislamientos de la misma especie. En la Tabla 4 se resumen los resultados de los análisis de las diferentes proteínas P0 según la especie.

Virus	Supresión del silenciamiento		Mutantes analizados			Interacción ASK o SKP	Desestabilización de AGO1	Necrosis en <i>N. benthamiana</i>	Publicaciones
	Local	Sistémico	F-Box	C-terminal	Otros				
TuYV (BWYVFL1)	Si	No	Si			Si	Si	No	(Pfeffer y col., 2002; Bortolamiol y col., 2008; Baumberger y col., 2007)
CABYV	Si	No				Si	Si	Si	(Deifosse y col., 2014; Bortolamiol y col., 2008)
PLRV	Si	Inhibidor fuerte			W87	No	Si	Si	(Fusaro y col., 2012; Zhuo y col., 2014)
SCYLV	Si	Inhibidor fuerte	Si	Si		N. d.	N. d.	Si	(Mangwende y col., 2009)
MABYV	Si	N.d.	Si	FW	F12, FL30-31	N. d.	N. d.	N. d.	(Han y col., 2010)
BChV	No	N.d.				N. d.	N. d.	N. d.	(Kozłowska-Makulska y col., 2010)
BMVYV	Si. Intensidades variables No. Dos aislamientos	N.d.				N. d.	N. d.	N. d.	(Kozłowska-Makulska y col., 2010)
WYDV-GPV	Si	Inhibidor fuerte				N. d.	N. d.	No	(Liu y col., 2012)
MaYMV	Si	Si				N. d.	N. d.	No	(Chen y col., 2016)
CYDV (Australia)	Si	Inhibidor fuerte				N. d.	Si	Si	(Fusaro y col., 2012)
CYDV (europeo)	Si	No				Si	Si	Si	(Almasi y col., 2015)
CLRDV	Si	No				Si	Si	Si	(Deifosse y col., 2014)
CLRDV-at	Si (más suave que CLRDV)	No				Si	Si	Si	(Deifosse, Tesis Doctoral)
CLRDV Brasil	Si. Intensidades variables. Moderado (35-55%) y fuerte	No				N. d.	Si	Si.	(Agrofoglio, Tesis Doctoral, 2017)
PEMV-1 (Enamovirus)	Si	Si. Moderado (20%)	LP→AA funcional LP/P→no funcional			N. d.	Si	No	(Fusaro y col., 2012)

Tabla 4. Características funcionales de las proteínas P0 de los polerovirus. Recopilación bibliográfica de datos experimentales obtenidos a partir del estudio de las proteínas P0 de diferentes especies y variantes de polerovirus.

1.3.6. Proteína AGO1

Las proteínas ARGONAUTA (AGO) son proteínas grandes (90-100 kDa) que constan de una región amino terminal variable y cuatro dominios: N, PAZ, MID y PIWI conservados (Vaucheret 2008). El ensamblaje del complejo mediador del silenciamiento inducido por RNA (RISC) sigue una secuencia ordenada de múltiples pasos que requiere factores accesorios específicos que permiten la unión entre un siRNA y AGO. AGO1 se asocia preferentemente a siRNAs que poseen una uridina en el extremo 5' como la mayoría de los miRNAs procesados por DCL1. A su vez, AGO1 puede cargarse con siRNAs derivados de transgenes, virus y los denominados *trans-acting* siRNAs (tasiRNAs) procesados por DCL4 (Vaucheret 2008). Si bien varias proteínas AGO (AGO2 en moscas y mamíferos y proteínas de subfamilia PIWI) escinden los RNAs blanco a través de su actividad de endoribonucleasa; otras proteínas AGO, que no poseen dicha actividad (AGO1, AGO3 y AGO4 en mamíferos), silencian los RNAs blancos reclutando factores que median el bloqueo de la traducción, la deadenilación y/o el clivaje de mRNA (Kobayashi y Tomari 2016, Vaucheret 2008).

Debido a que AGO1 desempeña un papel esencial en la célula, su expresión es minuciosamente regulada. El mecanismo más estudiado y mejor caracterizado de control es la regulación negativa mediada por el miRNA168. El miRNA miR168 guía el clivaje del mRNA de AGO1 reprimiendo así la transcripción de AGO1 de una manera dependiente de AGO1 (Vaucheret 2006). La expresión experimental de un mRNA de AGO1 resistente al procesamiento mediado por miR168 resulta en un aumento de los niveles de AGO1 y en el aumento de la acumulación de algunos miRNAs, en particular miR168. Esto sugiere que AGO1 es normalmente limitante y que el nivel de AGO1 se mantiene en equilibrio por el efecto recíproco de miR168 sobre RNAm de AGO1 y de proteína AGO1 sobre miR168 (Vaucheret 2008). Además de AGO1, otros elementos de la maquinaria de silenciamiento del RNA, como DCL1 o AGO2, también se regulan a través de miRNAs específicos, miR162 y miR403 respectivamente.

A partir del estudio del mecanismo de acción del supresor del silenciamiento de la proteína P0 de los poliovirus se demostró que AGO1 también es regulada a nivel postraduccional (Derrien y Genschik 2014). P0 mediante su dominio F-Box se une a un complejo SCF ubiquitina ligasa confiriéndole especificidad para marcar con ubiquitina a la proteína AGO1 e inducir su degradación en la vía de autofagia (Figura 20). Asimismo, en estudios experimentales con mutantes en los cuales no se ensamblan los RISC debido a una deficiencia en la biogénesis y/o la acumulación de miRNA se detectó la degradación de AGO1 por autofagia indicando que se trata de un mecanismo innato de la planta para el control de la homeostasis de esta proteína

independiente de la presencia viral (Derrien y col., 2012). Estos hallazgos dejan el interrogante de cómo está integrado el complejo SCF ubiquitina ligasa endógeno (E3) que promueve la ubiquitinación de AGO1 en el contexto no viral (Figura 20B). La proteína F-Box FBW2 de *A. thaliana* ha sido identificada como un buen candidato para cumplir tal función ya que su sobreexpresión reduce significativamente el contenido de proteína AGO1 (Earley y col., 2010). Mientras que los mutantes de pérdida de función FBW2 no muestran un aumento en el nivel de proteína AGO1, probablemente debido al mecanismo de retroalimentación dependiente de miR168 que regula la expresión de AGO1 y compensa dicho efecto. Por otra parte, el inhibidor de proteasoma MG132 fue incapaz de bloquear la degradación mediada por FBW2 de AGO1, tal como sucede con el complejo viral SCF^{P0}. De todas maneras, FBW2 no comparte ninguna similitud de secuencia significativa con la proteína P0 viral fuera del dominio F-box, es por ello que no se puede asegurar que el mecanismo de acción sea similar en ambas proteínas (Derrien y Genschik 2014).

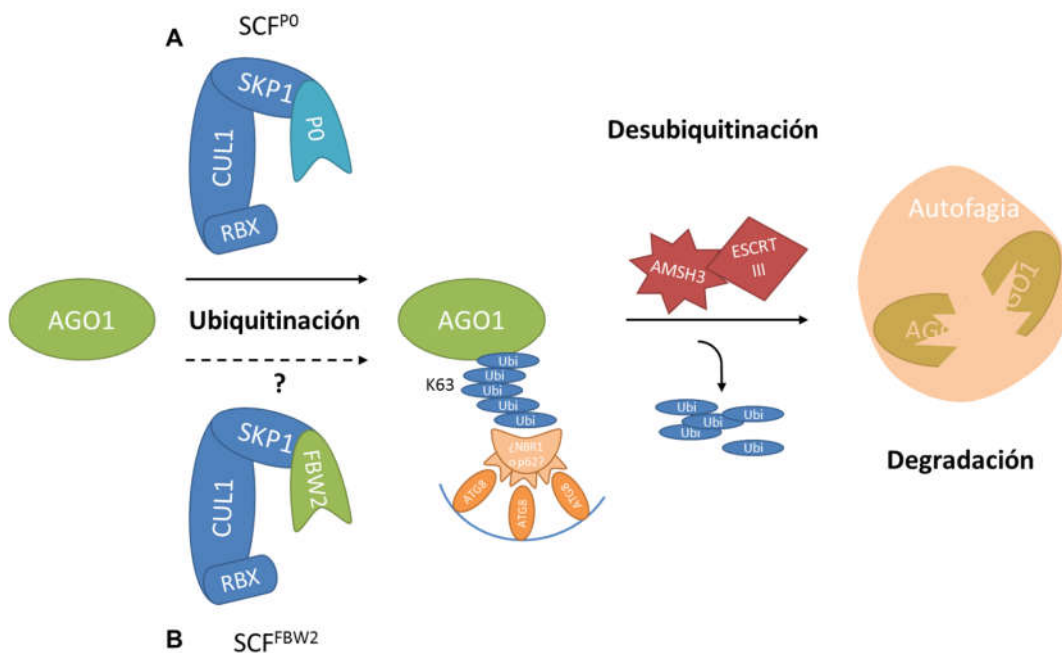


Figura 20. Regulación postraduccional de AGO1. Ubiquitinación. Complejos SCF ubiquitina ligasa. La proteína adaptadora CULLIN (CUL1) interactúa simultáneamente en el extremo amino con la proteína adaptadora SKP1 y en el extremo carboxilo con una proteína Rbx1. La proteína SKP1 se une a proteínas con dominio F-Box. **A)** Complejo SCF ubiquitina ligasa en el contexto de la infección por poliovirus, SKP1 se une a la proteína P0 que posee dominio F-Box. **B)** El control endógeno de los niveles de AGO1 es posiblemente medido por el complejo SCF ubiquitina ligasa unido a la proteína FBW2. Las cadenas de poliubiquitina enlazadas por K63 son reconocidas por receptores de autofagia como NBR1 o p62 que se unen simultáneamente a la ubiquitina y a las proteínas adaptadoras específicas de autofagia como ATG8. **Desubiquitinación.** La proteína AGO1 es desubiquitinada por la enzima AMSH3 que actúa asociada a la proteína ESCRT-III. **Degradación.** AGO1 entra en la vía de degradación mediada por autofagia/lisosomal. Abreviaturas: SKP1, S-phase-kinase-associated protein-1; RBX, zinc-binding RING-H2-DOMAIN protein; ATG8, Autophagy-related 8; NBR1, Neighbour of BCRA1 gene1; AMSH3, Associated molecule with the SH3 domain of STAM3; ESCRT-III, Endosomal complex required for transport-III. Figura adaptada de Derrien & Genschik (2014).

Numerosos hallazgos señalan la importancia de AGO1 en las vías de silenciamiento de plantas implicadas en la regulación de genes endógenos, así como en las defensas del huésped (Alvarado y Scholthof 2012). Morel y col. (2002) describieron un mutante de *A. thaliana* en *ago1* que es más susceptible a infecciones virales respecto de las plantas de tipo salvaje. Inclusive los mecanismos de acción de muchos supresores del silenciamiento génico virales implican la regulación de los niveles de AGO1 en la célula. Es el caso de P19 de los tombusvirus que promueve la expresión del miR168 y regula la expresión de AGO1 a través de un mecanismo de retroalimentación negativa (Várallyay y col., 2010). Otros supresores inhiben su actividad endoribonucleasa, como la proteína 2b del virus del mosaico del pepino (CMV) y P38 del TCV (Alvarado y Scholthof 2012).

1.3.7. Degradación de proteínas y autofagia

El término genérico "autofagia" comprende varios procesos mediante los cuales el lisosoma adquiere carga citosólica. Según se describe en la literatura existen tres tipos de autofagia (Figura 21). La microautofagia se refiere al secuestro de componentes citosólicos directamente por lisosomas a través de invaginaciones en la membrana de la organela. En el proceso de macroautofagia, las cargas se secuestran dentro de una única vesícula citosólica de doble membrana denominada autofagosoma. El autofagosoma se forma por expansión de una membrana aislada, también conocida como fagóforo que deriva de la bicapa lipídica del retículo endoplásmico (ER) y/o del *trans*-Golgi y endosomas. La fusión del autofagosoma con un endosoma o un lisosoma proporciona hidrolasas que median la lisis de la membrana interna de los autofagosomas y la degradación del contenido del autolisosoma. Las macromoléculas resultantes son liberadas de nuevo al citosol a través de permeasas de membrana. Finalmente, la autofagia mediada por chaperonas implica la translocación directa de las proteínas desplegadas a través de la membrana del lisosoma mediada por la chaperona citosólica y lisosómica hsc70, y el receptor de membrana integral LAMP-2A (proteína de membrana asociada a los lisosomas tipo 2A). La autofagia puede ser pensada como una "fábrica de reciclaje" celular que también provee energía a través de la generación de ATP y media el control de daños mediante la eliminación de proteínas no funcionales y orgánulos (Glick y col., 2010, Kirkin y col., 2009, Mizushima y col., 2008).

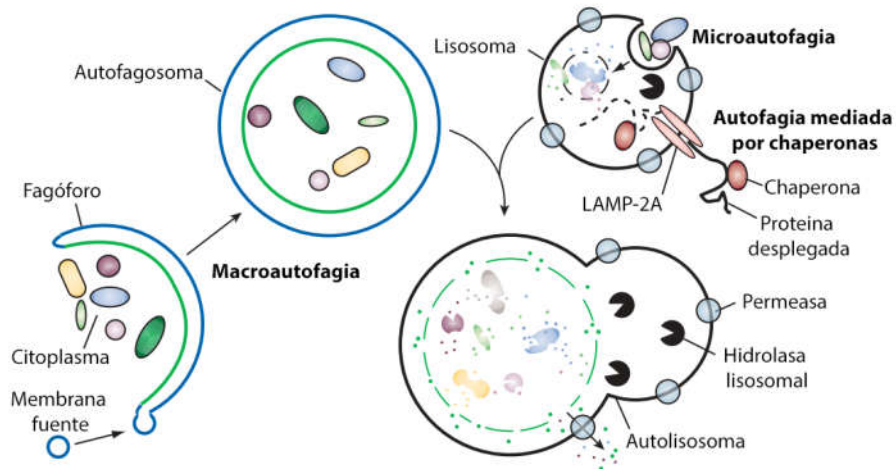


Figura 21. Autofagia. Macroautofagia, donde el fagóforo, que se expande para formar el autofagosoma de doble membrana engloba componentes del citosol como organelas para luego fusionarse con el lisosoma. Microautofagia, en la cual los lisosomas invaginan y sequestran directamente componentes citosólicos. La autofagia mediada por chaperonas que implica la translocación de proteínas desplegadas a través de la membrana lisosomal. Figura tomada de Mizushima y col., (2008).

Las proteínas citosólicas ubiquitinadas para degradación pueden ser procesadas a través de una de las dos vías principales: en el proteasoma o en los lisosomas mediante el proceso denominada autofagia. Las cadenas de poliubiquitina enlazadas por K48 permite el reconocimiento del sustrato proteolítico por los receptores proteasómicos. Dada la preferencia de los receptores conocidos de autofagia, las proteínas marcadas con cadenas de poliubiquitina enlazadas por K63 puede dirigirse preferentemente a la vía de degradación mediada por autofagia/lisosomal (Kirkin y col., 2009).

La autofagia es de gran importancia para la homeostasis celular y la supervivencia, estudios recientes han revelado la implicancia de la autofagia en muchos aspectos de la vida vegetal, incluyendo el establecimiento de las plántulas, el desarrollo de las plantas, la resistencia al estrés, el metabolismo y la reproducción. Esto está asociado a la capacidad dual de la autofagia para mediar la degradación a gran escala en condiciones ambientales severas, mientras que al mismo tiempo es altamente selectiva en la eliminación de organelas y complejos de proteínas, incluso en condiciones favorables de crecimiento (Michaeli y col., 2016).

1.4. Antecedentes que enmarcan el trabajo de tesis

Los clones infectivos de virus vegetales se han convertido en importantes herramientas no solo en el reemplazo de las inoculaciones virales mediadas por insectos vectores sino también en el estudio y caracterización de proteínas virales. Diferentes estrategias como el reemplazo y la eliminación de ORF parciales o completos permitió el estudio e identificación de las funciones asociadas a las proteínas virales.

El estudio de los patógenos y su interacción con sus plantas hospedantes es de gran importancia para desarrollar estrategias antivirales efectivas o perfeccionar las que se emplean en la actualidad, tanto por ingeniería genética como por mejoramiento convencional asistido por biotecnología. Las interacciones proteína-proteína juegan un rol fundamental durante el ciclo de infección viral y contribuirá a dilucidar el modo de acción en el proceso de patogénesis viral.

Los supresores del silenciamiento del RNA se encuentran entre los principales factores de patogenicidad virales. El estudio y caracterización del mecanismo molecular mediante el cual interfieren con la maquinaria del silenciamiento vegetal, no sólo enriquece los conocimientos que se tiene sobre las funciones virales sino también provee de herramientas para el desarrollo de estrategias antivirales.

Hipótesis y Objetivos

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La **hipótesis general** de trabajo tiene como supuesto relevante que la caracterización de las proteínas codificadas por el virus asociado a la enfermedad azul del algodón (cotton leafroll dwarf virus, CLRDV) y la búsqueda de estrategias alternativas de infección a través del uso de un clon infectivo son esenciales para el estudio de la interacción planta-virus-insecto a nivel molecular, permitirán profundizar los conocimientos básicos del CLRDV y proveerán herramientas para el control de la enfermedad.

El **objetivo general** del trabajo es estudiar las proteínas codificadas por el CLRDV y desarrollar un clon infectivo para profundizar los conocimientos básicos sobre las funciones virales, su interacción con el hospedante y facilitar la selección de germoplasma resistente al virus en los programas de mejoramiento de algodón.

Los **objetivos específicos** propuestos son:

1. Construir un clon infectivo de cDNA del CLRDV y evaluar su funcionalidad y su capacidad de infección y replicación en plantas de algodón y plantas modelo.
2. Estudiar la interacción entre las proteínas codificadas por el CLRDV y con potenciales blancos moleculares del hospedante.
3. Identificar y caracterizar la(s) proteína(s) virales con actividad supresora del silenciamiento génico del RNA.

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

En los ensayos para la caracterización del clon infectivo se empleó una variedad de *G. hirsutum* desarrolladas por el INTA y una variedad extranjera que fueron caracterizadas como susceptible (variedad NC33B) y resistente (Guazuncho 2 INTA) a la enfermedad azul (Royo y col., 2003).

Se utilizaron plantas de *Nicotiana benthamiana* línea 16c (expresa la proteína verde fluorescente GFP, del inglés "Green Fluorescent Protein") y *Arabidopsis thaliana* variedad Col0 que fueron mantenidas en invernáculos o cámaras de cría en condiciones controladas de 24-26 °C, con ciclos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Las semillas de *N. benthamiana* línea 16c fueron gentilmente cedidas por el Dr. David Baulcombe (Ruiz y col., 1998).

Como material de partida para la construcción del clon infectivo del CLRDV se utilizó el material vegetal del cual se obtuvo el aislamiento del CLRDV-ARG en el año 2006 (Distéfano y col. 2010,). En los ensayos de transmisión con el insecto vector se utilizaron áfidos de la especie *Aphis gossypii* no virulíferos mantenidos en invernáculos del Laboratorio de Fitopatología de la EEA Sáenz Peña, Chaco.

3.2. Técnicas generales 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 y col., 1989).

Todas las enzimas de restricción y modificantes fueron provistas por New England Biolabs (Estados Unidos) y se utilizaron según las especificaciones del fabricante. Los reactivos y enzimas para PCR fueron adquiridos 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 o transfección se realizaron con columnas del kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Alemania). La síntesis de cDNA se realizó utilizando la transcriptasa SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) y utilizando *random primers*, según las indicaciones del fabricante. Las reacciones de PCR y RT-PCR se realizaron con FidelityTaq (Affymetrix, Santa Clara, CA), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para el clonado de vectores por métodos tradicionales se emplearon las cepas de *E. coli* DH5α químicamente competentes o XLI blue electrocompetentes, según el caso. Todos los cultivos bacterianos fueron realizados en medio "lysogeny broth" (LB) líquido (Bertani, 1951) adicionado

con el antibiótico de selección adecuado (ampicilina 100 mg/lit, kanamicina 50 mg/lit, espectinomina 100 mg/lit, gentamicina 40 mg/lit, rifampicina 25 mg/lit, tetraciclina 5 mg/lit, cloramfenicol 25 mg/lit, Zeocine 50 µg/ml). El medio LB sólido se preparó agregando agar (1,5 g/100 ml).

3.3. Construcción del clon infectivo

Para la construcción del clon infectivo de CLRDV se sintetizó cDNA a partir de RNA total aislado de hojas de algodón infectadas con el CLRDV-ARG (CLRDV, número de acceso NC_014545.1) (Distéfano y col. 2010). Las amplificaciones de PCR se realizaron con *primers* específicos utilizando Platinum *Pfx* DNA Polymerase (Invitrogen). Los productos amplificados se purificaron con un Kit de Extracción de Gel QIAEX II (Qiagen), posteriormente se clonaron en pGEM®-T Easy Vector (Life Technologies) o pCR® 2.1-Topo (Promega) y finalmente se secuenciaron usando un secuenciador automatizado ABI 3730 XL. El cDNA del genoma completo del CLRDV se dispuso bajo el control del promotor 35S del *cauliflower mosaic virus* (CaMV, en lo sucesivo denominado promotor 35S). En primer lugar se empalmo la secuencia del extremo 5' del CLRDV río abajo del promotor 35S mediante la técnica *overlap extension* PCR (Ho y col. 1989). Para ello, se amplificó un primer amplicón conteniendo la secuencia del promotor 35S (401 pb) con los 11 primeros nucleótidos del CLRDV usando pBin61 como molde y los *primers* 1 y 2 (Tabla 5). El sitio de restricción *Sall* se incorporó en el oligonucleótido 1 para facilitar el clonado posterior en el vector binario pBin19. Las secuencias genómicas virales dentro de los *primers* se indican en resaltadas en color negro, mientras que la secuencia promotora 35S está indicada con nucleótidos en *itálica*. El segundo amplicón contiene la secuencia 5' del CLRDV (nt 1-519) flanqueada con los últimos 6 nt del promotor 35S y se utilizó el clon pGEMt 5'CLRDV como molde (Distéfano y col., 2010) y los *primers* 3 y 4 (nt 519-499). Los dos fragmentos de PCR purificados se mezclaron en cantidades iguales y se usaron como molde para amplificar el fragmento A de la PCR (Resultados, Figura 28) con los *primers* 1 y 4. El fragmento A, que contiene el promotor 35S fusionado al 5'CLRDV, se clonó en el vector pCR® 2.1-TOPO vector (TOPO-A) y fue secuenciado.

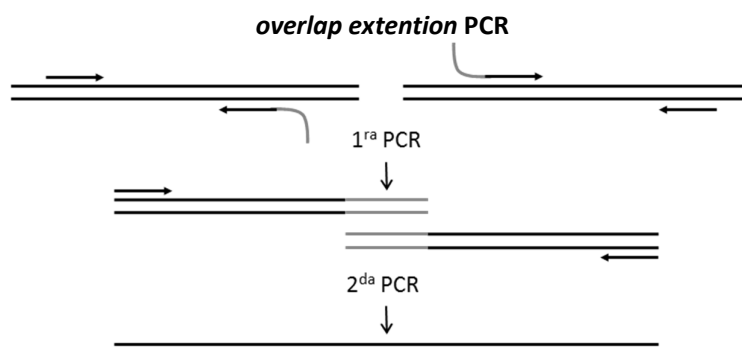


Figura 22. Representación esquemática de la *overlap extension PCR*. En el primer paso se amplifican los dos segmentos que luego en la segunda PCR se unirán. Pueden utilizarse *primers* internos con mutaciones en la secuencia no complementaria para incorporar dichos cambios en el producto final.

Para producir el fragmento B, se sintetizó un amplicón de PCR a partir de cDNA de CLRDV usando los *primers* 5 (nt 437-456) y 6 (nt 4063-4082). A continuación, el amplicón se clonó en el vector pCR® 2.1-Topo y se secuenció. Para producir el fragmento AB, el fragmento B se liberó por digestión con las enzimas *XhoI* y *SpeI* y a continuación se subclonó en el vector Topo-A (también previamente digerido con las mismas enzimas de restricción indicadas) resultando en la construcción Topo-AB. Se sintetizó otro fragmento de PCR (fragmento C) a partir de cDNA de CLRDV usando los *primers* 7 (nt 3953-3972) y 8 (nt 5779-5758). El fragmento purificado se clonó en el vector pCR® 2.1-Topo y se secuenció. Para producir el último fragmento (denominado D), se realizó una PCR utilizando el clon pGEMt 3'CLRDV como molde (Distéfano y col., 2010) y los *primers* 9 (nt 5586-5605) y 10 (nt 5866-5853). Los sitios de restricción *BamHI* y *Sall* que no están presentes en el genoma viral se incorporaron en el *primer* 10 para permitir la siguiente etapa de clonado y, finalmente, se añadieron 15 residuos de adenina (cola de poli-A) en el extremo 3' del cDNA para estabilizar el mensajero. No se añadió ninguna señal de terminación de la transcripción. El amplicón D se clonó en el vector pGEMT-e (pGEM-D) y se secuenció. Para producir el fragmento de CD, el fragmento C liberado mediante la digestión con las enzimas *SacI* y *HindIII*, se subclonó en pGEM-D previamente digerido con las mismas endonucleasas resultando en la construcción pGEM-CD. Finalmente, para ensamblar la copia completa de cDNA del CLRDV bajo el control del promotor 35S (35S/CLRDV), el fragmento liberado CD, después de la digestión con la enzima *BamHI*, se subclonó en la construcción TOPO-AB previamente digerido con la misma enzima de restricción, dando lugar a la construcción TOPO-ABCD. La construcción TOPO-35S/CLRDV se secuenció completamente utilizando un secuenciador automatizado ABI 3730 XL. Para los experimentos de agroinfección, el fragmento 35S/CLRDV se digirió con la enzima de restricción *Sall* y se subclonó en el sitio *Sall* del vector binario pBin19 para producir la construcción pBin19-35S/CLRDV (Resultados, Figura 28). El vector recombinante pBin19-

35S/CLRDV se introdujo por electroporación en *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404, que comúnmente se utiliza para la transformación de algodón.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Posición en el genoma viral	Sitios de restricción
1	<u>CGTCGAC</u> CCCCCTACTCCAAAAATGTCAAAG	-	<i>Sall</i>
2	CGTTCTTTTGTCCCTCTCCAAATGAAATGAAC	-	
3	GAGAGGGACAAAAGAACGATAGAGGGG	-	
4	CCGCGAGTGCAGAGATACTC	519-499	
5	GGCCGAGCGACCCGCGAAAG	437-456	
6	CCCATTCTTGGTGATTCCGA	4063-4082	
7	GGTCTTATTGGAGTTCAT	3953-3972	
8	TGTTAACGTCACAGGCTCG	5779-5758	
9	TCTTCTCTGACAAAGCTGA	5586-5605	
10	GTGGATCCTGTCGAC(T) ₁₅ ACACCGAAACCCCA	5866-5853	<i>BamHI</i> y <i>Sall</i>

Tabla 5. *Primers* utilizados en la estrategia de amplificación y clonado del clon infectivo. Las posiciones en el genoma viral son respecto al CLRDV (NC_014545.1). Los sitios de restricción se encuentran subrayados. Las secuencias genómicas virales dentro de los *primers* se indican en color negro. La secuencia promotora 35S está indicada con los nucleótidos en *itálica*.

3.4. Construcciones obtenidas en el vector pBin61

Para obtener las construcciones utilizadas en las expresiones transitorias en *N. benthamiana* y *N. benthamiana* línea 16c se amplificaron las secuencias de los ORFs mediante RT-PCR a partir del cDNA obtenido para la construcción del clon infectivo con *primers* específicos que contienen sitios de restricción para facilitar el subclonado en los vectores finales (Tabla 6). Los productos de PCR se clonaron en el vector pGEMT-e y se secuenciaron para verificar la integridad del gen. Luego, los ORFs se subclonaron en el vector de destino pBin61 utilizando enzimas de restricción. Las construcciones fueron introducidas en la cepa GV3101 de *A. tumefaciens* por electroporación.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Sitios de restricción
CLR P0 D	CC <u>ACTAGTTCATATG</u> TCCATGGTGAATTTGATCATCTGCAG	<i>SpeI NdeI NcoI</i>
CLR P0 R	GTGGATCCGATCAACTGCTTTCTCCTTCAC	<i>BamHI</i>
CLR CP D	CCTCTAGATCATATG <u>TCCATGGAATACGGTAGTGGGTAG</u>	<i>XbaI NdeI NcoI</i>
CLR CP R	GTCTCGAGGACCCGGGTCTATTTTGGATTGTGGAATT	<i>XhoI XmaI</i>
CLR MP D	CCTCTAGATCATATG <u>TCCATGGAAGAAGACGACCACGT</u>	<i>XbaI NdeI NcoI</i>
CLR MP R	GTCTCGAGGACCCGGGTCTATCGACGAGGAACCATTG	<i>XhoI XmaI</i>

Tabla 6. *Primers* utilizados para el clonado de los ORFs del CLRDV en el vector pBin61. Los sitios de restricción se encuentran subrayados. Las secuencias genómicas virales dentro de los *primers* se resaltan en negro

3.5. Construcciones empleando el sistema de clonado Gateway

Se amplificaron los fragmentos de interés por PCR con *primers* específicos conteniendo las secuencias *attB1* en el *primer* directo y *attB2* en el *primer* (Tabla 7) reverso y mediante una

recombinación con el kit *BP Clonase II enzyme mix* (Invitrogen) se clonaron en el vector de entrada Gateway pDONR/Zeo (Invitrogen) con resistencia a Zeocina (Invitrogen) (Figura 23A).

La orientación del clonado fue verificada mediante cortes con enzimas de restricción y secuenciación. Luego, se llevaron a cabo las reacciones de recombinación mezclando 5-10 ng del vector de destino (Figura 23B y C), 20-50 ng del vector de entrada de interés, 1 µl de LR Clonase II y completando con agua chromasol hasta un volumen final de 6 µl. Luego de incubar a 25 °C por 18 hs, se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa DH5α con 2 µl de la reacción de recombinación. Para emplear este sistema de clonado, los vectores de destino y el vector de entrada pDONR/Zeo fueron amplificados en bacterias *E. coli* de la cepa DB3.1, las cuales son resistentes al producto génico del gen *CcdB* presente en el casete Gateway de los vectores.

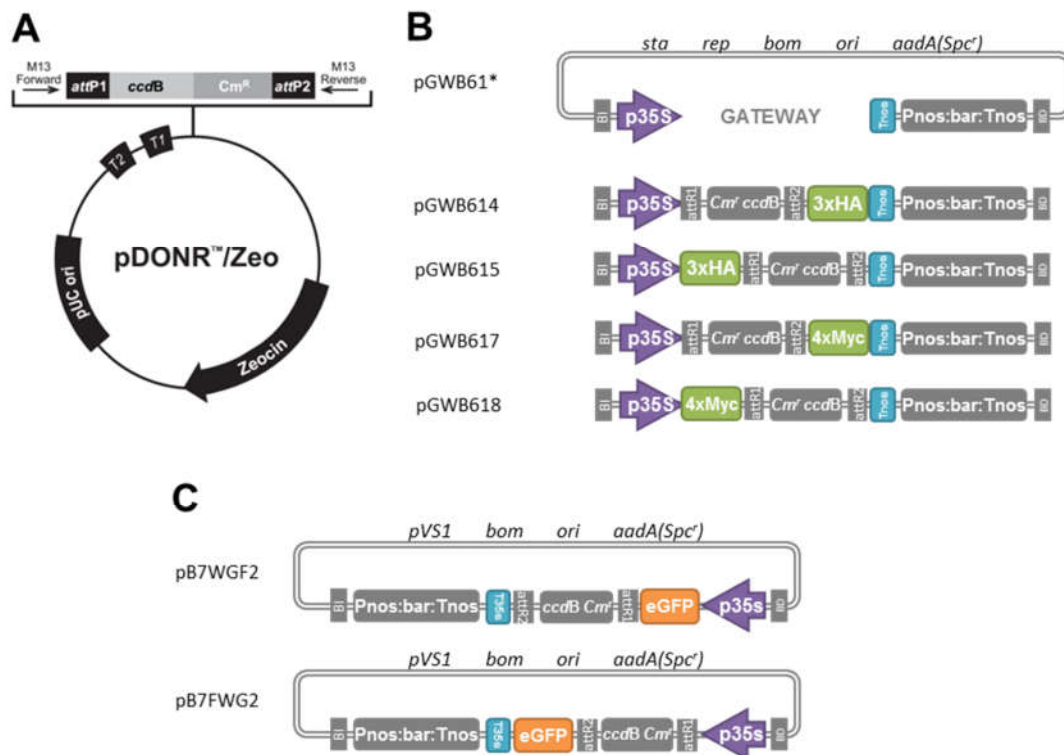


Figura 23. Vectores del sistema de clonado Gateway. **A)** Vector de entrada pDONR/Zeo. Figura adaptada del manual de Invitrogen del Gateway®pDONR™ Vectors. **B)** Vectores pGWB61* diseñados por Nakamura y colaboradores (2010). Entre los bordes derecho e izquierdo todos los vectores poseen Pnos:bar:Tnos como marcador de selección para plantas resistentes a bialafos (Basta®) y dependiendo del vector a la derecha o a la izquierda del casete Gateway se encuentran las secuencias que codifican para las fusiones de 3xHA y 4xMYC. *sta*, es una región que confiere estabilidad en *A. tumefaciens*; *reps*, es un origen de replicación de rango de amplio rango de hospedadores; *bom*, es un elemento *cis* para la transferencia conjugada (o movilización de *E. coli* a *Agrobacterium*); *ori*, origen de replicación ColE1; *AadA*, gen para la resistencia a espectinomina (Spc') utilizado para la selección en bacterias. **C)** Vectores pB7WGF2 y pB7FWG2 desarrollados por Karimi y colaboradores (2002). Entre los bordes derecho e izquierdo todos los vectores poseen Pnos:bar:Tnos como marcador de selección para plantas resistentes a bialafos (Basta®) y dependiendo del vector a la derecha o a la izquierda del casete Gateway se encuentran las secuencias que codifican para las fusiones a eGFP. *pVS1*, origen para replicación en *Agrobacterium*; *bom*, es un elemento *cis* para la transferencia conjugada (o movilización de *E. coli* a *Agrobacterium*); *ori*, origen para replicación en *E. coli*; *AadA*, gen para la resistencia a espectinomina (Spc') utilizado para la selección en bacterias.

Nombre	Secuencia
GW pP0CL-Dir	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTA <u>ACAATGGTGAATTTGATCATCTGCAGAATT</u>
GW pP0CL-stopRev	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAACTGCTTTCTCCTTCACATAG
GW P0CLnostop-Rev	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCACTGCTTTCTCCTTCACATAGGAGC

Tabla 7. *Primers* utilizados para el clonado por recombinación en el vector pDONR/Zeo. Las secuencias genómicas virales dentro de los *primers* se resaltan en negro. Las secuencias de recombinación *attB* están indicadas con nucleótidos en *itálica*.

3.6. Ensayos de agroinfección y agroinfiltraciones en *G. hirsutum*, *N. benthamiana* y *A. thaliana*

Para las agroinfiltraciones se realizó un pre-cultivo a partir de una colonia asilada transformada con el plásmido de interés a 28 °C durante 48 horas en 2,5 ml de LB suplementado con rifampicina (25 µg/ml), kanamicina (100 µg/ml) o espectinomicina (75 µg/ml) según corresponda de acuerdo a la resistencia presente en los vectores. Luego se inocularon 7-10 ml de medio de cultivo (medio LB suplementado con MES 10 nM pH 5,7, kanamicina 100 µg/ml o espectinomicina (75 µg/ml), rifampicina 100 µg/ml y acetosiringona 25 µM) con 400 µl del pre-cultivo y se cultivó a 28 °C durante 18 hs. Al cabo de ese tiempo, las células se centrifugaron a 3800 rpm 10 min a temperatura ambiente y el pellet se resuspendió en 1 ml de Medio A (MES 10 nM, pH 5,7, MgCl₂ 10 nM y acetosiringona 150 µM). Se midió el valor de densidad óptica (DO) a 600 nm de cada cultivo para preparar las soluciones de inoculación con una OD₆₀₀ final de 0.8 para las agroinfección con el clon infectivo del CLRDV; 0,5 de cada construcción utilizada en las coagroinfiltraciones o según se describe para cada experimento en la Sección 4. Luego se incubaron las mezclas a temperatura ambiente durante 3 horas. La suspensión de *A. tumefaciens* que porta el vector recombinante se trató con acetosiringona para activar los genes *Vir* y que la región T-DNA (transfer DNA) sea transferida a la planta. Las infiltraciones se realizaron en los cotiledones de las plantas de algodón en estadio de una hoja emergida no totalmente expandida (Figura 24), en las hojas de las plantas de *N. benthamiana*, *N. benthamiana* línea 16c o *A. thaliana* utilizando una jeringa de 1 ml sin aguja.



Figura 24. Agroinfiltración en *G. hirsutum*. La imagen muestra como son inoculadas las agrobacterias mediante la técnica de agroinfiltración en cotiledones de algodón.

3.7. Extracción de RNA de plantas de algodón

La extracción de RNA total se realizó con el kit comercial *RNAqueous small scale phenol-free RNA isolation* (ThermoFisher Science). Para ello se realizó una minipreparación de RNA a partir de 100 mg de tejido de hojas congeladas a -80°C molido en mortero con nitrógeno líquido. Para mejorar la extracción de RNA a partir de tejido de algodón se agregó el aditivo AID (ThermoFisher Science) al primer buffer de extracción del kit, y luego se procedió tal cual las especificaciones del fabricante. Para obtener el RNA de la columna se realizaron dos eluciones con 80 μl de agua libre de RNAsas (agua DEPC: Dietil Pirocarbonato) previamente calentada a 70°C para favorecer la resuspensión del ácido nucleico. El RNA se concentró hasta 50 μl finales mediante *speedvac* (Eppendorf) y se conservó a -80°C hasta su utilización. La concentración del RNA total se estimó utilizando un espectrofotómetro (NanoDrop Technologies) y su integridad fue controlada por electroforesis en gel de agarosa 1 %.

3.8. Síntesis de cDNA

Se partió de 5 μg de RNA que fue tratado con DNasa I para eliminar contaminantes de DNA. Para la síntesis de cDNA se utilizaron la enzima Superscript III (Invitrogen) y *random primers* (10 ng/ μl), de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

3.9. Amplificación de los extremos del cDNA (RACE: *Rapid Amplification of cDNA 3' and 5' Ends*)

Los extremos 5' y 3' del RNA viral presente en los tejidos no inoculados de plantas de *G. hirsutum* infectadas se analizaron mediante Amplificación Rápida de los extremos de cDNA (RACE) (Frohman y col., 1988) empleando un kit de Invitrogen. Para ello, una vez extraído el RNA se desnaturalizó y antes de realizar la primera cadena de síntesis y amplificación los extremos 3' se

poliadenilaron usando 5 U de poli (A) polimerasa I (Ambion). Para la técnica de 3' RACE se utilizaron *primers* específicos de la secuencia del CLRDV, el *primer* 19 y para la *nested* PCR el *primer* 20 (Distéfano y col., 2010) (Tabla 8). Para la técnica de 5' RACE, los *primers* internos específicos de CLRDV utilizados fueron el *primer* II y para la *nested* PCR el *primer* III (Distéfano y col., 2010). Los productos amplificados se purificaron usando un kit de extracción de gel QIAEX II (Qiagen), se clonaron en el vector pGEM®-T Easy Vector (Life Technologies) y se secuenciaron usando un secuenciador automatizado ABI 3730 XL.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Posición en el genoma
AAP	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIIGGGIIGGGIIG	-
AP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T) ₁₇	-
AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	-
19	AACCAACACGATCAATTTC	5363-5382
20	AGAAGCCGTTCCAGTTGGGG	5536-5555
II	CCGCGAGTGCAGAGATACT	519 - 500
III	GACCAAAGAGCGAATAGCA	480 - 461

Tabla 8. *Primers* utilizados en la amplificación de los extremos 5' y 3' del RNA viral, las posiciones en el genoma viral son respecto al CLRDV (NC_014545.1).

3.10. Transmisión viral mediante áfidos desde plantas agroinfectadas

Para la adquisición del virus se colocaron vectores *A. gossypii* no virulíferos (sanos) sobre una planta infectada mediante la infiltración de agrobacterias conteniendo la construcción pBin19-35S/CLRDV (que presentaba síntomas de la enfermedad) y se mantuvieron durante 15 días en una jaula individual cubierta con tela antiáfidos (Figura 25). Luego se trasladaron los áfidos a plantas de algodón de la variedad susceptible NC33B crecidas en jaulas grande de malla antiáfidos (Figura 25B), se mantuvieron vivos sobre las plantas durante 20 días y finalmente se eliminaron con el insecticida imidacloprid. La evaluación de los síntomas se realizó a partir de los 30-40 días posteriores a la infestación y la detección del virus se realizó mediante RT-PCR. Este trabajo fue realizado en colaboración con la Ing. Agr. María Florencia Casse y el Ing. Agr. Bonacic Kresic de la EEA Saenz Peña-Chaco.

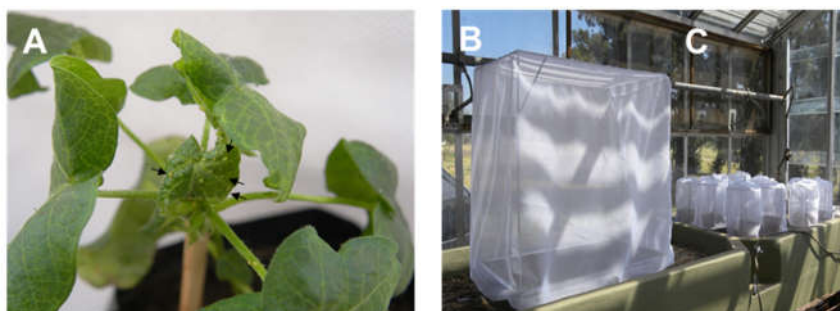


Figura 25. Transmisión viral desde plantas agroinfectadas mediante áfidos. A) Áfidos sanos inoculados en una planta infectada mediante la técnica de agroinoculación del cDNA clon infectivo del CLRDV B) Jaulas grandes e C) individuales de tela antiáfidos empleadas para evitar la contaminación con áfidos de campo y contener los áfidos utilizados en los experimentos.

3.11. Confirmación molecular de la infección viral por PCR

Para corroborar molecularmente la presencia viral en las infecciones por CLRDV y PVX se realizaron PCRs con la enzima FideLiTaq (Affymetrix, Santa Clara, CA). La infección por CLRDV se confirmó amplificando el ORF de la proteína P3 con los *primers* CP up y CP low (Tabla 9), mientras que las infecciones por PVX se confirmaron amplificando el ORF de la CP con los *primers* Coat-PVX-sense-XbaI y Coat-PVX-antisense-KpnI (Tabla 9) y el ORF de la proteína P0 en las construcciones recombinantes con los *primers* P0 up y P0 low.

Nombre	Secuencia	Posición en el genoma viral
P0 up	ATGTTGAATTTGATCATCTG	72-91
P0 low	TCAACTGCTTTCTCCTTCAC	857-838
CP up	ATGAATACGGTCGTGGGTAG	3630-3649
CP low	CTATTTGGATTGTGGAATT	3235-3216
Coat-PVX-sense-XbaI	<u>TCTAGAG</u> CGGGTTAAGTTTCCAGTGAT	-
Coat-PVX-antisense-KpnI	GGT <u>ACCCG</u> TTATGTGGACGTAGTTA	-

Tabla 9. *Primers* utilizados en la confirmación molecular de la infección viral por PCR, las posiciones en el genoma viral son respecto al CLRDV (NC_014545.1). Los sitios de restricción se encuentran subrayados. Las secuencias genómicas virales de CLRDV dentro de los *primers* se indican en negrita.

3.12. Northern blot

3.12.1 RNA de alto peso molecular

Las muestras se prepararon en buffer de siembra con formamida deionizada (60 %), formaldehído (8,5 %) y azul de bromofenol (0,01 %) y se migraron en geles de agarosa 1 % con buffer de corrida MOPs 1X a 100 V. A continuación de la electroforesis se tiñó el gel en una solución de 40 mg/lit BrEt en 0,5X TBE durante 5 minutos y se adquirió la imagen del RNA en el equipo GELDOC (Biorad). El RNA se transfirió por capilaridad a una membrana Hybond NX (Amersham) con buffer SSC 10X. Las sondas radiactivas se obtuvieron a partir de productos de

PCR purificados marcados radiactivamente con α -[32P]-dCTP mediante el kit "Prime-a-Gene Labeling System" y siguiendo las especificaciones del fabricante (Promega). Se prehibridó durante 2 horas a 42 °C y se hibridó con la sonda marcada durante toda la noche a la misma temperatura con la solución ULTRAhyb (Ambion). Luego de descartada la sonda se realizaron dos lavados sucesivos a temperatura ambiente durante 15 minutos con la solución de lavado SSC 2X, SDS 0,1 % y otro de 15 minutos con SSC 0,2X, SDS 0,1 % a 42 °C. Para la visualización de las hibridaciones se realizaron exposiciones durante períodos variables y se escanearon las imágenes mediante un Typhoon 9400 (GeHealthcare).

3.12.2. RNA de bajo peso molecular

Las muestras de RNA se prepararon con 1 vol formamida deionizada y 1/4 de vol de buffer de siembra 4X (50 % glicerol; 50 mM TrisHCl pH 7,7; 5 mM EDTA; 0,03% Azul de Bromofenol) y se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 17,5 % (bisacrilamida/acrilamida 19:1) con buffer de corrida TBE 0,5X a 300V. A continuación de la electroforesis se tiñó el gel en una solución de 40 mg/lit BrEt en 0,5X TBE durante 5 minutos y se adquirió la imagen del RNA en el equipo GELDOC (Biorad). El RNA se transfirió a la membrana Hybond NX (Amersham) utilizando 0,5X TBE como buffer y a 400 mA durante 1 hs mediante electrotransferencia. Las sondas radiactivas se obtuvieron a partir de productos de PCR purificados marcados radiactivamente con α -[32P]-dCTP mediante el kit "Prime-a-Gene Labeling System" y siguiendo las especificaciones del fabricante (Promega). Para amplificar la sonda de GFP se utilizaron los *primers* GFP1 y GFP8, la sonda GF fue amplificada con los *primers* GFP1 y GFP4 y la sonda P fue amplificada utilizando los *primers* GFP5 y GFP8 (Tabla 10).

Nombre	Secuencia
GFP1	AGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACT
GFP4	TTCCGTCTCCTTGAAATCGA
GFP5	ACATCCTCGGCCACAAGTTG
GFP8	TCATGTTTGTATAGTTCATCCATG

Tabla 10. *Primers* utilizados para la construcción de las sondas de DNA de GFP, GP y P.

La prehibridación se realizó durante 2 hs a 42 °C con *buffer perfect Hybrid* TM plus (SIGMA) y se hibridó durante toda la noche a 42 °C con el mismo buffer y la sonda radioactiva. Luego se descartó la sonda y se lavó la membrana una vez con solución de lavado SSC (2X), SDS (2%) a 50 °C y dos veces con SSC (1X), SDS (1%) durante 15 minutos cada uno.

3.13. Extracción de proteínas a partir de *G. hirsutum*

Para la extracción de proteínas se molieron 100 mg de muestra de tejido de *G. hirsutum* con nitrógeno líquido en mortero, hasta obtener un fino polvo. Luego se agregaron 200 µl de buffer borato (8 M urea/0.1 M Tris/0.2 M Borato) para la extracción de proteínas según Schmidt y Wells (1986). La mezcla se centrifugó 10.000 g durante 10 minutos a 10 °C. El sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo limpio y se conservó a -80 °C hasta su utilización.

3.14. Extracción de proteínas a partir de *N. benthamiana* y *A. thaliana*

Las extracciones de proteínas realizadas en los ensayos de infección con el clon infectivo del virus se realizaron moliendo 100 mg de cada una de las muestras de tejido con nitrógeno líquido en mortero, hasta obtener un fino polvo, que luego se resuspendió en un volumen de buffer de siembra Laemmli 1X (Laemmli 1970).

Para las extracciones de proteínas de los ensayos en *N. benthamiana* del capítulo 3 se muestrearon 4 discos de hoja de 1 cm de diámetro cada uno en un tubo conteniendo 8-10 bolitas de vidrio de 2 mm de diámetro. La extracción se realizó con el buffer de siembra Laemmli 1X (Laemmli 1970) en el homogeneizador de mesa de alta velocidad (Fast Prep).

3.15. SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

Las muestras de proteínas previamente obtenidas se sembraron en geles desnaturantes de poliacrilamida 12 % u 8 % según el experimento, se separaron por electroforesis y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham Bioscience) para su detección por *Western blot*. Como control de carga se utilizó la coloración de la proteína Rubisco en la membrana mediante tinción con rojo Ponceau (Rojo Ponceau 650 mM, ácido acético 1%) o azul de Coomassie (ácido acético 10%, isopropanol 25%, azul de Coomassie R250 0.5%), según el experimento.

3.16. Detección de proteínas por *Western blot*

Las membranas de nitrocelulosa 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 hs 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% (TBS-T) se incubaron por 2 hs a temperatura ambiente con una dilución en TBS-leche del anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina, a menos que se aclare en el epígrafe de la figura. 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 2 5

mM) y para el revelado se incubó con los sustratos BCIP y NBT (Promega) en buffer fosfatasa a una concentración final de 0,56 mM y 0,45 mM, respectivamente.

3.16.1. Anticuerpos utilizados

A continuación, se detallan los anticuerpos primarios utilizados con las respectivas diluciones de uso:

- IgG monoclonal de ratón 5G4 anti-BLRV CP (AS-0227/1; DSMZ). Dilución de uso 1/250
- IgG monoclonal de ratón anti-Xpress (Invitrogen). Dilución de uso 1/4000.
- IgG monoclonal de conejo anti-cMyc (Invitrogen). Dilución de uso 1/500.
- IgG monoclonal de ratón anti-GFP (Invitrogen). Dilución de uso 1/5000
- IgG monoclonal de ratón M2 anti-FLAG (SIGMA). Dilución de uso 1/500

Los anticuerpos secundarios utilizados con las respectivas diluciones de uso:

- Anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (AP). Dilución de uso 1/5000.
- Anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (AP). Dilución de uso 1/5000.
- Anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa. Dilución de uso 1/5000.

3.17. Técnica de doble híbrido en levaduras

El ensayo de doble híbrido de levaduras (Y2H, por las siglas en inglés para “Yeast Two Hybrid”) es una técnica de biología molecular ampliamente utilizada para detectar interacciones entre proteínas. Está basada en la activación de uno o varios genes reporteros que dependen de la reconstitución del factor de transcripción de levaduras GAL4. En este sistema, el dominio de activación de la transcripción (AD, por las siglas en inglés de “Activation Domain”) y el dominio de unión al DNA (BD, por las siglas en inglés de “Binding Domain”) de GAL4 se expresan por separado como fusión a las dos proteínas de interés, que se denominan presa (o “prey”) si está fusionada al AD, o carnada (o “bait”) si está fusionada al BD. Si las proteínas de interés son capaces de interactuar, los dos dominios de GAL4 se aproximan físicamente permitiendo la reconstitución del factor de transcripción, el cual a su vez activa la expresión de los genes implicados en las rutas de síntesis de aminoácidos (histidina, triptófano, leucina) o adenina. En este trabajo de Tesis Doctoral el sistema de doble híbrido empleado se denomina “Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System” (Clontech, Estados Unidos). Este sistema permite la coexpresión de las proteínas de interés mediante la cotransformación de los vectores en la cepa AH109 de levaduras.

Para realizar las evaluaciones de interacción entre proteínas se amplificaron las secuencias del ORF mediante RT-PCR a partir de cAbaDNA con *primers* específicos que contienen sitios de restricción para facilitar el subclonado (Tabla 11).

Nombre	Secuencia	Sitios de restricción
SKP1 Gh D1	CCCCCGGGTTCGTCGTCGGGGAGGAAGATCACC	<i>Xma</i> I
SKP1 Gh R1	CCGAGCTCGTCATTGCAATGCCCACTGGTTCTC	<i>Xho</i> I
SKP1 Gh R2	CCGACGTCCTCATTGCAATGCCCACTGGTTCTC	<i>Pst</i> I
CLR P0 D1	CCCATATGTTTCCATGGTTGAATTTGATCATCTGCAGA	<i>Nde</i> I <i>Nco</i> I
CLR P0 R1	CCAAGCTTAAGGATCCCTTCAACTGCTTCTCCTTCACA	<i>Hind</i> III <i>Bam</i> HI
CLR CP D1	CCCATATGTTGGTACCTAATACGGTCGTGGGTAGA	<i>Nde</i> I <i>Kpn</i> I
CLR CP R1	CCAAGCTTCCCGGGTTCTAATTTGGGTTGTGGAATTG	<i>Hind</i> III <i>Xma</i> I
CLR MP D1	CCCATATGTTGGTACCTGAAGAAGACGACCACGTA	<i>Nde</i> I <i>Kpn</i> I
CLR MP R1	CCAAGCTTCCCGGGTTCTATCGACGAGGAACCAT	<i>Hind</i> III <i>Xma</i> I

Tabla 11. *Primers* utilizados para el clonado de los ORF del CLRDV y GSK1 en los vectores pGAD y pGBK de doble híbrido. Los sitios de restricción se encuentran subrayados. Las secuencias genómicas virales dentro de los *primers* se indican en negrita. Los sitios de restricción de la tercera columna indicados en negrita son los utilizados para el subclonado en los vectores de doble híbrido.

Los productos de PCR se clonaron en el vector pGEMT-e y se secuenciaron para verificar la integridad del gen. Luego, los ORFs se subclonaron en los vectores de destino pGBK7 y pGADT7 (Figura 26) utilizando enzimas de restricción.

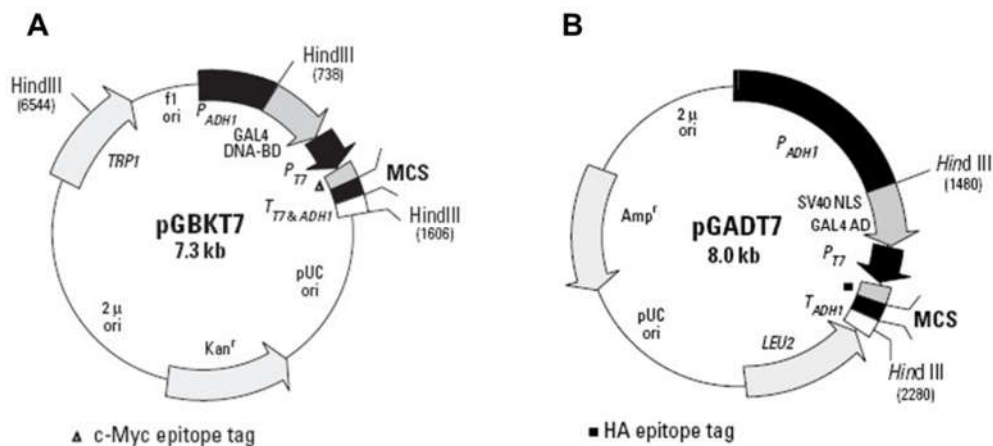


Figura 26. Vectores del sistema de doble híbrido. **A) Vector pGBK.** P_{ADH1} , promotor constitutivo de la alcohol deshidrogenasa 1; GAL4 DNA-BD, dominio de unión al DNA del factor de transcripción GAL4; P_{T7} , promotor T7; c-Myc, para la expresión de las proteínas con el tag; MCS, sitio de clonado múltiple; T_{T7} , terminador de transcripción T7, pUC ori, origen de replicación en bacterias; Kan^r , resistencia a kanamicina para la selección en bacterias; 2μ ori, origen de replicación de alto número de copias en levaduras; *TRP1*, genes de la vía de síntesis del triptófano para la selección en levaduras; f1 ori, origen de replicación del fago f1. **B) Vector pGAD.** P_{ADH1} , promotor constitutivo de la alcohol deshidrogenasa 1; GAL4 AD, dominio de activación del factor de transcripción GAL4; P_{T7} , promotor T7; HA, para la expresión de las proteínas con el tag; MCS, sitio de clonado múltiple; T_{ADH1} , terminador de transcripción de la ADH1; *LEU2*, genes de la vía de síntesis de Leucina para la selección en levaduras; pUC ori, origen de replicación en bacterias; Amp^r , resistencia a ampicilina para la selección en bacterias; 2μ ori, origen de replicación de alto número de copias en levaduras. Figuras tomadas del manual de "Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System".

3.18. Preparación de células de levaduras competentes y transformación

Para transformar las levaduras con los plásmidos, se utilizó el método a pequeña escala de polietilenglicol/acetato de litio (PEG/AcLi). Entre 4 y 8 colonias de levaduras (crecidas a 28-30 °C durante 3 días en medio YPDA agar) se inocularon en 50 ml de medio YPDA y se incubó entre 16 y 20 hs a 28 °C y 200 rpm de agitación. Luego, se midió la DO_{600} y se prepararon dos cultivos de 150 ml finales con un DO_{600} final de 0,2. Se continuó con la incubación por aproximadamente 3 hs más, hasta alcanzar DO_{600} entre 0,4 a 0,6. Luego se cosecharon las células por centrifugación (3000 rpm por 5 min) se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet con 25 ml de agua estéril y se resuspendió el mismo en 1 ml de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) con AcLi 0,1 M. Por cada transformación se utilizaron 100 μ l de la suspensión de células a las cuales se les agregaron: 100 μ g/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado (100 °C, 10 min), 400 ng de cada plásmido y 600 μ l de PEG/TE/AcLi (PEG 3350 70 % final). La suspensión se resuspendió por vortex durante 30 segundos y se incubó a 28 °C por 45 min. Al cabo de ese tiempo, se agregó 70 μ l DMSO y se incubaron a 42 °C durante 20 minutos. Se centrifugaron las células (7000 rpm 30 seg), se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 500 μ l de buffer TE. Se plaquearon 300 μ l en medio Minimal SD -LW para la selección de transformantes y se incubaron a 28 °C entre 3 y 5 días.

Para la evaluación de las interacciones se repicaron las colonias de levaduras transformadas en medio mínimo que posee todos los aminoácidos esenciales excepto leucina, triptófano, histidina y adenina (denominado SD -LWHA) y en el medio de selección SD -LW para el control de viabilidad. En todos los experimentos se incubaron entre 5 y 10 colonias de cada transformación en cuatro réplicas, dos de ellas en SD -LW y otras dos en medio SD -LWHA donde una de cada una de ellas fue conservada a 28-30 °C mientras las otras dos a 21-23 °C. Transcurridos entre 5 y 10 días del repique se controló el crecimiento de las levaduras considerando interacciones proteicas positivas aquellas colonias en las que hay crecimiento a partir de la expresión de los genes reporteros del sistema Y2H.

Para los ensayos realizados en *dots* de cultivo de levaduras las colonias transformantes fueron crecidas 48 horas en medio líquido Minimal SD -LW. Luego se cosecharon las células por centrifugación (3000 rpm por 5 min) se descartó el sobrenadante se resuspendió en agua estéril, se midió la DO_{600} de cada cultivo y se prepararon diluciones iniciales de DO_{600} 0,5 y dos seriadas $0,5 \times 10^{-1}$ y $0,5 \times 10^{-2}$. Luego se sembraron 8 μ l en cada *dot* en cuatro réplicas, dos de ellas en SD -LW y otras dos en medio SD -LWHA donde una de cada una de ellas fue conservada a 28-30 °C mientras las otras dos a 21-23 °C.

3.19. Screening de una biblioteca de cDNA de células acompañantes de floema de *A. thaliana* en levaduras

Se procedió con la preparación de un cultivo concentrado de la cepa Y2HGold conteniendo el plasmido pGBK-P0^{CLRDV}. Para ello, se inoculó una colonia fresca y grande (2-3 mm) en 50 ml SD -W, se incubó con agitación (250-270 rpm) a 30 °C hasta alcanzar una OD₆₀₀ = 0,8 (16-20hs). Las células fueron centrifugadas a 1000 g por 5 min, se descartó el sobrenadante, y se resuspendieron a una concentración final >10⁸ céls/ml en SD -W (4-5 ml). Se colocaron 45 ml de medio YPDA 2X + 50 µg/ml kanamicina en un Erlenmeyer de 2 L estéril y se agregaron los 4-5 ml de la cepa Y2HGold pGBK-P0^{CLRDV}. Se descongeló 1 ml de la cepa conteniendo la biblioteca en el plásmido pGADT7 en un baño a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 1000 g por 5 min, se lavó dos veces con 1 ml de YPDA 2X y se agregó al Erlenmeyer de 2 L. El cultivo conteniendo las levaduras con la biblioteca y las Y2HGold pGBK-P0^{CLRDV} se incubó a 30 °C por 20-24 horas, agitando suavemente (30-50 rpm), y al cabo de 20 horas se observaron las células al microscopio óptico para buscar aquellas que se hubieran apareado (cigotas), de apariencia trilobulada. Las levaduras se pasaron a dos Falcons de 50 ml y se centrifugaron por 10 min a 1000 g, mientras que para recuperar las células que hubieran quedado en la pared del frasco de 2 L, se lavó dos veces con 50 ml de YPDA 0,5 X/Kana y se usó ese medio para resuspender el pellet de los Falcons. Las células se centrifugaron a 1000 g por 10 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 10 ml de YPDA 0,5 X/Kana. El cultivo fue plaqueado de a 200 µl por cada placa de 150 mm (un total de 55-60 placas) en medio selectivo: SD -LW + 40 µg/ml X-α-Gal + 125 ng/ml AbA (SD-LW/X/125 ng/ml AbA). AbA: Aurobasidina A

3.20. Mutagénesis de las proteínas P0^{CLRDV} y P0^{CLRDV-at}

Para obtener los mutantes de las proteínas P0^{CLRDV} y P0^{CLRDV-at} se empleó la técnica *overlap extention* PCR (Figura 22) (Ho y col. 1989). Para ello, en una primera ronda se amplificaron los ORFs en dos fragmentos donde uno de los extremos de cada fragmento contenía la mutación deseada. Los extremos 5' de los ORFs se amplificaron con los *primers* CLR P0 D y P0 mut R1 o P0 mut R2 o P0 mut R3-1 o P0at mut R1 (Tabla 6, Tabla 12). Mientras que el extremo 3' se amplificó con el primer CLR P0 R y P0 mut D1 o P0 mut D2 o P0 mut D3 o P0at mut D1 (Tabla 6, Tabla 12). En una segunda ronda de PCR empleando los productos de la primera como molde se amplificaron los ORFs completos con las mutaciones empleado los *primers* CLR P0 D y CLR P0 R.

Nombre	Secuencia
P0 mut D1	CTCCTTCCATTATCGTTAGGGGAATTTCTTCCTCTAGATT CGCTCTTCCCGT
P0 mut R1	ACGGGGAAGAGCGAATCTAGAGGAAGAAATTC CCCTAACGATAAAATGGAAGGAG
P0 mut D2	CTCGCTGCTTTTATCATCAGGGGAATTTCTTCCTCTAGATT CGCTCTTGCTCGT
P0 mut R2	ACGAGCAAGAGCGAATCTAGAGGAAGAAATTC CCCTGATGATAAAAGCAGCGAG
P0 mut D3	CTCGCTGCTTTTATCATCAGGGGAATTTCTTCCTCTAGATT CGCTCTTCCCGT
P0 mut R3-1	ACGGGGAAGAGCGAATCTAGAGGAAGAAATTC CCCTGATGATAAAAGCAGCGAG
P0at mut D1	CTCCTTCCATTCTCATCGGGGAATTTCTTCCTCACGATT CGCTCTTCCCGT
P0at mut R1	ACGGGGAAGAGCGAATCTGAGGAAGAAATTC CCCGATGAGGAATGGAAGGAG

Tabla 12. *Primers* utilizados para el desarrollo de las los mutantes de las proteínas P0^{CLRDV} y P0^{CLRDV-at}. Las secuencias genómicas del CLRDV virales dentro de los *primers* se indican en negrita.

3.21. Mutagénesis dirigida para el clonado de la proteína P3P5 (RT)

Para el clonado de la proteína P3P5 se amplificó por PCR a partir del TOPO-35S/CLRDV la secuencia completa utilizando *primers* específicos que contienen sitios de restricción para facilitar el subclonado (Tabla 13). Los productos de PCR se clonaron en el vector pGEMT-e y se secuenciaron para verificar la integridad del gen. Así, se obtuvo la construcción pGEMT-P3P5 que fue empleada como molde para la mutagénesis dirigida. Para eliminar el codón de *stop* de la proteína P3 se realizó una PCR con la polimerasa LongAmp® *Taq* DNA Polymerase (New England, Biolabs) de alta procesividad y fidelidad a partir de 30 ng de molde, empleando los *primers* CLR mutP35 D y CLR mutP35 R y un ciclado con 5 min de extensión. Una vez finalizada la reacción, con el objetivo de eliminar el DNA molde (pGEMt-P3P5), se agregaron 2 µl de la enzima de restricción *DpnI* que es capaz de escindir el DNA doble cadena metilado, y se incubó por 2 horas a 37 °C. Con 5 µl de la reacción se transformaron bacterias DH5α, se seleccionaron los clones positivos mediante restricción y se secuenciaron para verificar la integridad del gen y la presencia de la mutación deseada.

Nombre	Secuencia
CLR CP D	CCTCTAGATCATATG TCCATGGAATACGGTAGTGGGTAG
CLR P35 R1	CCGAATTCTTCTAGATTTACCTATCCATCACCTT
CLR mutP35 D	CAATCCACAATCCAAAAGTAGACGATGGTCC CCCC
CLR mutP35 R	GGGGGGACCATCGTCTAC TTTTGGATTGTGGAATTG

Tabla 13. *Primers* utilizados en el clonado y la mutagénesis dirigida del ORF5. Las secuencias genómicas del CLRDV virales dentro de los *primers* se indican en negrita. Los sitios de restricción se encuentran subrayados.

3.22. Clonado del ORF0 del CLRDV y del CLRDV-at en el clon infeccioso del PVX

Para la expresión de las proteínas P0 a través del clon infeccioso de PVX se amplificaron las secuencias del ORFs de P0^{CLRDV} y P0^{CLRDV-at} mediante RT-PCR a partir de cDNA con *primers* específicos que contienen sitios de restricción para facilitar el subclonado (Tabla 14).

Nombre	Secuencia
P0cl PVX BstBI dir	GCCATTCGAA CATGGTGAATTTGATCATCTGCAGAATT
P0cl PVX Sal rev	GGAAGTCGAC CACATCAACTGCTTTCTCCTTCACATAG

Tabla 14. *Primers* utilizados para el clonado de los ORF0 del CLRDV y del CLRDV-at en el clon infectivo del PVX. Las secuencias genómicas virales dentro de los *primers* se indican en negrita. Los sitios de restricción se encuentran subrayados.

Los productos de PCR se clonaron en el vector pGEMt-e y se secuenciaron para verificar la integridad del gen. Luego, los ORFs se subclonaron en el vector de destino pPVX201 utilizando enzimas de restricción *Clal* y *Sall* para escindir el vector (Figura 27) y *BstBI* y *Sall* para el inserto.

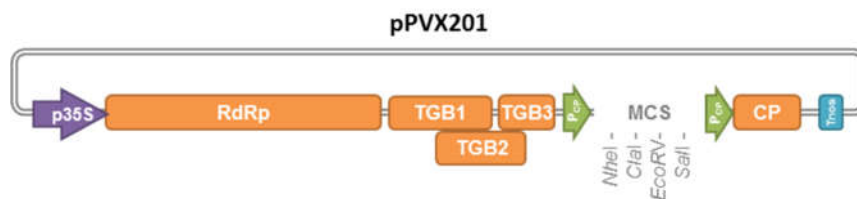


Figura 27. Vector pPVX201. El clon infectivo del virus PVX se encuentra bajo el control del promotor 35S y el terminador de la transcripción de la nopalina sintetasa (Tnos). Se trata de un sistema de expresión a través de un sitio de clonación múltiple (MCS) ubicado aguas abajo del promotor de la proteína CP (P_{CP}) duplicado (Baulcombe y col., 1995).

3.23. Infecciones con el virus PVX

Los plásmidos pPVX201-PO^{CLRDV} y pPVX201-PO^{CLRDV-at} se amplificaron en *E. coli* y purificaron mediante el kit comercial QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen). Para la inoculación de tres hojas en tres plantas se prepararon 200 μ l de una mezcla conteniendo 45 μ g de DNA Na_3PO_4 60 mM pH 7 y bentonite 0,05 %. Se rociaron las hojas con carborandum y junto con 20 μ l de la mezcla se frotaron las hojas suavemente con el dedo. Luego, unos 2-3 min después se rociaron las hojas con agua y luego de 10 días se observó la manifestación de síntomas de infección viral.

3.24. Programas y plataformas virtuales empleadas

Las secuencias obtenidas luego de la secuenciación fueron analizadas con el software Vector NTI Advance 11.0 (InforMax Inc., Bethesda, MD). Los alineamientos de nucleótidos y aminoácidos fueron realizados con el programa Clustal Ω o MUSCLE.

La predicción de potenciales proteínas supresoras del silenciamiento fue realizada mediante la herramienta plant VsupPred disponible desde la plataforma virtual del ICGB.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Construcción y estudio de la capacidad de replicación de un clon infectivo de cDNA del cotton leafroll dwarf virus en plantas de algodón y plantas modelo

4.1.1. Construcción de un clon infectivo de cDNA del cotton leafroll dwarf virus

El cotton leafroll dwarf virus (CLRDV) sólo puede ser transmitido por un áfido vector y no es posible su inoculación en forma mecánica lo cual dificulta su estudio a nivel biológico y molecular. Con el objetivo de obtener un método alternativo de infección y una herramienta para el estudio del virus por genética reversa, se realizó la construcción de un clon infectivo de cDNA del CLRDV. Para ello se obtuvo el genoma viral en cuatro amplicones solapados a partir del RNA viral por RT-PCR, que fueron clonados y posteriormente ensamblados utilizando sitios de restricción internos en la secuencia viral para obtener la secuencia completa del cDNA viral (5,866 kb, Figura 28, ver detalles de la construcción y las secuencias de los *primers* en Materiales y Métodos, Sección 3.3.). En primer lugar, para obtener el denominado segmento A (920 pb) (Figura 28) se empalmó la secuencia del extremo 5' del CLRDV río abajo del promotor 35S (401 pb) mediante la técnica *overlap extension* PCR y se clonó en el vector TOPO-cloning (TOPO-A). Luego se amplificaron por PCR los segmentos B (3645 pb), C (1826 pb), D (280 pb) por separado y se clonaron en el vector pGEMT-e. Para obtener el último fragmento (denominado D), se realizó una PCR incorporando en el *primer* 10 (reverso) que contiene en su secuencia 15 adeninas (PoliA) para estabilizar el RNA mensajero y los sitios de restricción *Bam*HI y *Sall* para facilitar la siguiente etapa de clonado. Al menos dos clones de cada fragmento fueron secuenciados con el fin de garantizar la integridad de la secuencia. El fragmento B se liberó por digestión con las enzimas de restricción *Xho*I y *Spe*I y subclonó en el vector TOPO-A, para producir el vector TOPO-AB. El fragmento C fue liberado con las enzimas *Sac*I y *Hind*III y subclonado en el vector pGEM-D, obteniéndose la construcción pGEM-CD. Finalmente, el fragmento CD fue liberado con la enzima *Bam*HI y subclonado en TOPO-AB (Figura 28), para producir el vector TOPO-ABCD que contiene la secuencia completa del CLRDV río abajo del promotor 35S (TOPO-35S/CLRDV). Todos los productos intermediarios de los distintos pasos de clonado fueron secuenciados al igual que la construcción final TOPO-ABCD para confirmar la integridad de la secuencia.

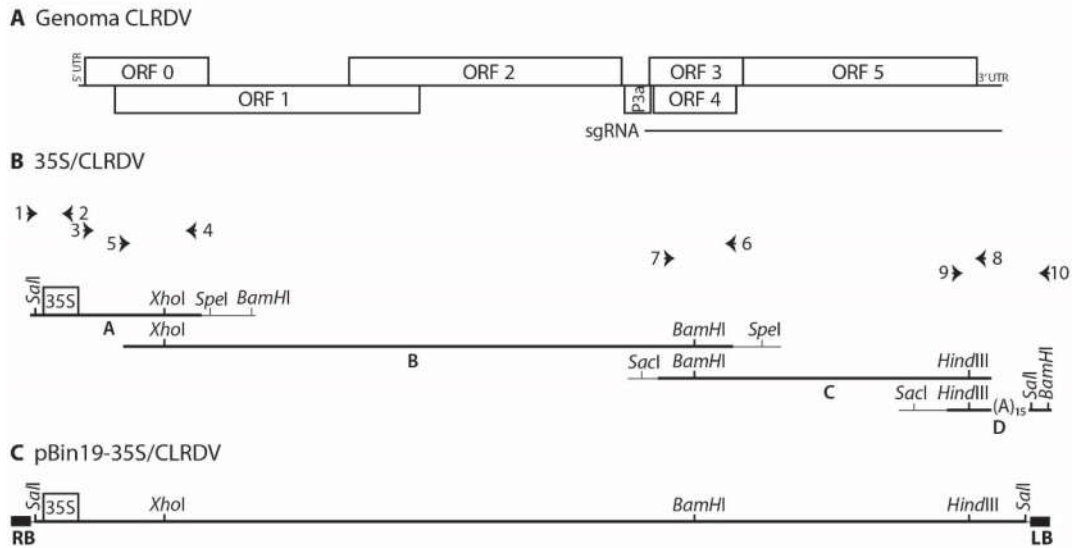


Figura 28. Esquema de la construcción del clon infeccioso de cDNA del CLRDV. A) Esquema de la organización del genoma del CLRDV. **B)** Los fragmentos del genoma viral A, B, C y D fueron amplificados por RT-PCR utilizando los *primers* indicados con flechas y ensamblados utilizando los sitios de restricción de las enzimas *BamHI*, *HindIII*, *SacI*, *Sall*, *SpeI* and *XhoI*. Las líneas gruesas corresponden al cDNA del genoma viral mientras que las líneas delgadas (no en escala) representan a las secuencias de los vectores donde fueron clonadas. **C)** La construcción 35S/CLRDV fue clonada en el sitio de restricción *Sall* del vector binario pBin19 generando la construcción pBin19-35S/CLRDV. RB y LB, bordes derecho e izquierdo del T-DNA, respectivamente.

Con el objetivo de evaluar la funcionalidad de la construcción, se analizó la transcripción del clon de cDNA del CLRDV en experimentos de infección de protoplastos. Para ello, el plásmido TOPO-35S/CLRDV fue introducido en protoplastos preparados a partir de la línea celular BY-2 de tabaco mediante electroporación. Las células se cosecharon a las 24, 48 y 72 horas post electroporación y se extrajo el RNA total de cada muestra para la detección del RNA del CLRDV por *Northern blot*. Se realizó la hibridación utilizando como sonda la secuencia del ORF3 que permite la detección de RNA genómico y subgenómico viral (Figura 29). Se confirmó la presencia del RNA viral genómico y subgenómico, demostrando que a partir del promotor 35S se transcribió el RNA viral y luego se produjo el RNA subgenómico a partir de la RNA polimerasa dependiente de RNA viral traducida a partir del genoma viral.

Finalmente, con el fin de utilizar como método de inoculación en plantas la agroinfección, el casete 35S/CLRDV (digerido con la endonucleasa *Sall*, cuyo sitio fue incorporado en los *primers* 1 y 10) se subclonó en el sitio *Sall* del vector binario pBin19. Se confirmó la orientación del inserto 35S/CLRDV en el vector pBin19 con la enzima *BamHI* y se secuenció nuevamente para confirmar la integridad de la construcción. El vector recombinante pBin19-35S/CLRDV se introdujo por electroporación en *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404, que comúnmente se utiliza para la transformación de algodón.

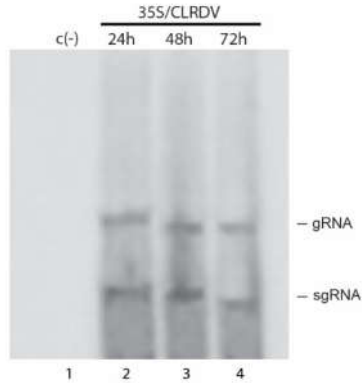


Figura 29. Detección del RNA del CLRDV en protoplastos BY-2 de tabaco infectados con la construcción TOPO-35S/CLRDV por Northern Blot. El RNA total de los protoplastos fue extraído a las 24, 48 y 72hs postinfección. Como control se utilizaron protoplastos electroporados con el vector TOPO-TA clonning vacío (C(-)). Se analizó mediante hibridación con una sonda del ORF3 marcada con [α - 32 P] dCTP.

4.1.2. Estudio de la capacidad de replicación del clon infectivo de cDNA del cotton leafroll dwarf virus en plantas de algodón

Con el objetivo de analizar la funcionalidad del clon infectivo de cDNA del CLRDV se realizaron ensayos de agroinfección en plantas de *G. hirsutum* variedad NC33B, susceptible a la infección por el virus, en condiciones controladas (invernáculo de patógenos). En algodón no es posible agroinfiltrar hojas verdaderas porque el tejido ofrece mucha resistencia y sólo se pueden utilizar los cotiledones, es por ello que se utilizaron plántulas chicas con los cotiledones emergidos, y las primeras dos hojas verdaderas no totalmente expandidas. Se infiltraron ambos cotiledones con la suspensión de *A. tumefaciens* que contiene el vector pBin19-35S/CLRDV en una DO₆₀₀ (densidad óptica a 600 nm) de 0,8 (Materiales y Métodos, Figura 24). Como control se utilizaron plantas infiltradas con agrobacterias conteniendo el vector pBin19 vacío y plantas sin agroinocular. A los 20 días postinfiltración, en las plantas agroinfiltradas con el clon infectivo del CLRDV, se registró la aparición de síntomas de infección en las dos primeras hojas con un leve enrollamiento, y en las hojas nuevas se observó enrollamiento más marcado y clorosis nerval (nervaduras amarillas; Figura 30, panel B). A los 45 días postinoculación, mientras que en los controles agroinfiltrados con el vector pBin19 vacío se observó un desarrollo normal de la planta en altura y desarrollo foliar, las plantas infiltradas con el clon del CLRDV se observó un marcado enanismo, hojas enrolladas con color verde azulado y una intensa clorosis nerval (Figura 30, paneles A y B). Los síntomas obtenidos en la infección con el clon infectivo fueron iguales a los obtenidos en una infección realizada con el insecto vector de la enfermedad (Figura 30, paneles D y E). En el ensayo se agroinfiltraron seis plantas con el clon infectivo y cuatro de ellas mostraron síntomas de enfermedad azul y fueron positivas en los análisis moleculares, obteniéndose un porcentaje de infección del 67%.

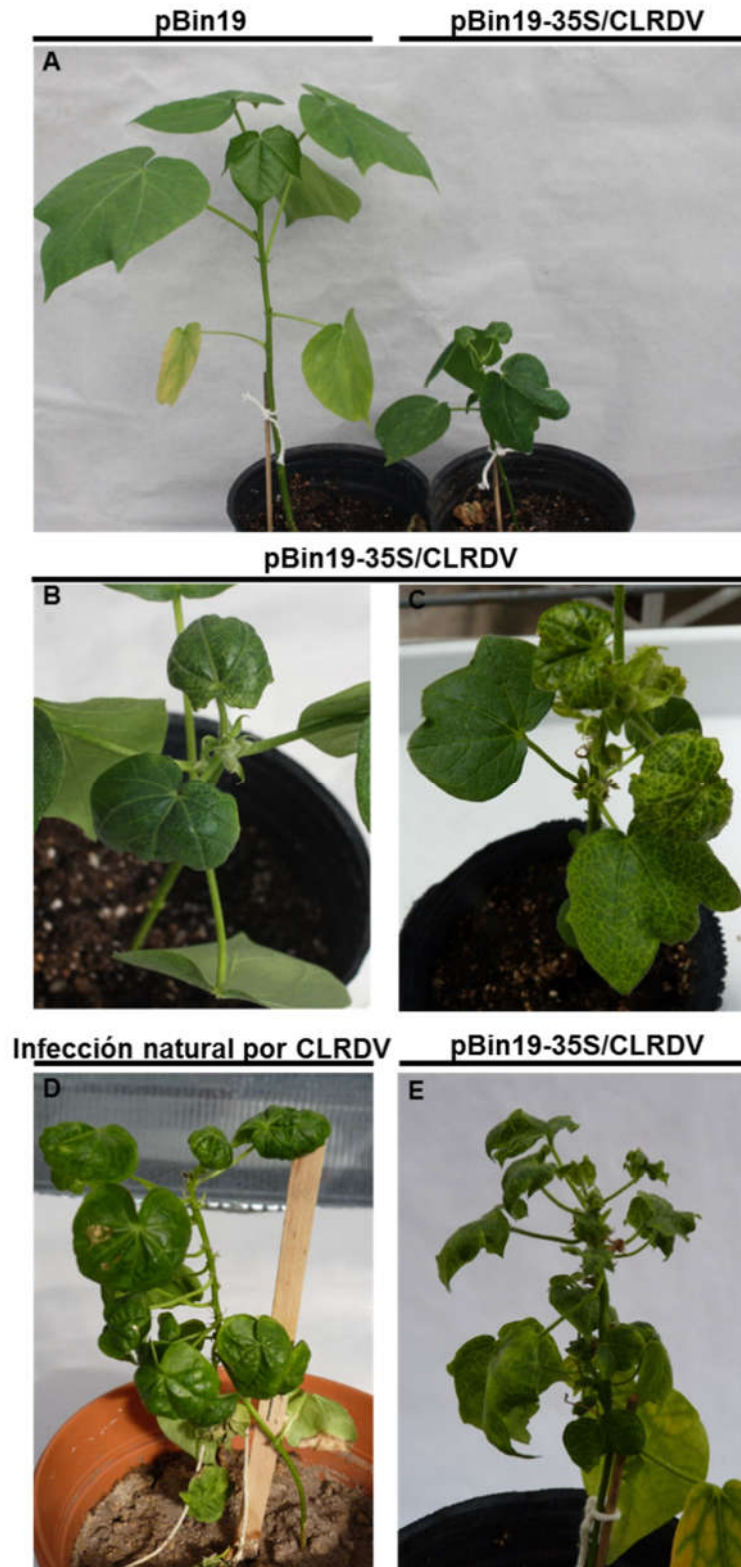


Figura 30. Ensayos de infección de plantas de *G. hirsutum* variedad NC33B con el clon infeccioso del CLRDV. **A)** Plantas de algodón agroinfiltradas con el vector vacío pBin19 (planta a la izquierda) o con la construcción del clon infeccioso pBin19-35/CLRDV (planta a la derecha) a los 45 días postinfección. Detalle de plantas agroinfiltradas con pBin19-35S/CLRDV **(B)** a los 45 días y **(C)** a los 90 días postinfección. **D)** Plantas de algodón infectadas con el CLRDV a través de áfidos virulíferos o **(E)** a través del clon infeccioso a los 90 días postinfección.

La capacidad de replicación y de infección del clon infectivo de cDNA se analizó a nivel molecular a distintos tiempos a partir de los 20 días postinfiltración tanto en las hojas agroinfiltradas como en las hojas sistémicas mediante las técnicas de RT-PCR, *Northern blot* y *Western blot*. A los 20 días posteriores a la inoculación se detectó la presencia del genoma viral mediante RT-PCR en plantas con síntomas insipientes (plantas 3, 4, 5 y 6, Figura 31A, calles 2-5). Se confirmó la presencia del RNA viral genómico y subgenómico en el análisis del RNA total proveniente de hojas sistémicas de plantas agroinfiltradas con pBin19-35S/CLRVDV que manifestaron síntomas de la enfermedad a los 45 días de la infiltración mediante *Northern blot* (Figura 31B, calles 5 a 8). Por otra parte, en aquellas plantas en las cuales no se observaron síntomas de la infección (Figura 31B, calles 3 y 4) ni en las plantas control inoculadas con el vector pBin19 vacío se detectó RNA viral mediante *Northern blot* (Figura 31B, calle 2).

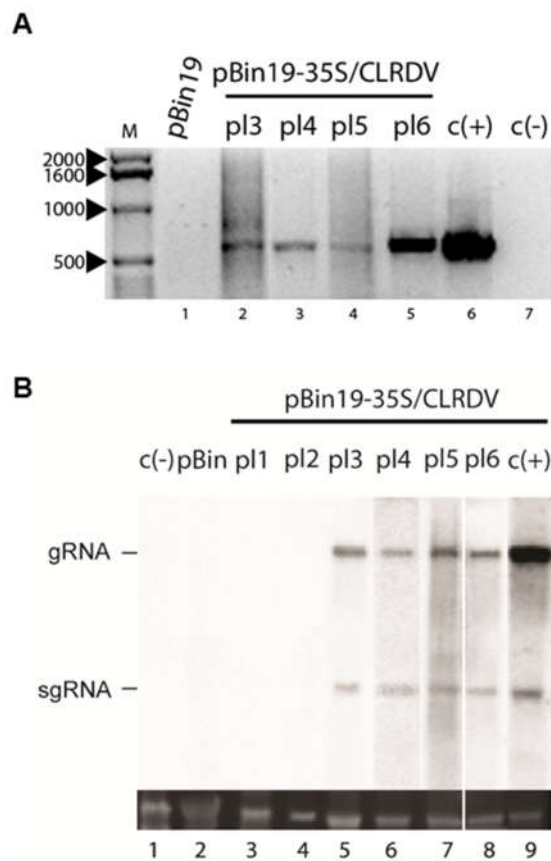


Figura 31. Detección del genoma viral en plantas de *G. hirsutum* variedad NC33B infectadas con el clon infectivo del CLRVDV. A) Análisis por RT-PCR de las hojas superiores (no agroinfiltradas) a los 20 días post infiltración de agrobacterias conteniendo el vector vacío pBin19 (calle 1) o pBin19-35S/CLRVDV (calles 2-5). Se amplificó la región correspondiente al ORF3 (606 pb). Como control positivo se empleó la construcción pBin19-35S/CLRVDV (calle 6) y el control negativo de la PCR (C(-)) es la reacción sin cDNA (calle 7). **B)** Análisis del RNA total a los 45 días posteriores a la agroinfiltración de pBin19 (calle2) o pBin19-35S/CLRVDV (calles 3 a 8) por *Northern blot*. Se analizó la presencia del genoma viral mediante hibridación con una sonda de DNA correspondiente al ORF3 marcada con [α - 32 P] dCTP. Control negativo (c-): algodón no infectado (calle 1); control positivo (c+): algodón infectado con el virus mediante el áfidos virulíferos (calle 9). Como control de carga se utilizó el RNA ribosomal teñido con bromuro de etidio (panel inferior).

A su vez se utilizó un antisuero monoclonal contra la cápside viral para evaluar sobre extractos de hojas y cotiledones la presencia de la proteína P3 del CLRDV (proteína mayoritaria de la cápside viral, Figura 32). El antisuero utilizado fue desarrollado contra la proteína de cápside del beet leafroll virus (BLRV) (DSMZ, Braunschweig Germany) y fue testeado previamente contra una amplia variedad de virus de la familia *Luteoviridae*. Mediante *Western blot* se pudo detectar una proteína de 22,5 kDa aproximadamente correspondiente a la P3 viral tanto en cotiledones agroinoculados, en hojas sistémicas que presentaron síntomas (Figura 32, calles 2 a 5), como en plantas naturalmente infectadas por áfidos (Figura 32, calle 6).

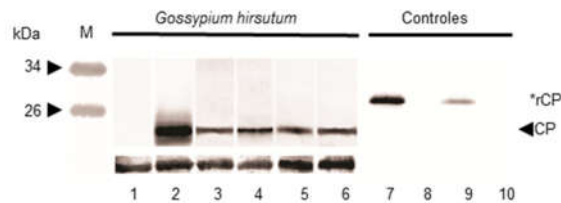


Figura 32. Detección de la proteína P3 del CLRDV. Se evaluó la presencia de la proteína P3 en tejido foliar de *G. hirsutum* variedad NC33B agroinfiltradas con el clon infectivo de CLRDV mediante SDS-PAGE 12% y posterior *Western blot* con un anticuerpo anti-P3 (calles 1 a 8) desarrollado contra el virus BLRV (dilución 1:250). Se analizaron cotiledones inoculados (calle 2) y hojas sistémicas no inoculadas con pBin19-35S/CLRDV (calles 3 a 5). La calle 6 corresponde al extracto de proteínas de una planta infectada naturalmente por áfidos. Como control negativo se utilizó el extracto de proteínas totales de plantas inoculadas con el vector pBin19 vacío (calle 1). La proteína P3 de cápside viral presenta un peso molecular de 22,5 kDa (flecha sobre el margen derecho). A su vez como control positivo del inmunoblot se utilizó un extracto de proteínas de bacterias *E. coli* BL21 pLys que expresan la proteína P3 del CLRDV a partir de la construcción pRSET-P3 inducidas con IPTG. Debido a la fusión con el *tag* Xpress el peso molecular esperado es de 28 kDa (indicado por un asterisco, calles 7 y 9). Las calles 8 y 10 corresponden al lisado de *E. coli* BL21 pLys sin inducción. En las calles 9 y 10 se utilizó el anticuerpo anti-Xpress (dilución 1/4000). El volumen de siembra mostrado debajo de cada calle corresponde a la tinción de proteínas totales con Ponceau S. M: peso molecular (en kDa).

De esta manera, la presencia de síntomas típicos de la infección junto con los resultados de los análisis moleculares, demuestran que el clon infectivo del CLRDV es funcional en plantas de algodón, es capaz de producir una infección sistémica y reproducir los síntomas de enfermedad azul en su hospedador natural: *G. hirsutum*.

Con el objetivo de evaluar si el clon infectivo del CLRDV logra infectar variedades de algodón resistentes a enfermedad azul, se agroinfectaron plantas de *G. hirsutum* de la variedad Guazuncho 2 (resistente a enfermedad azul). El ensayo se realizó en las mismas condiciones anteriormente descritas respetando el mismo estadio de desarrollo de las plantas, la cantidad de inóculo, las condiciones de cultivo e infectando al mismo tiempo algodones de la variedad susceptible NC33B como control. El ensayo se observó por más de 3 meses postagroinoculación. Las plantas de algodón de la variedad susceptible NC33B comenzaron a desarrollar síntomas de infección por CLRDV a partir de las tres semanas postagroinoculación, mientras que las plantas de la variedad resistente Guazuncho 2 no desarrollaron síntomas de infección y no se detectó la

presencia de virus por RT-PCR en las hojas sistémicas a los dos meses postinoculación (la figura no se muestra).

Considerando como fue construido el clon infectivo del virus, el RNA viral producido en las plantas de algodón agroinoculadas debería contener el extremo 5' del CLRDV con un residuo G extra agregado al comienzo del RNA viral y en el extremo 3' la región de PoliA₍₁₅₎ incorporada para estabilizar el RNA (sin secuencias extras del vector pBin19). Con el objetivo de confirmar la secuencia del RNA viral se amplificaron y secuenciaron los extremos 5' y 3' del genoma de la progenie viral mediante la técnica de *Rapid Amplification of cDNA Ends* (RACE; Materiales y Métodos, Sección 3.9.) a partir de RNA de hojas sistémicas de dos plantas de *G. hirsutum* variedad NC33B infectadas con el clon infectivo del CLRDV (Figura 30E). Todos los clones analizados contenían las secuencias esperadas para los extremos 5' y 3' del virus teórico generado a partir del clon infectivo, sin ninguna secuencia adicional del promotor 35S en el extremo 5' o del vector binario en el extremo 3', indicando que la secuencia de PoliA es eficiente para la correcta finalización de la transcripción y no es necesario el agregado de un terminador de la transcripción o una ribozyma.

4.1.3. Optimización del método de infección de plantas de *G. hirsutum* con el clon infectivo del CLRDV

Se cuenta con escasos antecedentes descriptos en bibliografía sobre protocolos de agroinfiltración en plantas de algodón. Es por ello que, buscando optimizar los niveles de infección obtenidos por agroinfección con el clon infectivo del CLRDV, se evaluaron distintas concentraciones de inóculo variando la densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de la agrobacteria para definir con cuál de ellas se obtienen los máximos niveles de infección.

Se evaluaron diferentes concentraciones de inóculo de agrobacterias (DO₆₀₀: 0,3; 0,5; 0,8; 1 y 1,5) en un total de 10 plantas para cada concentración de inóculo. Se observó la presencia de síntomas a las cuatro semanas de la inoculación y según los resultados detallados en la Figura 33, la concentración óptima para la infección es de DO₆₀₀ 0,8 de *Agrobacterium*, la misma empleada en el primer ensayo.

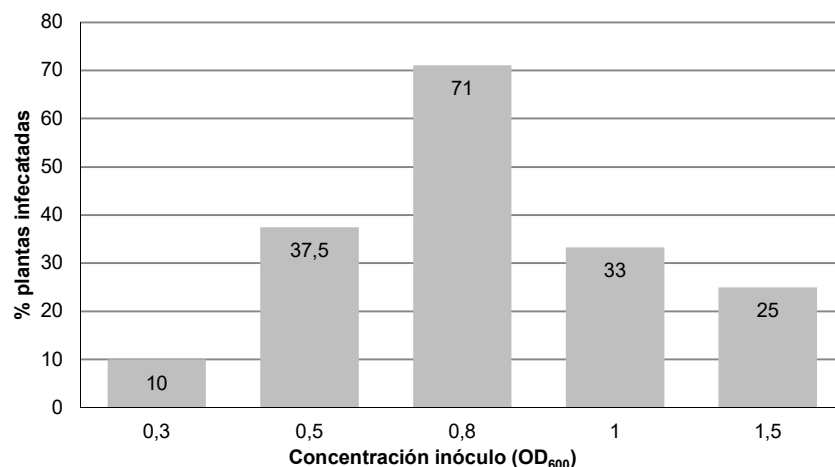


Figura 33. Infección de plantas de *G. hirsutum* variedad NC33B agroinfiltradas con distintas concentraciones de *A. tumefaciens* conteniendo el clon infectivo de CLRDV. En el gráfico se muestran los porcentajes de infección (evaluados por síntomas desarrollados) en función de la concentración final de agrobacterias utilizada en la agroinfiltración (medida por densidad óptica, DO₆₀₀).

A continuación, con el objetivo de evaluar la reproducibilidad y calcular los porcentajes de infección con el clon infectivo del CLRDV en *G. hirsutum* se realizaron nuevos ensayos de infección. A partir de los resultados del ensayo anterior (Figura 33), se inoculó una concentración final de DO₆₀₀: 0,8 de la agrobacteria en plántulas de *G. hirsutum* variedad NC33B con dos hojas verdaderas no totalmente expandidas (Tabla 15, Experimentos 1 y 2) y en plántulas con solo los dos cotiledones emergidos con la primera hoja no completamente expandida (Tabla 15, Experimentos 3 y 4).

Experimento	Plantas infectadas*/plantas infiltradas	Porcentaje de infección
1	8/15	53 %
2	9/15	60 %
3	12/13	92 %
4	12/14	86 %

Tabla 15. Eficiencia de infección con el clon infectivo del CLRDV en plantas de *G. hirsutum* NC33B *la infección de las plantas con CLRDV fue evaluada por RT-PCR mediante la amplificación del ORF3

La infección fue confirmada mediante la amplificación por RT-PCR del ORF3 en hojas sistémicas a los 20 días de la agroinfiltración y se obtuvieron porcentajes de infección entre un 53% a un 92% en cuatro experimentos independientes (Tabla 15). Si bien, en todos los ensayos se obtienen plantas infectadas, los porcentajes de infección son variables, pero los índices de infección mejoran cuanto más pequeñas son las plantas inoculadas.

4.1.4. Estudio de la transmisibilidad por áfidos de los viriones producidos a partir del clon infectivo del CLRDV

Para completar la caracterización de la actividad biológica del clon infectivo de CLRDV, se evaluó la transmisibilidad mediada por áfidos de la progenie viral presente en plantas de *G. hirsutum* agroinfectadas con el clon infectivo. Se colocaron áfidos (*Aphis gossypii*) no virulíferos en plantas de algodón agroinfectadas que mostraban síntomas de infección por CLRDV (a los 45 días postagroinoculación) durante 15 días para alimentarse y luego se transfirieron a plantas de *G. hirsutum* variedad NC33B no infectadas. La transmisión del virus ocurrió a una tasa del 20 % (12 plantas infectadas de un total de 60 plantas tratadas) y las plantas infectadas presentaron los síntomas típicos de enfermedad azul. Esta eficiencia de transmisión fue consistente con las obtenidas a partir de infecciones realizadas con pulgones virulíferos mantenidos en invernadero y que adquirieron el virus de plantas de algodón naturalmente infectadas (Bonacic Kresic, resultados no publicados). Estos resultados indican que el clon infectivo de CLRDV produce viriones competentes para la transmisión por los áfidos vectores de la enfermedad y el desarrollo de la enfermedad en una nueva planta de algodón. Este trabajo fue realizado en colaboración con la Ing. Agr. María Florencia Casse y el Ing. Agr. Bonacic Kresic de la EEA Saenz Peña-Chaco.

4.1.5. Agroinfiltración del clon infectivo del CLRDV en plantas modelo: *Nicotiana benthamiana* y *Arabidopsis thaliana*

Con el objetivo de evaluar si el clon infectivo del CLRDV tiene la capacidad de infectar plantas modelo, se realizaron el mismo tipo de ensayos de agroinfiltración previamente descritos en algodón en plantas de *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana*.

Hospedante	Experimento	Plantas infectadas*/plantas infiltradas	Porcentaje de infección*
<i>N. benthamiana</i>	1	2/7	28.6 %
	2	4/6	66 %
	3	3/6	59 %
<i>A. thaliana</i>	1	3/4	74 %
	2	1/4	25 %

Tabla 16. Eficiencia de infección con el clon infectivo del CLRDV en plantas de *N. benthamiana* y *A. thaliana*. *las infecciones fueron evaluadas por PCR

Se infiltraron plantas de *N. benthamiana* en estadio de 5 hojas con una solución de *A. tumefaciens* con pBin19-35S/CLRDV (a un DO₆₀₀ de 0,8) y con el vector pBin19 vacío como control. Transcurridos 15 días luego de la inoculación, de un total de siete plantas de *N. benthamiana* analizadas, dos de ellas mostraron síntomas de infección viral, obteniéndose un

porcentaje de infección de 28,6% (Tabla 16, Experimento 1; Figura 35, plantas 2 y 3). En las plantas inoculadas con el clon infeccioso no se observaron los síntomas típicos de infección por CLRVD, pero las plantas presentaron una clorosis internerval en las hojas sistémicas al sitio de inoculación (Figura 34).

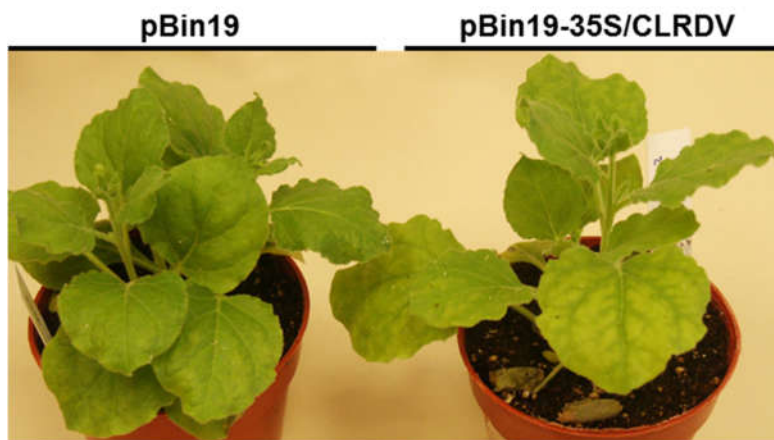


Figura 34. Ensayos de infección de plantas de *N. benthamiana* con el clon infeccioso del CLRVD. Plantas de *N. benthamiana* infiltradas con agrobacterias conteniendo el vector vacío pBin19 (izquierda) o con la construcción del clon infeccioso pBin19-35S/CLRVD (derecha). Las fotos se tomaron a los 20 días posteriores a la agroinfiltración.

Para confirmar la infección a nivel molecular, se analizó la presencia del RNA y de la proteína de cápside P3 del CLRVD tanto en las hojas agroinfiltradas como en las hojas sistémicas mediante las técnicas de RT-PCR, *Northern blot* y *Western blot*. Se detectó el RNA viral por RT-PCR tres semanas después de la agroinfiltración en las hojas infiltradas de las plantas analizadas (Figura 35A, calles 2, 4 y 6) y en las hojas no infiltradas de las mismas plantas que mostraron síntomas a las dos semanas (Figura 35A, plantas 2 y 3, calles 5 y 7). El análisis de *Northern blot* del RNA total de hojas infiltradas (a las 2 semanas posteriores a la infiltración) reveló la presencia de RNA genómico y subgenómico viral (gRNA y sgRNA) en todas las plantas analizadas (plantas 2 y 3, del Experimento 1 y planta 1, del Experimento 2), (Tabla 16, Figura 35B). Sin embargo, cuando se analizaron las hojas sistémicas no infiltradas (a las dos y tres semanas post infiltración), sólo una de las tres plantas positivas por PCR mostró RNA viral por la técnica de *Northern blot* (Figura 35B, planta 2, calles 5 y 9). Además, se evaluó la presencia de la proteína P3 en hojas inoculadas y en hojas sistémicas mediante *Western blot*. El análisis por inmunoblot con el antisuero contra la proteína de cápside P3 dio positivo en las hojas inoculadas de la planta 2 (Figura 36, calle 2) y en las hojas sistémicas de las plantas 2 y 3 (Figura 36, calles 3 y 4).

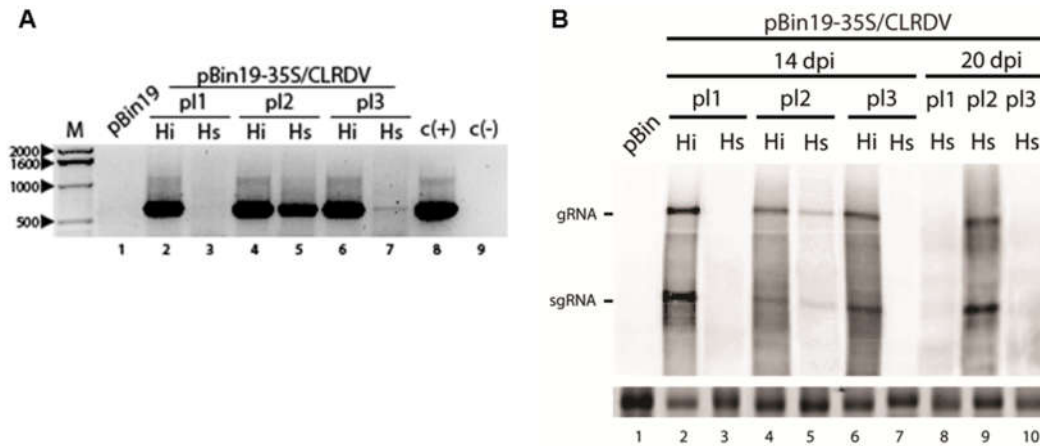


Figura 35. Detección del genoma viral en plantas de *N. benthamiana* infectadas con el clon infectivo del CLRVDV. A) Análisis por RT-PCR de tejido foliar de plantas agroinfiltradas con el vector vacío pBin19 (calle 1) o pBin19-35S/CLRVDV (calles 2-7) en hojas inoculadas (Hi) y hojas superiores no agroinfiltradas (Hs) a los 21 días post infiltración. Se amplificó la región correspondiente al ORF3 (606 pb). Como control positivo c(+): se empleó la construcción pBin19-35S/CLRVDV (calle 8) y el control negativo de la PCR: C(-) es la reacción sin cDNA. **B)** Análisis del RNA total obtenido de plantas agroinfiltradas con pBin19-35S/CLRVDV (calles 2-10) en las hojas infiltradas (Hi) a los 14 días postinfiltración y no infiltradas (Hs) a los 14 y 21 días postinfiltración (dpi) y en plantas infiltradas con pBin19 (control negativo, calle 1) por *Northern blot*. Se analizó la presencia del genoma viral mediante hibridación con una sonda de DNA correspondiente al ORF3 marcada con [α - 32 P] dCTP. Como control de carga se utilizó el RNA ribosomal teñido con bromuro de etidio (panel inferior).

Se realizaron otros dos experimentos de agroinfiltración de plantas de *N. benthamiana* donde 4/6 y 3/6 de las plantas agroinoculadas desarrollaron síntomas de infección sistémica y la infección fue confirmada por análisis de RT-PCR de las hojas superiores no-infiltradas (Tabla 16). En las plantas de *N. benthamiana* se observó la presencia de necrosis en las hojas agroinfiltradas con el clon infectivo de CLRVDV (Figura 37, panel B) mientras que las plantas control inoculadas con pBin19 no mostraron necrosis (Figura 37, panel A) a los 10 días postagroinfiltración, lo cual indicaría que se trata de un efecto mediado por las proteínas virales o la presencia viral y no a la bacteria *A. tumefaciens*.

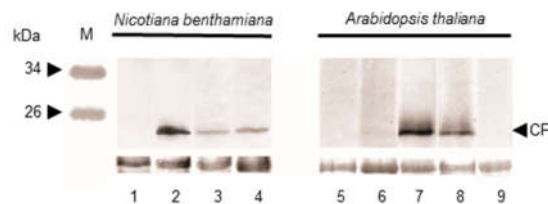


Figura 36. Detección de la proteína P3 del CLRVDV. Se evaluó la presencia de la proteína P3 (22,5 kDa) en tejido foliar de *N. benthamiana* y *A. thaliana* agroinfiltradas con el clon infectivo del CLRVDV mediante SDS-PAGE 12% y posterior *Western blot* con un anticuerpo anti-P3 (calles 1 a 8) desarrollado contra el virus BLRV (dilución 1:250). Como control negativo se utilizó el extracto de proteínas totales de plantas inoculadas con el vector pBin19 vacío (calles 1 y 5; correspondientes a *N. benthamiana* y *A. thaliana* respectivamente). Se analizaron hojas inoculadas de *N. benthamiana* (calle 2) y no inoculadas con pBin19-35S/CLRVDV de *N. benthamiana* (calles 3 y 4) y de *A. thaliana* (calles de 6 a 9). El volumen de siembra mostrado debajo de cada calle corresponde a la tinción de proteínas totales con Ponceau S. M: peso molecular (en kDa).

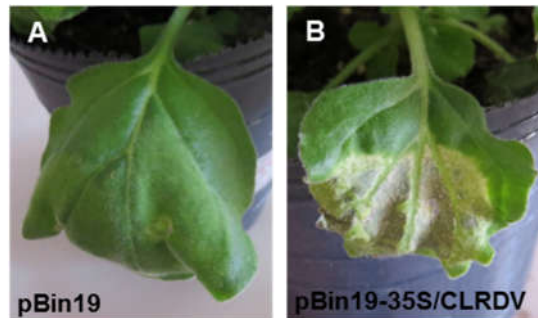


Figura 37. Ensayo de *N. benthamiana* 10 días postagroinfiltración. Hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con agrobacterias conteniendo **A)** pBin19 o **B)** pBin19-CLRDV. Las fotografías fueron tomadas con luz blanca 10 días post infiltración.

A pesar de que *N. benthamiana* no es un hospedante natural del CLRDV mediante agroinfiltración del clon infectivo de CLRDV el virus logró establecer una infección sistémica. Además, producto de la presencia viral se manifestaron síntomas de infección, aunque no fueron los que caracterizan a la presencia viral en su hospedador natural. Es de gran importancia contar con *N. benthamiana* como hospedador del CLRDV para abordajes futuros de estudio y caracterización de proteínas virales ya que no solo es una planta modelo sino también el huésped experimental más utilizado en virología vegetal. Se trata de una herramienta muy importante para el estudio del silenciamiento génico y la expresión transitoria de proteínas.

Con el objetivo de evaluar si el clon infectivo del CLRDV tiene la capacidad de infectar *A. thaliana* se infiltraron plantas de la variedad Col0 en estadio 3.50 (la roseta se encuentra al 50% de su tamaño final <https://www.arabidopsis.org/portals/education/growth.jsp>) con una solución de *A. tumefaciens* conteniendo el vector pBin19-35S/CLRDV (a una DO_{600} de 0,8) y con el vector pBin19 vacío como control (ambas construcciones a un DO_{600} de 0,8). Las plantas se mantuvieron en cámaras de cría con un ciclo de día largo con 16 horas de luz a 23 °C y 8 horas de oscuridad a 21 °C.

Las plantas de *A. thaliana* agroinfiltradas con el clon infectivo fueron observadas hasta 40 días después de la inoculación y no manifestaron ningún síntoma de infección viral (Figura 38A). Sin embargo, el análisis molecular por RT-PCR permitió detectar genoma viral en hojas sistémicas de tres de las cuatro plantas analizadas del Experimento 1 a los 20 días postinfiltración (Figura 38B, Tabla 16) y en sólo una de las plantas del Experimento 2 (datos no mostrados). El análisis mediante *Northern blot* del RNA total extraído de las hojas infiltradas de las tres plantas positivas por PCR reveló la presencia de RNA genómico y subgenómico vírico (Figura 38C, calles 2-4) sin embargo no se detectó RNA viral en las hojas sistémicas (no infiltradas), a las 3 semanas posteriores a la infiltración (datos no mostrados), pero se pudieron detectar el RNA genómico y

subgenómico en una sola planta a las 4 semanas de la infiltración (Figura 38C, calle 6). A su vez, la proteína de cápside viral P3 fue detectada en hojas sistémicas de plantas (que fueron positivas por RT-PCR) a los 20 días postinfección por *Western blot* (Figura 36, calles 7 y 8).

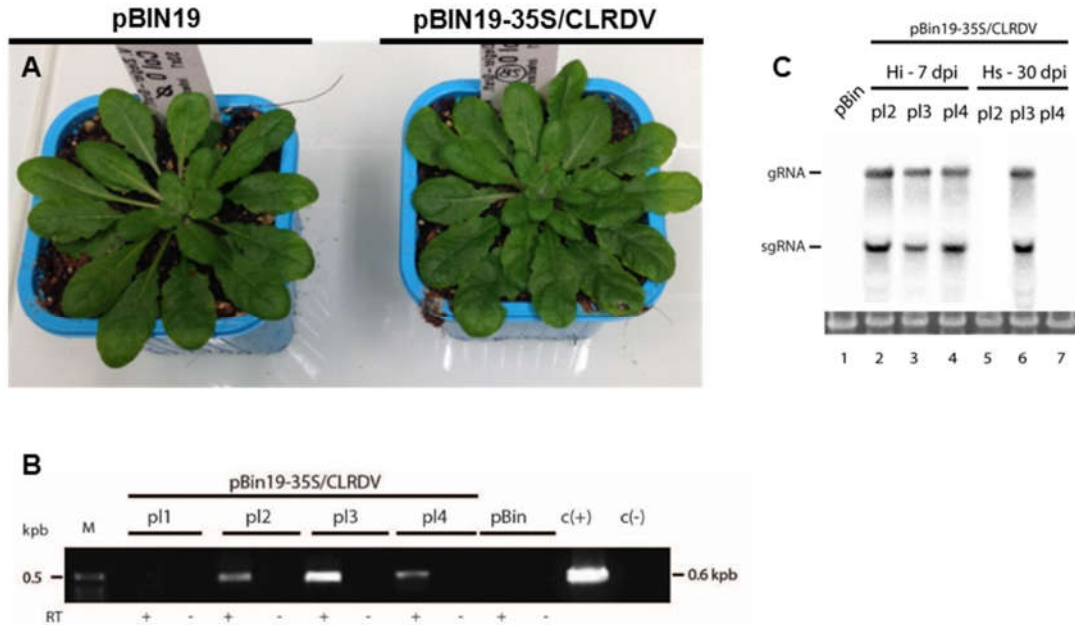


Figura 38. Ensayos de infección de plantas de *A. thaliana* con el clon infeccioso del CLRDV. A) Plantas de *A. thaliana* agroinoculadas con el vector vacío pBin19 (izquierda) o con la construcción del clon infeccioso pBin19-35S/CLRDV (derecha) a los 20 días postagroinfiltración. **B)** Análisis por RT-PCR de hojas sistémicas no infiltradas de plantas agroinfiltradas con pBin19-35S/CLRDV (pl: plantas 1-4) y pBin19 vacío a los 20 días agroinfiltración. Se amplificó la región correspondiente al ORF3 (606 pb) y las reacciones de RT se realizaron en paralelo con o sin la adición de transcriptasa inversa, designada por (+) o (-). La calle M contiene un marcador de DNA de 1Kb. El control positivo: C(+) se amplificó a partir de la construcción pBin19-CLRDV y el control negativo: C(-) es control de PCR sin cDNA. **C)** Análisis del RNA total obtenido de plantas agroinfiltradas con pBin19-35S/CLRDV (calles 2-7) en las hojas inoculadas a los 7 días postinoculación (dpi) (calles 2-4) y no inoculadas 30 dpi (calles 5-7) y en plantas inoculadas con pBin19 (control negativo, calle 1) por *Northern blot*. Se analizó la presencia del genoma viral mediante hibridación con una sonda de DNA correspondiente al ORF3 marcada con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP. Como control de carga se utilizó el RNA ribosomal teñido con bromuro de etidio (panel inferior).

Al igual que *N. benthamiana*, *A. thaliana* no es un hospedante natural del CLRDV sin embargo mediante agroinfiltración del clon infeccioso del CLRDV el virus logró establecer una infección sistémica, aunque sin manifestación de síntomas. Los resultados indican que la agroinoculación del clon infeccioso en plantas de *N. benthamiana* y *A. thaliana* permite que el virus replique y se mueva sistémicamente, resultando ambas especies buenos modelos para realizar estudios básicos de interacción planta-patógeno con el CLRDV.

4.1.6. Optimización de las condiciones de infección en plantas modelo

4.1.6.1. Coagroinfiltración del clon infectivo de CLRVD con supresores del silenciamiento del RNA heterólogos en *N. benthamiana*.

Estudios previos mostraron que la utilización de supresores del silenciamiento del RNA heterólogos puede aumentar la infectividad de los clones infectivos. Se han reportado varias especies virales provenientes de diversos géneros tales como *Closterovirus*, *Potexvirus* e incluso *Luteovirus* que mejoran su infectividad en plantas de *Nicotiana* gracias a la expresión en *trans* de proteínas supresoras del silenciamiento (Chiba col., 2006, Liu y Kearney 2010, Yoon col., 2011). A partir de estos antecedentes, se estudió si la eficiencia de la agroinfección del CLRVD podría ser incrementada en *N. benthamiana* mediante la coagroinoculación del clon infectivo y uno de los siguientes supresores del silenciamiento: HC-Pro del potato virus Y, P19 del tomato bushy stunt virus, P38 del turnip crinkle virus (TCV) y 2b del cucumber mosaic virus (CMV).

Para ello se agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* con el clon infectivo en una DO_{600} de 0,8 combinado con alguno de los supresores (HC-Pro, P19, P38 o 2b) en una DO_{600} de 0,5. Las plantas se mantuvieron en condiciones de cultivo controladas en cámaras de cría y se registró la presencia de síntomas por más de 30 días. Según los síntomas manifestados en las plantas, los porcentajes de infecciones en las inoculadas con el clon infectivo combinado con HC-Pro, P19 o P38 fueron del mismo orden de aquellas inoculadas con el clon infectivo solo. Sin embargo, la coagroinfiltración del clon infectivo con el supresor 2b mostró un 100% de infección (Tabla 17).

Construcciones inoculadas	Plantas infectadas/plantas infiltradas	Porcentaje de infección*
pBin-35S/CLRVD + pBin	3/6	50%
pBin-35S/CLRVD + HC-Pro	2/4	50%
pBin-35S/CLRVD + P19	2/4	50%
pBin-35S/CLRVD + P38	2/4	50%
pBin-35S/CLRVD + 2b	4/4	100%

Tabla 17. Eficiencia de infección con el clon infectivo del CLRVD combinado con supresores del silenciamiento en plantas de *N. benthamiana*. *la infección evaluada solo por la presencia de síntomas

Estos resultados indican que la expresión de la proteína 2b en la hoja inoculada con el clon infectivo del CLRVD mejora el porcentaje de infección del virus en *N. benthamiana*, mientras que con los otros supresores el porcentaje de infección se mantiene en valores parecidos a los obtenidos con el clon infectivo del CLRVD solo.

4.1.6.2. Optimización de las condiciones de infección en *A. thaliana*

A. thaliana es una planta modelo ampliamente utilizada para el estudio y la caracterización de mecanismos moleculares implicados en la respuesta del hospedador frente a patógenos. Sabiendo que es una gran herramienta para el estudio de los mecanismos de infección viral se buscó mejorar la eficiencia de infección obtenida para el clon infectivo del CLRDV en este hospedador. Se ensayaron dos condiciones medioambientales de cultivo modificando las horas de luz y oscuridad, pero manteniendo la temperatura en cada una de las condiciones. La primera condición ensayada fue de 12 horas de luz a 21 °C y las 12 horas de oscuridad a 18 °C (denominado ciclo de día largo), mientras que en la segunda condición se mantuvieron las temperaturas, pero se disminuyó la proporción de luz a 8 horas mientras que las 16 horas restantes fueron de oscuridad (o bien ciclo de día corto). Además, en ambas condiciones se agroinfiltraron las plantas en estadio 3 de desarrollo (Figura 39A), es decir plantas más chicas respecto a las utilizadas en el ensayo de la Sección 4.1.5.)

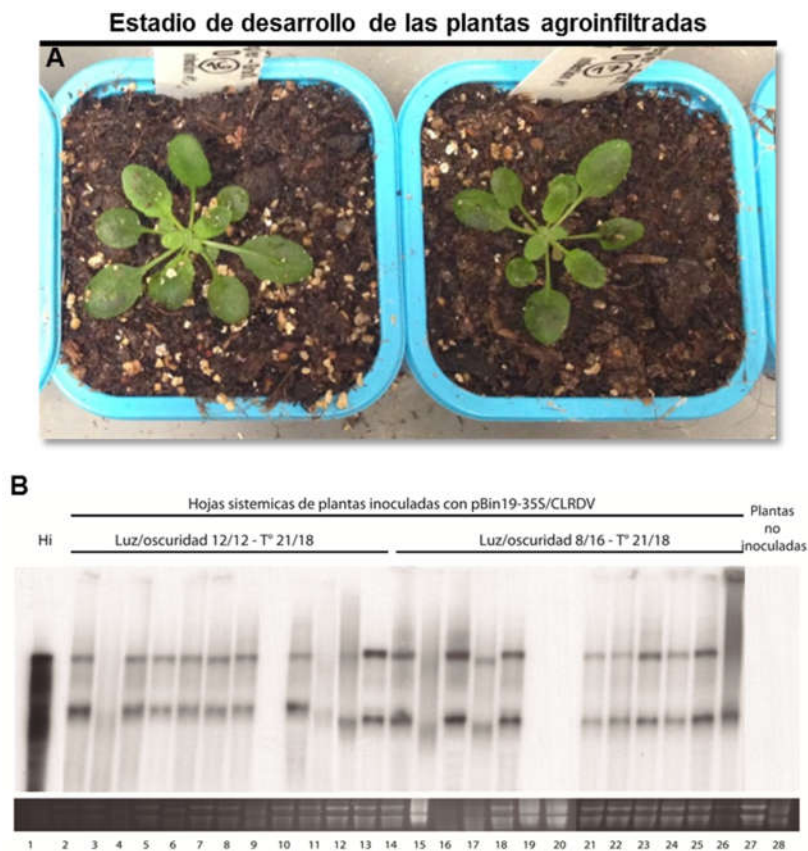


Figura 39. Infecciones con el clon infectivo del CLRDV en plantas de *A. thaliana*. A) Estadio 3 de desarrollo de las plántulas agroinoculadas con el clon infectivo del CLRDV. B) Análisis por *Northern blot* del RNA total obtenido de las hojas inoculadas (calle 1) y las no inoculadas (calle 2-26) tomadas a los 25 días postinoculación. Las calles 2-13 y 27 corresponden a plantas desarrolladas en condición de día largo, mientras que las calles 14-26 y 28 son las plantas crecidas en día corto. En las calles 27 y 28 se sembraron muestras de plantas no inoculadas. Se analizó la presencia del RNA viral mediante hibridación con una sonda marcada con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP correspondiente al ORF3.

Al igual que se observa en los ensayos anteriores, las plantas no mostraron síntomas de infección (la figura no se muestra). La presencia del gRNA y sgRNA del virus fue analizada en las hojas sistémicas de las plantas inoculadas mediante *Northern blot* (Figura 39B). Se observó que los índices de infección aumentaron respecto de los ensayos anteriores (Sección 4.1.5.), alcanzando un 92% de infección en la condición de día largo (11/12 plantas inoculadas) y un 85% en el fotoperiodo de día corto (11/13 plantas inoculadas). Estos resultados indican que, si bien el día largo parecería favorecer la infección, el cambio que afecta sustancialmente los índices de infección es el estadio de desarrollo de las plantas al momento de agroinfiltrar el clon infectivo.

4.2. Estudio de la interacción entre sí de las proteínas codificadas por el CLRDV y con potenciales blancos moleculares del hospedante.

El genoma de los virus pertenecientes al género *Polerovirus* está formado por siete marcos abiertos de lectura (ORFs). A partir del análisis de la identidad de secuencias y en muchos casos la presencia de motivos conservados se postula que las proteínas del CLRDV compartirían las funciones descritas en bibliografía para cada uno de ellas (Distéfano col., 2010). Los ORFs 0, 1 y 2 se traducen a partir del RNA viral dando como producto las proteínas P0, P1 y la proteína P1-P2 a partir de un cambio de marco traduccional. EL ORF0 codifica la proteína P0 de 29,8 kDa, característica de los miembros del género *Polerovirus*, con función supresora del silenciamiento (Sección 4.3.). A su vez, el ORF1 produciría una proteína P1 de 70,1 kDa y a continuación del ORF1 se encuentra el ORF2 que comienza en el nt 1706 y terminaría en nt 3442, y se expresa a continuación del ORF1 a través de un *frameshift* que produce un desplazamiento del ribosoma en el marco de lectura en sentido -1 para producir una proteína de fusión (119 kDa). El desplazamiento del ribosoma es producido por una estructura que adquiere el genoma viral denominada *pseudoknot*, que depende de un heptanucleótido GGGAAAC ubicado en la posición 1700-1706 (Introducción, Figura 12). Las proteínas P1 y P1-P2 serían componentes de la RNA polimerasa dependiente de RNA. Dentro de la secuencia de P2, próximo al terminal carboxilo se encuentra el motivo GXXXXXXXXX₂₅₋₄₀GDD común en todas las RNA polimerasas dependientes de RNA conocidas. Los ORFs 3, 3a, 4 y 5, se traducen a partir de un RNA subgenómico, dando lugar a las proteínas P3, P3a, P4 y P3-P5. La proteína P3 (CP; 22,3 kDa) es el componente mayoritario de la cápside viral y posee un dominio amino terminal rico en argininas que mediarían la unión de la proteína a RNA. La proteína P3a traducida a partir de un AUG no canónico posee el dominio transmembrana característico de esta proteína. La proteína P4 de 20 kDa es traducida a partir de otro marco de lectura y posee en el extremo amino terminal las estructuras de α -hélices asociadas a la dimerización de la proteína, mientras que en el carboxilo terminal esta la región con carga positiva implicada en la unión a RNA. La proteína P3-P5 de 77,1 kDa se denomina generalmente proteína de dominio *readthrough* (RT) posee un dominio rico en prolina, seguido por una región de aproximadamente 200 residuos de aminoácidos de secuencia muy conservada, que comúnmente se encuentra en miembros de la familia *Luteoviridae*. Esta secuencia típica rica en prolina que codifica 7-13 residuos de prolina y la región conservada ubicada a continuación estarían implicadas en la transmisión de los *Polerovirus* mediada por vectores y en la acumulación del virus en la planta hospedadora.

El sistema de doble híbrido en levaduras ha sido ampliamente empleado en el análisis de las interacciones entre proteínas virales. El sistema más utilizado es el del factor de transcripción

de levaduras GAL4. Este factor de transcripción posee dos dominios, el dominio de unión (BD) que se une río arriba de las secuencias de activación y el dominio de activación (AD). En presencia de dos proteínas que interactúan entre sí se reconstruye el factor de transcripción permitiendo la expresión de los genes río abajo del promotor.

4.2.1. Estrategias de amplificación y clonado de los ORFs virales.

Con el objetivo de evaluar la interacción entre las proteínas virales mediante ensayos de doble híbrido se realizaron construcciones para la expresión de los ORFs del CLRDV en los vectores pGAD y pGBK (Figura 40). Se amplificaron las secuencias de los ORFs que codifican para las proteínas P0, P3 y P4 mediante RT-PCR a partir de cDNA del CLRDV con *primers* específicos (Materiales y Métodos, Tabla 11) que contienen sitios de restricción de enzimas específicas para facilitar el subclonado y sin el codón de inicio de la traducción (ATG) para evitar la expresión de la proteína sin la fusión al dominio del factor de transcripción GAL4. Los productos de PCR se clonaron en el vector pGEMT-e y se secuenciaron para verificar la integridad de los genes. Luego, los ORFs se subclonaron en el vector pGBK para obtener los clones pGBK-P0^{CLRDV}, pGBK-P3^{CLRDV} y pGBK-P4^{CLRDV} y en el vector pGAD para obtener los clones pGAD-P0^{CLRDV}, pGAD-P3^{CLRDV} y pGAD-P4^{CLRDV}.

Además se intentó clonar la proteína P1, logrando la amplificación del ORF por PCR pero no se logró completar el clonado en el vector pGEMT-e. Quizás el problema para clonar el ORF correspondiente a la proteína P1 este asociado al dominio serina proteasa presente en la proteína que desencadene algún efecto tóxico, incluso en la expresión mínima que pueda ocurrir en *E.coli* a partir del vector de clonado.

A su vez se trabajó en el clonado de los ORFs más grandes para la expresión de las proteínas P1P2 y P3P5. La expresión de la proteína completa ORF1-2 requiere de un cambio en el marco de lectura en sentido -1. Para la expresión de la proteína P1P2 se intentó una estrategia de clonado reproduciendo la secuencia exacta que lee el ribosoma que codifica para la proteína mediante la duplicación del codón donde ocurre el cambio del marco de lectura. Del mismo modo se buscó amplificar el ORF completo de la proteína P3P5 eliminando el codón de terminación de la proteína P3. En primer lugar se intentó una estrategia de amplificación por *overlap extension* PCR (Materiales y Métodos, Figura 22) dividiendo cada una de las proteínas en dos grandes fragmentos amplificados por separado en la primera ronda de PCR y empleándolos como molde para una segunda ronda. Los *primers* internos de la primera amplificación contaban con las modificaciones de secuencia necesarias para eliminar los

elementos no deseados. Si bien esta estrategia funcionó en otros clonados (Sección 4.1., empalme del promotor 35S al extremo 5' del cDNA viral o en el Sección 4.3.15., construcción de mutantes del dominio F-box de la proteína P0), no fue exitosa para la amplificación de ninguna de estas proteínas.

Considerando la posibilidad de que los fragmentos del clonado de P1P2 sean muy grandes para esta estrategia de PCR, se ensayó un clonado en cuatro fragmentos. Los dos extremos se amplificaron por PCR tradicional y el segmento central se amplificó por *overlap extension* PCR. Cada segmento se clonó por separado en vectores TOPO cloning o pGEMT-e según la conveniencia para el corte y empalme en un solo vector utilizando sitios de restricción internos de las secuencias y otros presentes en los vectores (tal como fue realizada la construcción del clon infectivo). Nuevamente, como sucedió con los intentos de clonado de P1, la región serina proteasa de la proteína P1P2 no pudo ser clonada, por ello no se logró obtener la secuencia completa.

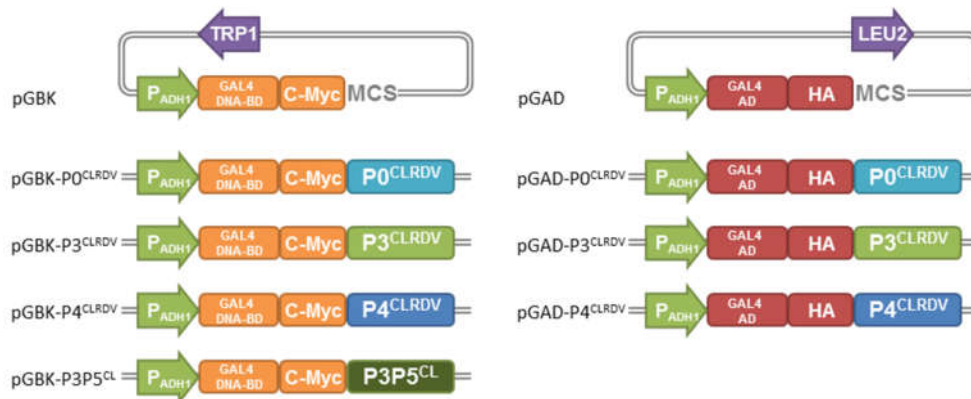


Figura 40. Esquema de los vectores plasmídicos utilizados en el ensayo de doble híbrido en levaduras. pGBK posee genes de la vía de síntesis del triptófano (TRP1) para la selección en levaduras. Río abajo del promotor constitutivo de la alcohol deshidrogenasa 1 (P_{ADH1}) se encuentra el dominio de unión al DNA del factor de transcripción GAL4 (GAL4 DNA-BD), un péptido señal (C-Myc) para la expresión de las proteínas con un *tag* y un sitio de clonado múltiple (MCS). pGAD posee genes de la vía de síntesis de la Leucina (LEU2) para la selección en levaduras. Río abajo del promotor constitutivo de la ADH1 se encuentra el dominio de activación del factor de transcripción GAL4 (GAL4 AD), un pepetido señal (HA) para la expresión de las proteínas con un *tag* y un sitio de clonado múltiple (MCS). Con los plásmidos de la serie pGAD y pGBK en las distintas combinaciones se cotransformaron levaduras de la cepa AH109 mediante la técnica de acetato de litio.

Por último, para obtener la proteína P3P5 se probó una estrategia de mutagénesis dirigida para la amplificación del ORF3-5 sin el codón de terminación del ORF3. Se amplificó por PCR a partir del clon infectivo del CLR DV el ORF3-5 que codifica para la proteína P3P5 con el codón de terminación interno de la proteína P3 inclusive, con *primers* específicos que contienen sitios de restricción de enzimas específicas para facilitar el subclonado (Materiales y Métodos, Tabla 13). El producto de PCR se clonó en el vector pGEMT-e y se secuenció para verificar la integridad de

ambos ORFs. Luego se realizó una ronda de mutagénesis dirigida (Materiales y Métodos, Sección 3.21.) con *primers* diseñados para eliminar el codón de terminación del ORF3 y se volvió a secuenciar para verificar la integridad de los genes y confirmar la eliminación del codón de terminación. De esta manera se logró clonar la proteína P3P5 completa sin el codón de terminación interno y se subclonó en el vector pGBK para obtener el clon pGBK-P3P5^{CL} (Figura 40).

4.2.2. Evaluación de las interacciones entre proteínas virales del CLRDV

Se evaluó la interacción de las proteínas virales P0^{CLR DV}, P3^{CLR DV} y P4^{CLR DV} entre sí mediante doble híbrido. Las levaduras de la cepa AH109 se cotransformaron con las diferentes combinaciones de vectores, según se indica en la Tabla 18 mediante la técnica de acetato de litio.

Evaluación de interacción entre proteínas virales			Controles de autoactivación		
pGBK-P0 ^{CLR DV}	vs.	pGAD-P0 ^{CLR DV}	pGBK-P0 ^{CLR DV}	vs	pGAD
		pGAD-P3 ^{CLR DV}	pGBK-P3 ^{CLR DV}	vs	pGAD
		pGAD-P4 ^{CLR DV}	pGBK-P4 ^{CLR DV}	vs	pGAD
pGBK-P3 ^{CLR DV}	vs	pGAD-P0 ^{CLR DV}	pGAD-P0 ^{CLR DV}	vs	pGBK
		pGAD-P3 ^{CLR DV}	pGAD-P3 ^{CLR DV}	vs	pGBK
		pGAD-P4 ^{CLR DV}	pGAD-P4 ^{CLR DV}	vs	pGBK
pGBK-P4 ^{CLR DV}	vs	pGAD-P0 ^{CLR DV}	pGBK	vs	pGAD
		pGAD-P3 ^{CLR DV}			
		pGAD-P4 ^{CLR DV}			

Tabla 18. Combinaciones de vectores cotransformados. Para la evaluación de interacciones entre las proteínas P0, P3 y P4 se cotransformaron levaduras combinando una proteína clonada en el vector pGBK con otra clonada en el vector pGAD. Además, se incluyeron los controles de autoactivación, donde cada vector conteniendo el ORF de alguna de las proteínas virales se cotransforma con el vector opuesto vacío.

Para evaluar las interacciones se realizó la selección por complementación de auxotrofías. Una vez obtenidas las levaduras cotransformadas se sembraron en forma de estría en medio mínimo suplementado carente de Leucina y Triptófano para controlar la viabilidad de las levaduras en el experimento, y en medio mínimo suplementado carente de Leucina, Triptófano, Histidina y Adenina para evaluar la interacción. Luego se incubaron las placas a 28°C y también a 21 °C, ya que a menor temperatura se disminuye la actividad metabólica favoreciendo la aparición de las interacciones más débiles.

Como se observa en el panel izquierdo de la Figura 41 todas las colonias fueron viables y crecieron tanto a 21 °C como a 28 °C (la figura no se muestra). En el medio con la cuádruple selección, los controles de las levaduras cotransformadas con: pGBK-P0^{CLR DV} vs pGAD, pGBK-P3^{CLR DV} vs pGAD, pGBK-P4^{CLR DV} vs pGAD, pGAD-P0^{CLR DV} vs pGBK, pGAD-P3^{CLR DV} vs pGBK, pGAD-P4^{CLR DV} vs pGBK y pGBK vs pGAD no crecieron, por lo tanto, no se observó autoactivación en ninguna de las construcciones analizadas (Figura 41, panel derecho).

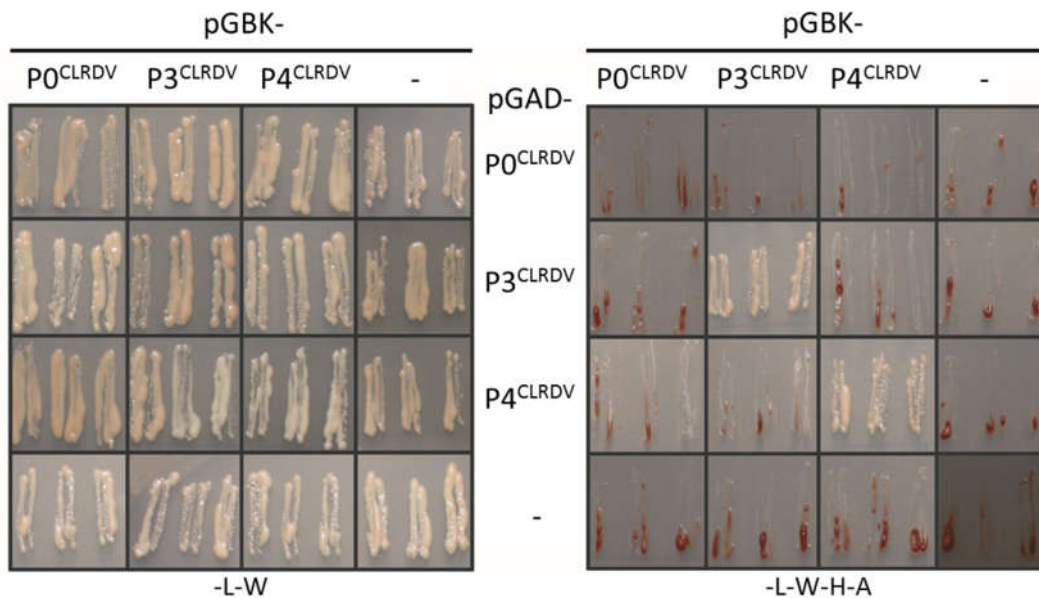


Figura 41. Evaluación de las interacciones entre proteínas virales por doble híbrido. Las levaduras de la cepa AH109 se cotransformaron con diferentes combinaciones de vectores de talladas en la Tabla 18. El panel izquierdo muestra el control de viabilidad de las levaduras cotransformadas crecidas en medio carente de Leucina y Triptófano (-L-W). El panel derecho muestra las mismas colonias en medio de selección de interacción carente de Leucina, Triptófano, Histidina y Adenina (-L-W-H-A). Se probaron tres colonias de levaduras independientes por cada interacción. Las placas se incubaron a 21 °C durante 10 días.

Sobre el panel derecho de la Figura 41 se observa el crecimiento de las levaduras cotransformadas con las construcciones pGBK-P3^{CLR}DV vs pGAD-P3^{CLR}DV y pGBK-P4^{CLR}DV vs pGAD-P4^{CLR}DV. Este resultado indica que la proteína P3 es capaz de interactuar con otra proteína P3. Se trata de un resultado esperable teniendo en cuenta que P3 es la proteína mayoritaria de la cápside viral y para el ensamblado de las partículas virales es necesaria la interacción entre ellas.

También se detectó la interacción de la proteína P4 con otra proteína P4 (Figura 41, panel derecho). Tal como se describe en la bibliografía, las proteínas involucradas en el movimiento viral de célula a célula poseen entre otras propiedades bioquímicas la capacidad de formar homodímeros que le permiten interactuar con los plasmodesmos para promover su apertura y favorecer la movilidad viral. Sin embargo, mediante este método no se detectó interacción entre las proteínas P3 y P4.

Asimismo, sobre el panel derecho de la Figura 41 no se observa crecimiento en las transformaciones con las construcciones que llevan la proteína P0. La expresión de la proteína P0 fue corroborada mediante *Western blot* en los ensayos que se describen en la Sección 4.3.10. (Figura 57). Estos resultados indican que la proteína P0 no interactúa con las proteínas P3 y P4 y si hubiera interacción no fue detectable por este método.

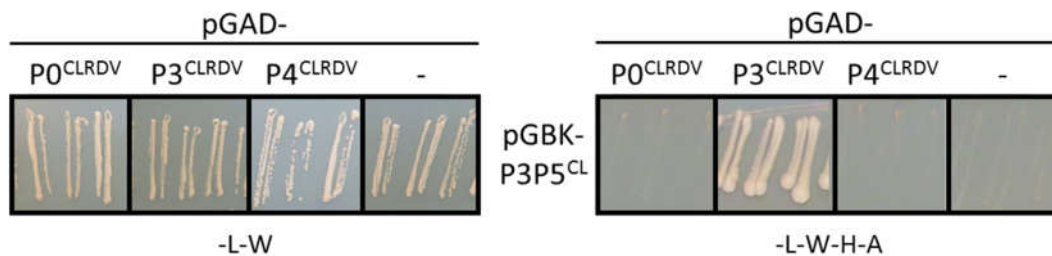


Figura 42. Evaluación de las interacciones entre proteínas virales por doble híbrido. Las levaduras de la cepa AH109 se cotransformaron con diferentes combinaciones de vectores: pGBK-P3P5^{CL} vs pGAD-P0^{CLRDV}, pGBK-P3P5^{CL} vs pGAD-P3^{CLRDV}, pGBK-P3P5^{CL} vs pGAD-P4^{CLRDV}, pGBK-P3P5^{CL} vs pGAD. El panel izquierdo muestra el control de viabilidad de las levaduras evaluadas cotransformadas crecidas en medio carente de Leucina y Triptófano (-L-W). El panel derecho muestra las mismas colonias en medio de selección de interacción carente de Leucina, Triptófano, Histidina y Adenina (-L-W-H-A).

Se evaluó la interacción de las proteínas virales P0^{CLRDV}, P3^{CLRDV}, P4^{CLRDV} con la proteína minoritaria de cápside P3P5^{CLRDV}. Las levaduras de la cepa AH109 se cotransformaron con las diferentes combinaciones de vectores pGBK-P3P5^{CL} vs pGAD-P0^{CLRDV}, pGBK-P3P5^{CL} vs pGAD-P3^{CLRDV}, pGBK-P3P5^{CL} vs pGAD-P4^{CLRDV}, pGBK-P3P5^{CL} vs pGAD. Una vez obtenidas las levaduras cotransformadas se sembraron en forma de estría en medio mínimo suplementado carente de Leucina y Triptófano para controlar la viabilidad de las levaduras en el experimento, y en medio mínimo suplementado carente de Leucina, Triptófano, Histidina y Adenina para evaluar la interacción.

Como se observa en el panel izquierdo de la Figura 42 todas las colonias fueron viables y crecieron tanto a 21 °C como a 28 °C (no se muestra). En el medio con la cuádruple selección, los controles de las levaduras cotransformadas con: pGBK-P3P5^{CL} vs pGAD no crecieron, por lo tanto, no se observó autoactivación en la construcción analizada (Figura 42, panel derecho).

Sobre el panel derecho de la Figura 42 se observa el crecimiento de las levaduras cotransformadas con las construcciones pGBK-P3P5^{CLRDV} vs pGAD-P3^{CLRDV}. Esto indica que la proteína P3P5 interactúa con la proteína P3. Se trata de un resultado esperable teniendo en cuenta que P3P5 es la proteína minoritaria de cápside y para el ensamblado de las partículas virales es necesaria la interacción entre ellas.

Las construcciones obtenidas pGBK-P0^{CLRDV}, pGBK-P3^{CLRDV}, pGBK-P4^{CLRDV}, pGBK-P3P5^{CL}, pGAD-P0^{CLRDV}, pGAD-P3^{CLRDV} y pGAD-P4^{CLRDV} no sólo permiten el estudio de las interacciones entre las proteínas virales sino también constituyen importantes herramientas para el estudio de interacciones entre las proteínas virales y para la identificación de blancos moleculares en el hospedante mediante el *screening* de bibliotecas de cDNA en doble híbrido.

4.2.3. Identificación de proteínas de células acompañantes del floema de *A. thaliana* con capacidad de interactuar con la proteína P0^{CLRDV}

Con el objetivo de identificar blancos moleculares de la proteína P0^{CLRDV} en las células donde el virus replica, se realizó un *screening* en una librería generada a partir del RNA de células acompañantes del floema de *A. thaliana* (cedida por el laboratorio de la Dra. Ziegler-Graff) a través de la técnica de doble híbrido. El mismo se realizó mediante el apareamiento entre una alícuota de la biblioteca en la cepa Y187 y la cepa Y2HGold transformada con pGBK-P0^{CLRDV}. El apareamiento entre las cepas se corroboró mediante la observación al microscopio óptico de la presencia de levaduras trilobuladas. Las levaduras resultantes del apareamiento fueron plaqueadas en medio mínimo carente de Leucina y Triptófano suplementado con X- α -Gal 40 μ g/ml y Aurobasidina 200 ng/ml e incubadas a 28 °C.

Al cabo de 5-10 días de incubación, se obtuvieron 200 colonias, pero muy pocas de ellas de color azul debido a la degradación del compuesto X- α -Gal presente en el medio. Las mismas fueron estriadas en un medio más astringente compuesto por medio mínimo carente de Leucina, Triptófano, Histidina y Adenina suplementado con X- α -Gal 40 μ g/ml y Aurobasidina 200 ng/ml e incubadas a 21 °C para favorecer el crecimiento de las levaduras que dependen de interacciones débiles. Finalmente se obtuvieron 34 clones positivos que fueron estriados nuevamente en los siguientes medios mínimos: carente de Leucina y Triptófano (SD-LW); carente de Leucina, Triptófano e Histidina (SD-LWH); carente de Leucina, Triptófano, Histidina y Adenina (SD-LWHA); carente de Leucina, Triptófano, Histidina y Adenina suplementado con X- α -Gal 40 μ g/ml y Aurobasidina 200 ng/ml (SD-LWHA/X/A) para confirmar las interacciones positivas. Todos los clones crecieron en los medios sin restricción SD-LW, SD-LWH sin embargo no se observó crecimiento en los medios de selección de interactuantes SD-LWHA, SD-LWHA/X/A. De esta manera, no fue posible identificar blancos moleculares a través de esta técnica ya que el *screening* realizado no arrojó resultados concretos que permitieran continuar con los análisis.

4.3. Identificación y caracterización del supresor de silenciamiento del RNA del CLRDV y caracterización del mecanismo de acción

4.3.1. Búsqueda de proteínas del CLRDV con actividad supresora del silenciamiento del RNA

Se han identificado en diferentes virus proteína(s) con actividad supresora del silenciamiento del RNA, pero la mayoría de estas proteínas son estructuralmente diversas y a menudo carecen de motivos de secuencia comunes. Con el objetivo de estudiar la presencia de proteínas con actividad supresora del silenciamiento en el CLRDV se realizó una evaluación *in silico* mediante una herramienta denominada “plant VsupPred”. Este programa predice que proteínas virales tienen, potencialmente, actividad supresora del silenciamiento del RNA. En la Tabla 19 se muestran los resultados del análisis para las proteínas del CLRDV.

Proteínas del CLRDV	Score	Predicción
P0	0,65	VSR
P1	0,875	NVSR
P1P2	0,925	NVSR
P3	0,625	NVSR
P4	0,575	VSR
P3P5	0,775	NVSR

Tabla 19. Predicción de las proteínas del CLRDV con posible actividad supresora del silenciamiento del RNA. VSR: *viral silencing suppressor*. NVSR: *non-viral silencing suppressor*.

El predictor indicó que las proteínas P0 y P4 son potenciales supresores del silenciamiento. Como ha sido descrito en los últimos años la proteína P0 de varios paterovirus posee actividad supresora del silenciamiento, aunque se observaron diferencias funcionales entre las proteínas P0 de diferentes virus del género (Introducción 1.3.5.5., Tabla 4). Por su parte, la proteína P4 tiene la capacidad de dimerización (descrita en la Sección 4.2.2.) típica de las proteínas de movimiento viral entre células, sin embargo, tal como indica el predictor y como se encuentra descrito en otras familias virales, podría presentar además la función de supresor del silenciamiento. Para continuar con la identificación del supresor del silenciamiento viral se decidió analizar la actividad supresora de las proteínas P0, P4 y P3. La proteína P3 es la proteína mayoritaria de la cápside viral, sin embargo, hay reportes en otras familias virales de proteínas de cápside que además poseen actividad supresora del silenciamiento como por ejemplo la CP del turnip crinkle virus (TCV). A su vez, la predicción no indica que P3 tenga características de supresor del silenciamiento sin embargo el score arrojado por el programa fue aún menor que para la proteína P0.

4.3.2. Construcción de los vectores plasmídicos utilizados para la expresión transitoria de proteínas del CLRDV en plantas

Con el objetivo de determinar si las proteínas del CLRDV tienen actividad supresora del silenciamiento del RNA se realizaron construcciones para la expresión transitoria de los ORFs candidatos del CLRDV (Figura 43). Se amplificaron las secuencias de los ORFs que codifican para las proteínas P0, P3 y P4 mediante RT-PCR a partir de cDNA del CLRDV con *primers* específicos que contienen sitios de restricción de enzimas según cada ORF para facilitar el subclonado en el vector binario pBin61. Los productos de PCR se clonaron en el vector pGEMT-e y se secuenciaron para verificar la integridad del gen. Luego, los ORFs se subclonaron en el vector binario pBin61 para obtener los clones pBin-P0^{CLRDV}, pBin-P3^{CLRDV} y pBin-P4^{CLRDV}, donde cada uno de los ORFs se encuentra bajo el control del promotor 35S de expresión constitutiva en *N. benthamiana*. Todas las construcciones fueron introducidas en la cepa GV3101 de *A. tumefaciens* por electroporación.

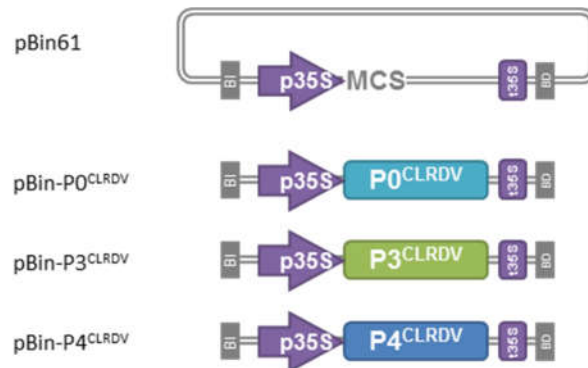


Figura 43. Esquema de los vectores plasmídicos construidos. pBin61 es un vector binario para la expresión de proteínas en plantas que contiene al promotor y terminador 35S del CaMV (p35S y t35S, respectivamente). La secuencia del ORF completo de la proteína P0 fue clonada en los sitios *Xba*I y *Bam*HI presentes en el vector mientras que P3 y P4 fueron clonados en los sitios *Xba*I y *Xho*I. BI y BD: bordes izquierdo y derecho del T-DNA del plásmido Ti de agrobacterias. Todos los vectores binarios construidos fueron secuenciados e introducidos en la cepa GV3101 de *A. tumefaciens*.

4.3.3. Identificación y caracterización de la proteína P0 del CLRDV como supresor de silenciamiento génico del RNA

La proteína P0 a pesar de ser la más divergente entre los polerovirus (Mayo y Ziegler-Graff 1996) fue identificada en la mayoría de los virus estudiados del género como supresor del silenciamiento. Las proteínas P0 poseen diversos niveles de actividad de supresión del silenciamiento del RNA y diferencias respecto de la supresión del movimiento de la señal del silenciamiento a nivel sistémico (Introducción 1.3.5.5., Tabla 4). En particular, P0 es la proteína

menos conservada del CLRDV con respecto a otros miembros del género, con una identidad de secuencia en aminoácidos del 15-30 %.

Con el objetivo de estudiar si la proteína P0 del CLRDV ($P0^{CLRDV}$) tiene actividad supresora del silenciamiento génico del RNA se utilizaron dos sistemas que permiten obtener diferente información acerca del mecanismo de acción y la etapa del proceso que estaría afectada por el supresor de silenciamiento en estudio (Introducción 1.3.4., Figura 19). En el primer sistema se utilizó la línea 16c de *N. benthamiana* que está establemente transformada con el gen de la proteína verde fluorescente de aguaviva (GFP). En el segundo sistema se estudió si la proteína $P0^{CLRDV}$ suprime el silenciamiento del RNA disparado por secuencias de RNA doble cadena en plantas de *N. benthamiana*.

4.3.4. Caracterización de la proteína $P0^{CLRDV}$ como supresor del silenciamiento del RNA en el sistema de *N. benthamiana* línea 16c.

La línea 16c de *N. benthamiana* está establemente transformada con el gen de la proteína GFP (absorción 460-500 nm/emisión 510-560 nm) y al ser iluminadas con luz ultravioleta (UV) presentan color verde fluorescente en el tallo y en las hojas. Al agroinfiltrar las plantas con bacterias conteniendo el vector binario pBin-GFP (Figura 45, panel a), diseñado para expresar en forma transitoria una segunda copia del transcripto GFP se logra silenciar la expresión del transgén de GFP. La ventaja que presenta este sistema es que el silenciamiento del mensajero de GFP puede ser fácilmente seguido ya que las zonas silenciadas se muestran rojas a la luz ultravioleta debido a la fluorescencia de la clorofila (absorción 450-500 nm/emisión 650-700 nm). A su vez, el silenciamiento de GFP puede ser bloqueado si se coinfiltra con agrobacterias conteniendo un vector que exprese una proteína supresora del silenciamiento. El silenciamiento del RNA se detecta a los 5 días posteriores a la inoculación y la supresión del silenciamiento es mayor cuanto menor es la degradación de mRNA de GFP, menor la producción de siRNA y por lo tanto es mayor la intensidad de fluorescencia de GFP bajo la luz UV.

Con el objetivo de estudiar la actividad supresora de la proteína P0 del CLRDV, se agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* línea 16c con soluciones de *A. tumefaciens* que llevan el vector pBin61-GFP (GFP) solo o combinado con los vectores pBin61- $P0^{CLRDV}$, pBin61- $P0^{CABV}$, pBin61- $P0^{TuYV}$ o el vector pBin61 vacío. En todos los tratamientos se realizó la agroinfiltración con una DO_{600} final 0,5 de cada construcción en plantas en un estadio de crecimiento de cinco a seis hojas emergidas. A los cinco días postinoculación las plantas fueron observadas bajo la luz UV (Figura 45). Los supresores del silenciamiento P0 del turnip yellows virus (TuYV, pBin61- $P0^{TuYV}$) y del

cucurbit aphid-borne yellow virus (CaBYV, pBin61-PO^{CABYV}) se utilizaron como controles positivos de proteínas P0 con actividad supresora. En los parches agroinfiltrados con el vector que expresa GFP, que corresponden al control positivo de la inducción del silenciamiento, se observó un parche de color rojo debido a la fluorescencia de la clorofila (Figura 45, panel a y f); por el contrario, al infiltrar GFP junto con las proteínas P0^{TuYV} o P0^{CABYV} se observó un parche de color verde debido a la fluorescencia de la proteína GFP (Figura 45, paneles b, c y f). La proteína P0^{CLR DV} también logró suprimir el silenciamiento del RNA de GFP (Figura 45, panel d y f); sin embargo, la intensidad fue menor a la observada con P0^{TuYV} y P0^{CABYV}, sugiriendo que la proteína P0 del CLR DV posee una actividad supresora más débil. Debido a una actividad supresora *per se* más débil o bien se trate de una consecuencia de la inestabilidad de la proteína dentro de la célula vegetal.

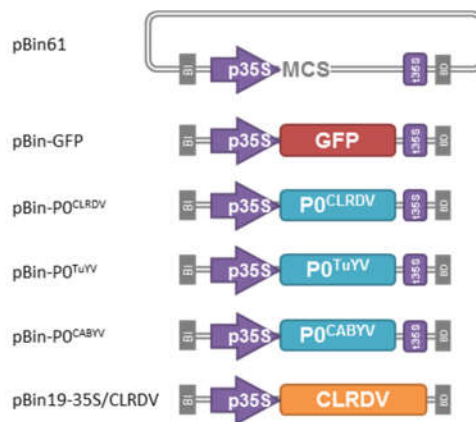


Figura 44. Esquema de los vectores plasmídicos utilizados en los ensayos en plantas *N. benthamiana* línea 16c. pBin61 vector binario vacío. pBin61-GFP, pBin61-PO^{CLR DV}, pBin61-PO^{TuYV}, pBin61-PO^{CABYV} y pBin19-35S/CLR DV son vectores binarios para la expresión en plantas de GFP, P0 del CLR DV, P0 del TuYV, P0 del CABYV y del CLR DV, respectivamente. p35S y t35S: promotor y terminador 35S del CaMV. BI y BD: bordes izquierdo y derecho del T-DNA del plásmido Ti de agrobacterias. Todos los vectores binarios fueron introducidos en la cepa GV3101 de *A. tumefaciens*.

Si bien, la proteína P0 del CLR DV expresada de manera transitoria muestra actividad supresora del silenciamiento, nos propusimos estudiar que sucede cuando la proteína P0 se encuentra en el contexto de la infección viral donde, los niveles de expresión serán dependientes del entorno del ATG en el genoma viral y donde, además de P0, se expresan el resto de las proteínas virales. En la Sección 4.1.5. se demostró que el clon infectivo de CLR DV es capaz de infectar *N. benthamiana* a pesar de no ser un hospedante natural del virus.

Para evaluar la actividad supresora del silenciamiento de la proteína P0^{CLR DV} en el contexto de la infección viral, se realizaron ensayos de coinfiltración como los descritos anteriormente, pero en este caso las plantas *N. benthamiana* línea 16c fueron infiltradas con soluciones de *A. tumefaciens* portando el vector pBin61-GFP combinado con el clon infectivo del CLR DV (pBin19-35S/CLR DV). El parche infiltrado con pBin19-35S/CLR DV mostró la misma intensidad de

fluorescencia con respecto al parche de la proteína $P0^{CLR\text{DV}}$ (Figura 45, paneles d y e), demostrando que en el contexto de la infección viral la proteína P0 también es supresora del silenciamiento. De esta manera podemos concluir que la proteína P0 es supresora del silenciamiento del RNA.

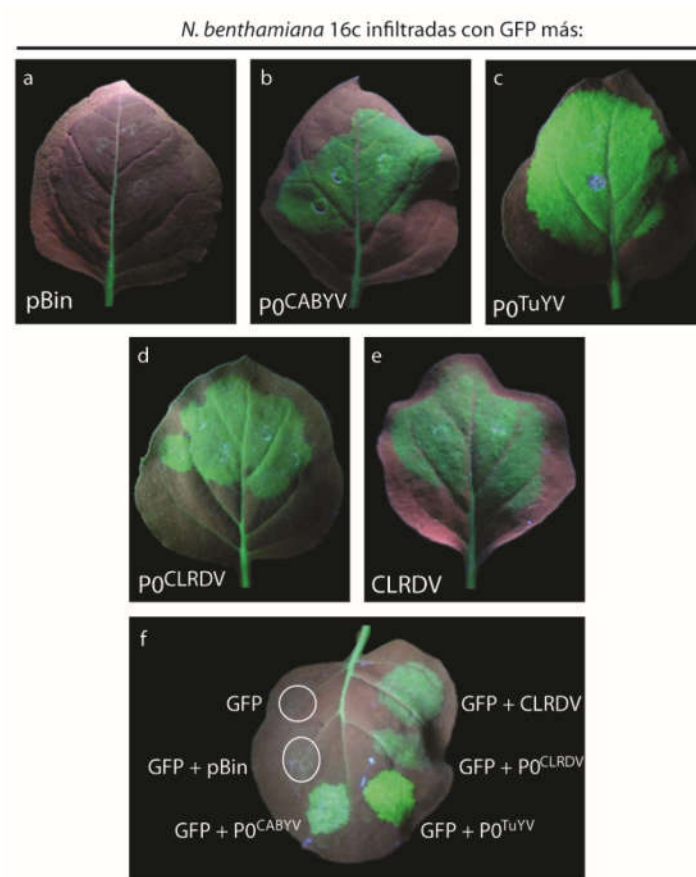


Figura 45. Ensayo de silenciamiento en plantas de *N. benthamiana* línea 16c. Hojas de *N. benthamiana* línea 16c agroinfiltradas con una mezcla de agrobacterias conteniendo pBin61-GFP junto con el vector pBin61 vacío (panel a y f), pBin61-P0^{TuYV} (panel c y f), pBin61-P0^{CABYV} (panel b y f), pBin61-P0^{CLR DV} (panel d y f) o pBin19-35S/CLR DV (panel e y f). Cada experimento de agroinfiltración se repitió tres veces en forma independiente. Las fotografías fueron tomadas con luz UV a 5 dpi. CABYV: cucurbit aphid-borne yellow virus, TuYV: turnip yellows virus, CLR DV: cotton leafroll dwarf virus y CLR DV: clon infectivo del CLR DV.

El ensayo se completó con el estudio molecular de las hojas inoculadas. Para ello se tomaron muestras de los parches agroinfiltrados en las plantas de cada tratamiento. Se realizaron extracciones de RNA total y de proteínas para analizar los niveles de mRNA y de proteína de GFP y la producción de siRNA (21-24 nt) derivados específicamente de GFP. Como se puede observar en el *Northern blot* de la Figura 46A los controles positivos (calles 3 y 4) como las hojas infiltradas con $P0^{CLR\text{DV}}$ (calle 5) y el clon infectivo del virus (calle 6) los niveles de mensajero de GFP están aumentados respecto del control (inoculado con el vector pBin61 vacío, calle 2), indicando que $P0^{CLR\text{DV}}$ suprime efectivamente el silenciamiento. Además, tal como lo indican los niveles de

fluorescencia, los mensajeros de GFP fueron mayores en PO^{TuYV} y PO^{CABYV} respecto de PO^{CLRDV} y el clon infectivo CLRDV (Figura 46A). PO^{CLRDV} y el clon de CLRDV mostraron una baja acumulación de siRNAs de 21-24 nt derivados de GFP con respecto al control con el vector pBin61 vacío (Figura 46B, calles 2, 5 y 6). Por otro lado, se analizó la expresión de la proteína GFP mediante *Western blot*. Las hojas coinfiltradas con GFP más PO^{CLRDV}, CLRDV o con los controles positivos PO^{CABYV} o PO^{TuYV} mostraron un incremento en los niveles de expresión de GFP respecto del control no inoculado de plantas 16c (Figura 46C, calles 5, 6, 3 y 4; respectivamente). A su vez, las hojas infiltradas con GFP y el vector pBin61 vacío mostraron una reducción considerable en los niveles de GFP congruente con los niveles de mRNA (Figura 46C, calle 2). Mediante la hibridación con una sonda para la secuencia de PO se pudo comprobar la presencia del mensajero de PO^{CLRDV} y de la secuencia genómica del virus en los parches infiltrados (Figura 46D, calles 5 y 6).

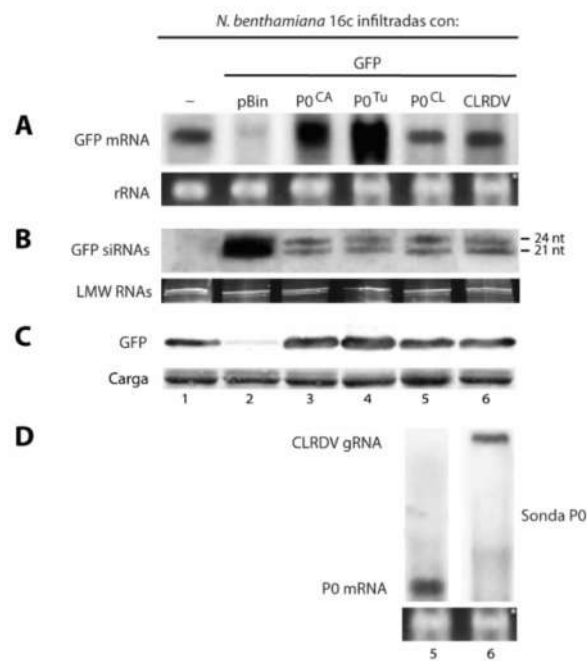


Figura 46. Análisis molecular del ensayo de silenciamiento en plantas de *N. benthamiana* línea 16c. **A)** El RNA total extraído (10 µg) a partir de los parches agroinfiltrados con GFP más pBin61, pBin-PO^{CABYV}, pBin-PO^{TuYV}, pBin-PO^{CLRDV} o pBin19-35S/CLRDV (calles 2, 3, 4, 5 y 6 respectivamente) y de hojas de la línea 16c no infiltrados (calle 1) fue analizado por *Northern blot*. Los RNAs se hibridaron con una sonda de DNA marcada con [α -³²P] dCTP específica para GFP. Los rRNAs teñidos con bromuro de etidio se utilizaron como controles de carga. **B)** El mRNA total (10 µg) extraídos a partir de muestras descritas en **(A)** se fraccionaron en gel de poliacrilamida 17,5% y se hibridaron con una sonda de DNA marcada con [α -³²P] dCTP específica de GFP para analizar la presencia de siRNAs de GFP. El RNA de bajo peso molecular (LMW) teñido con bromuro de etidio fue utilizado como control de carga. **C)** Proteínas totales extraídas a partir de las muestras descritas en **(A)** fueron corridas en un gel de poliacrilamida 12%, transferidas a membrana de nitrocelulosa y analizadas con un anticuerpo anti-GFP mediante *Western blot*. La proteína Rubisco teñida con rojo Ponceau fue utilizada como control de carga. **D)** La presencia del mRNA de la proteína PO^{CLRDV} (calles 5) o el gRNA del CLRDV (calle 6) fue detectado mediante *Northern blot* utilizando el ORF0 marcado con [α -³²P] dCTP como sonda. CA: cucurbit aphid-borne yellow virus, Tu: turnip yellows virus, CL: cotton leafroll dwarf virus, CLRDV: clon infectivo del CLRDV.

Las proteínas supresoras del silenciamiento de algunos virus impiden la movilidad de la señal de silenciamiento a nivel sistémico para evitar que las células destino tengan la señal necesaria para degradar sus genomas antes de que puedan iniciar el ciclo de infección en ellas (Introducción, Figura 19). Los ensayos en plantas 16c que expresan constitutivamente GFP en todos los tejidos permiten evaluar la capacidad de un supresor de suprimir el movimiento de la señal de silenciamiento de manera sistémica al resto de la planta. Con el objetivo de analizar la capacidad de la proteína $PO^{CLR\text{DV}}$ y del clon infectivo del CLRDV de inhibir la dispersión de la señal de silenciamiento, las plantas infiltradas en la Figura 47 fueron observadas al cabo de dos semanas postinfiltración para monitorear la expresión o el silenciamiento de GFP en las hojas nuevas que emergen en la zona apical (Figura 47). Pasados los 14 días de la inoculación, se observaron halos de color rojo alrededor de los parches en las hojas inoculadas (Figura 47 paneles insertados en e y f), indicando que hay movimiento a corta distancia (célula a célula) de la señal de silenciamiento. A su vez, las hojas superiores de las plantas agroinfiltradas con GFP (Figura 47, panel b) y con la proteína $PO^{CLR\text{DV}}$ (Figura 47, panel e) o el clon infectivo de CLRDV (Figura 47, panel f) mostraron silenciamiento de GFP en las nervaduras de las hojas superiores (nervaduras de color rojas), al igual que las ya caracterizadas proteínas $PO^{CAB\text{YV}}$ (Figura 47, panel c) y $PO^{Tu\text{YV}}$ (Figura 47, panel d). Este cambio en el patrón de expresión de GFP se debe al movimiento de la señal del silenciamiento que primero alcanza las nervaduras del tejido distal para luego amplificarse y silenciar GFP en toda la planta. Tanto en $PO^{CLR\text{DV}}$ como en CLRDV se observó un 80% de plantas con silenciamiento sistémico. Estos resultados indican que $PO^{CLR\text{DV}}$ no es capaz de interferir con la propagación sistémica del silenciamiento del RNA, cuando es expresada sola o en el contexto de la infección viral. Por otra parte, el virus no expresaría ninguna proteína capaz de bloquear el silenciamiento sistémico. Además, entre los ocho y diez días posteriores a la inoculación se observó que mientras en $PO^{CLR\text{DV}}$ y el clon infectivo de CLRDV la fluorescencia en las hojas inoculadas comienza a decaer, en los controles positivos ($PO^{Tu\text{YV}}$ y $PO^{CAB\text{YV}}$, Figura 47, insertos de paneles e y f) se mantiene aun después de los 14 dpi. Esto podría indicar una diferencia en la estabilidad de las proteínas analizadas o bien una diferencia en la duración de la actividad supresora a lo largo del tiempo.



Figura 47. Silenciamiento sistémico a los 14 días postinfiltración. Plantas de *N. benthamiana* 16c infiltradas con una mezcla de agrobacterias con pBin-GFP más: pBin61 (panel b), pBin-P0^{CABYV} (panel c), pBin-P0^{TuYV} (panel d), pBin-P0^{CLR DV} (panel e), o pBin19-35S/CLR DV (panel f). Las plantas 16C sin inocular (panel a) fueron utilizadas como control. Se indica el número de plantas con silenciamiento sistémico sobre el número total de plantas infiltradas. En la foto inferior en cada panel se observa una hoja agroinfiltrada que presenta el halo rojo entorno al parche de inoculación.

4.3.5. Respuesta hipersensible de *N. benthamiana* línea 16c a P0^{CLR DV} y el clon infectivo de CLR DV

Las proteínas virales supresoras del silenciamiento son parte del mecanismo de contra defensa viral desarrollado en respuesta a la defensa de la planta mediada por el silenciamiento del RNA. Según el modelo de Zig-Zag de defensa y contradefensa (Introducción, Figura 16) y la evidencia experimental en el estudio de otras proteínas virales, las plantas pueden reconocer y desencadenar una respuesta frente a los supresores del silenciamiento u otros factores de virulencia virales denominada respuesta hipersensible. Se trata de la contra-contra defensa de la planta frente al patógeno y es visible en las hojas manifestándose como una necrosis.

N. benthamiana 16c infiltradas con GFP más:

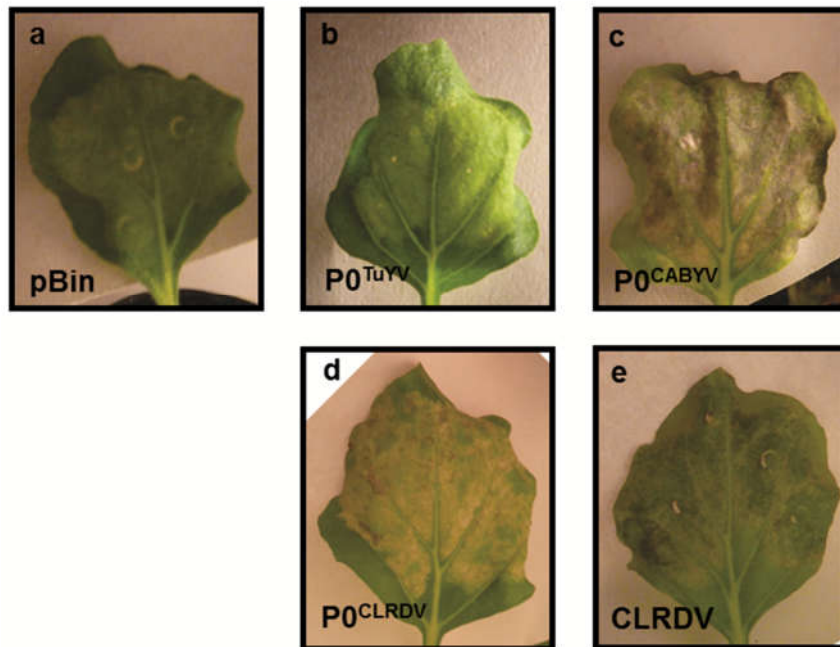


Figura 48. Necrosis en hojas inoculadas del ensayo de silenciamiento en plantas de *N. benthamiana* línea 16c. Hojas de *N. benthamiana* línea 16c agroinfiltradas con una mezcla de agrobacterias conteniendo pBin61-GFP junto con el vector pBin61 vacío (panel a), pBin61-P0^{TuYV} (panel b), pBin61-P0^{CABYV} (panel c), pBin61-P0^{CLR DV} (panel d) o pBin19-35S/CLR DV (panel e). Las fotografías fueron tomadas con luz blanca 10 días postinfiltración.

A los 10 días postagroinfiltración se observó la presencia de necrosis en los parches infiltrados que expresan P0^{CABYV}, P0^{CLR DV} y el clon infectivo de CLR DV (Figura 48, c, d y e). El control inoculado con pBin61 vacío no mostro necrosis (Figura 48, panel a), lo cual indica que se trata de un efecto de respuesta frente a las proteínas virales y no a la bacteria *A. tumefaciens*. Las hojas infiltradas con pBin-P0^{TuYV} (Figura 48, panel b) no mostraron síntomas de necrosis e incluso la fluorescencia en estas hojas se mantiene hasta los 21 días postinfiltración. El clon infectivo del CLR DV desencadenó una respuesta aun mayor de hipersensibilidad que la proteína P0^{CLR DV} sola. Esto indicaría que otros mecanismos de la infección viral tales como la replicación viral o la expresión de otras proteínas virales estarían siendo reconocidos por la planta y exacerbarían el efecto de P0. Estos resultados muestran que el mecanismo de defensa antiviral de *N. benthamiana* frente a la presencia de P0^{CLR DV} y el clon infectivo de CLR DV desencadena una respuesta hipersensible.

4.3.6. Caracterización de la proteína P0^{CLR DV} como supresor de silenciamiento del RNA en el sistema de *N. benthamiana*

A diferencia del sistema experimental descrito anteriormente, los ensayos en *N. benthamiana* permiten dilucidar otras características del mecanismo de acción del supresor del silenciamiento

en estudio. En estos ensayos también es utilizada la proteína GFP como gen reportero expresada de manera transitoria a partir de un vector binario (pBin-GFP, Figura 49) pero el silenciamiento se desencadena mediante una horquilla de RNA doble cadena (pBin-hpGF, Figura 49). La horquilla es complementaria al extremo 5' del transcripto de GFP. Al transcribirse esta construcción se generan moléculas de RNA con los extremos 5' y 3' complementarios entre sí. Una vez sintetizada se pliega sobre sí misma para formar un dúplex de RNA que será reconocido y procesado por la maquinaria del silenciamiento génico para producir siRNA específicos contra el 5' del transcripto de GFP. Estos ensayos permiten realizar dos abordajes, en el primero de ellos se coagroinfiltra la horquilla de GF (hpGF) con las proteínas en el estudio y analizando por *Northern blot* la producción de siRNA se puede determinar si un supresor es capaz de inhibir la acción de las enzimas *Dicer-like* (DCL). En el segundo ensayo se coagroinfiltran pBin-GFP, pBin-hpGF y la proteína en estudio (pBin-P38, pBin-P0^{CLR DV}, pBin-P0^{CABYV}, pBin-P0^{TuYV}). Luego se analiza por *Northern blot* la producción de siRNA específicos contra la región "P" (excluida de la horquilla hpGF). Si no se detectaran siRNAs con la sonda específica entonces se puede inferir que el supresor del silenciamiento ejerce su acción inhibiendo el proceso de amplificación o bien bloqueando algún paso previo en la vía del silenciamiento (Introducción, Figura 19).

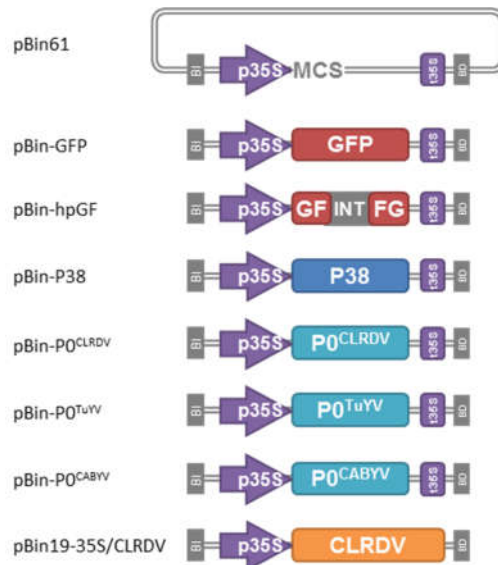


Figura 49. Esquema de los vectores plasmídicos utilizados en los ensayos en plantas de *N. benthamiana*. pBin-GFP, pBin-GFFG, pBin-P38, pBin-P0^{CA}, pBin-P0^{Tu}, pBin-P0^{CL} y pBin19-35S/CLR DV son vectores binarios para la expresión en plantas de GFP, hpGF, P38 del TCV, P0 de CABYV, P0 de TuYV, P0 de CLR DV y el CLR DV, respectivamente. p35S y t35S: promotor y terminador 35S del CaMV. BI y BD: bordes izquierdo y derecho, respectivamente, del T-DNA del plásmido Ti de agrobacterias. Todos los vectores binarios fueron introducidos en la cepa GV3101 de *A. tumefaciens*.

Para el primer abordaje se utilizaron como controles los supresores del silenciamiento de polerovirus previamente caracterizados (pBin-P0^{CABYV} y pBin-P0^{TuYV}) y el supresor del silenciamiento del turnip crinkle virus (TCV, *Carmovirus*) que actúa inhibiendo la acción de las

enzimas DCL (pBin-P38). Con el objetivo de evaluar si el mecanismo de acción de la proteína PO^{CLRDV} implica la inhibición del procesamiento del RNA doble cadena (por ejemplo, hpGF) analizamos la presencia siRNAs derivados de "GF" en hojas de plantas de *N. benthamiana* (en un tamaño de entre cinco y seis hojas) agroinfiltradas con las proteínas supresoras del silenciamiento y el hpGF (Figura 50) mediante *Northern blot*. En la hibridación de siRNAs con una sonda para "GF" se observaron siRNAs derivados de la horquilla tanto en PO^{CLRDV} (Figura 50, calle 5) como en los controles PO^{CABYV} y PO^{TuYV} (Figura 50, calles 3 y 4) mientras que en el control positivo P38 no se detectan siRNAs (Figura 50, calle 2). A su vez, se analizó el efecto del virus CLRDV (pBin-hpGF y pBin19-35S/CLRDV) mediante la agroinfiltración del clon infectivo con el hpGF. Al igual que PO^{CLRDV} solo, la proteína PO en el contexto de la infección viral no se observó inhibición del procesamiento de la horquilla (Figura 50, calle 6). Esto indica que la actividad supresora del silenciamiento del RNA de la proteína PO^{CLRDV} no interfiere con la actividad de las DCL e incluso ninguna de las proteínas codificadas por el CLRDV sería capaz de bloquear el procesamiento primario del hpGF durante la infección viral.

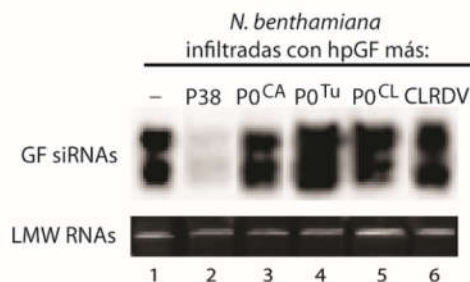


Figura 50. Análisis del procesamiento del hairpin de GF en *N. benthamiana*. Las hojas de plantas de *N. benthamiana* fueron coinfiltradas con pBin-hpGF y pBin, pBin-P38, pBin-PO^{CABYV}, pBin-PO^{TuYV}, pBin-PO^{CLRDV} o pBin19-35S/CLRDV (calles 1, 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente). mRNA total (10 µg) extraídos a partir de las muestras descriptas se fraccionaron en un gel de poliacrilamida 17,5% y se hibridaron con una sonda de DNA marcada con [α-³²P] dCTP específica de GFP para analizar la presencia de siRNAs derivados del hpGF por *Northern blot*. El RNA de bajo peso molecular (LMW) teñido con bromuro de etidio fue utilizado como control de carga.

En el segundo abordaje se estudió el efecto de la proteína PO del CLRDV sobre el silenciamiento del RNA del mRNA de GFP mediado por la horquilla de GF (hpGF). Para ello, se agroinfiltraron hojas de plantas de *N. benthamiana* (en un tamaño de entre cinco y seis hojas) con una mezcla de agrobacterias que contienen vectores binarios con los diferentes supresores del silenciamiento analizados pBin-PO^{CABYV}, pBin-PO^{TuYV}, pBin-P38, pBin-PO^{CLRDV} o el clon infectivo del CLRDV (pBin19-35S/CLRDV), junto con GFP (pBin-GFP) y la horquilla inductora del silenciamiento de GFP (pBin-hpGF) (Figura 51). Como control de la expresión transitoria de GFP se agroinfiltraron hojas con el vector binario pBin-GFP. A su vez, como control del silenciamiento se agroinfiltraron hojas con el vector binario vacío pBin61, GFP (pBin-GFP) y hpGF (pBin-hpGF) (Figura 51, paneles a y b). Cinco días postinfiltración se observó la zona infiltrada con luz UV y se

registró el efecto de todas las proteínas ensayadas (Figura 51, paneles c-f) y del clon infectivo (panel g).

N. benthamiana infiltradas con GFP más:

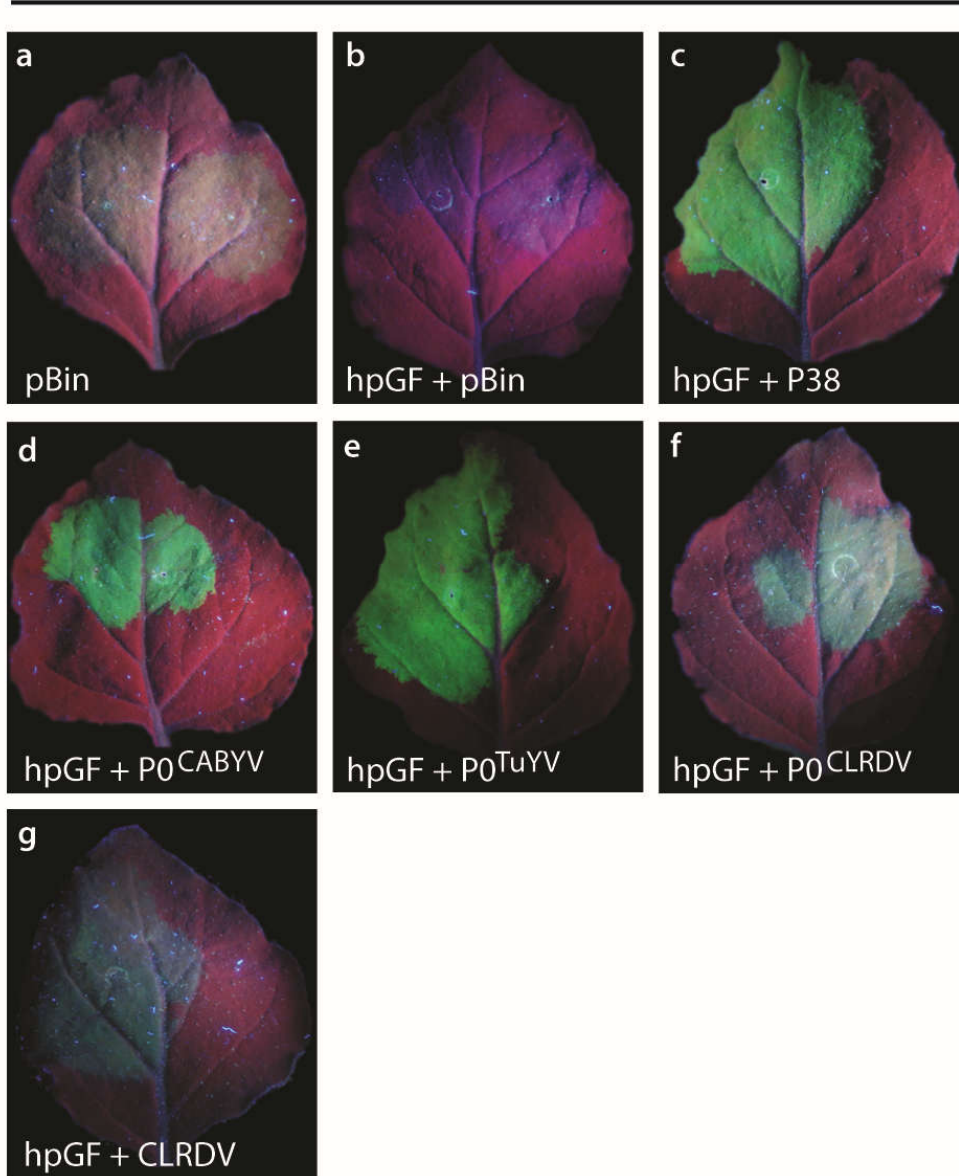


Figura 51. Ensayo de silenciamiento en plantas de *N. benthamiana*. Hojas de plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con una mezcla de agrobacterias que contienen a pBin-GFP junto con el vector pBin61 vacío (panel a), pBin-GFP junto con el vector pBin-hpGF inductor del silenciamiento (panel b, control con el vector vacío pBin61) o bien combinado con los supresores: pBin-P38 (panel c), pBin-P0^{CA} (panel d), pBin-P0^{Tu} (panel e), pBin-P0^{CL} (panel f) y pBin19-35S/CLR DV (panel g). Cada experimento de agroinfiltración se repitió tres veces en forma independiente. Las fotografías fueron tomadas con luz UV a los 5 dpi.

En concordancia con los resultados de los ensayos realizados en *N. benthamiana* línea 16c, en este sistema se observó que la proteína P0^{CLR DV} sola o en el contexto de la infección viral es capaz

de suprimir el silenciamiento de GFP (Figura 51, paneles f y g). Asimismo, la intensidad de fluorescencia para PO^{CLRDV} y el clon completo CLRDV fue igual entre sí, pero menor a la observada para el resto de los supresores. Esto podría indicar que la proteína PO del CLRDV posee un efecto supresor del silenciamiento más débil respecto a las proteínas PO de los otros virus analizados.

A diferencia del abordaje en las plantas *N. benthamiana* línea 16c, los ensayos en *N. benthamiana* permiten analizar la producción de siRNAs fuera de la región incluida en la horquilla de dsRNA utilizada (pBin-hpGF). Teniendo en cuenta las etapas del mecanismo del silenciamiento (Introducción, Figura 19), la presencia de siRNAs en la región "P" del gen de GFP indica que se ha establecido el proceso de amplificación y se producen siRNAs secundarios. Con el objetivo de analizar el efecto a nivel molecular se extrajo de la zona agroinfiltrada RNA total para analizar por *Northern blot* los niveles de transcriptos de GFP, de siRNAs derivados del procesamiento del hpGF y de siRNAs específicos de la región "P" del mRNA de GFP. De acuerdo con lo observado en los parches inoculados, tanto en los controles con PO^{CABVV} y PO^{TuYV} como en las hojas infiltradas con PO^{CLRDV} se observa un aumento en los niveles de transcriptos de GFP (Figura 52A, calles 6, 7 y 8) y una disminución en los niveles de siRNAs derivados de "GF" con respecto al control de la planta silenciada (Figura 52B, calles 6, 7 y 8). De esta manera se comprueba que la proteína PO del CLRDV posee actividad supresora del silenciamiento también en este sistema evaluado. Por otra parte, en ninguno de los supresores evaluados se observa la producción de siRNAs sobre la región "P" del gen (no hay siRNAs secundarios) (Figura 52B). Estos resultados indican que la proteína PO del CLRDV bloquea el mecanismo del silenciamiento en algún paso anterior al punto de amplificación de los siRNAs.

Al igual que en los ensayos anteriores, se evaluó el efecto de PO^{CLRDV} en el contexto de la infección viral mediante la inoculación del clon infectivo del virus. Respecto a la cantidad de mGFP y producción de siRNAs se observó un comportamiento similar al observado para la proteína PO^{CLRDV} (Figura 52A, B, calle 9). Es interesante remarcar que, mientras en las proteínas PO utilizadas como control la disminución en la producción de siRNAs es homogénea entre 21 y 24 nt, en PO^{CLRDV} se observa una disminución mayor en la producción de siRNAs de 21 nt respecto de 24 nt (Figura 52, calle 8) y en el contexto de la infección viral esta diferencia es más sutil (Figura 52, calle 9).

A partir de estos resultados podemos concluir que la proteína PO del CLRDV fue capaz de inhibir la producción secundaria pero no la producción primaria de siRNAs, sugiriendo que la proteína PO^{CLRDV} inhibe un paso en la vía del silenciamiento del RNA río abajo de la producción de siRNA primarios mediada por DCL.

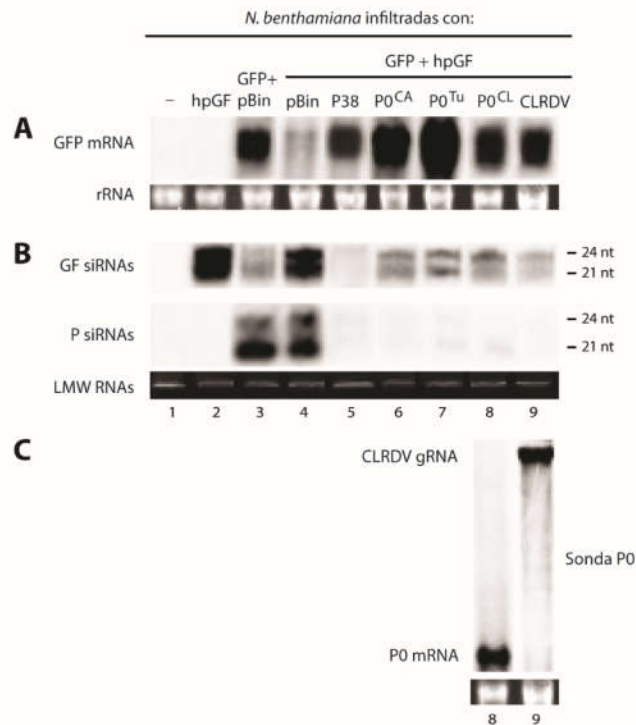


Figura 52. Análisis molecular del ensayo de silenciamiento en plantas de *N. benthamiana*. **A)** Análisis del mRNA de GFP en los parches infiltrados con agrobacterias conteniendo las construcciones pBin-hpGF (calle 2) pBin-GFP más pBin61 (calle 3), pBin-GFP más pBin-hpGF y pBin61 (calle 4) y pBin-GFP más pBin-hpGF con pBin-p38, pBin-P0^{CA}, pBin-P0^{Tu}, pBin-P0^{CLRVDV} o CLRVDV (calles 5, 6, 7, 8 y 9, respectivamente) por *Northern blot*. Los RNAs se hibridaron con una sonda de DNA marcada con [α -³²P] dCTP específica para GFP. Los rRNAs teñidos con bromuro de etidio se utilizaron como controles de carga. **B)** RNA total (10 μ g) extraído a partir de las muestras descritas en **(A)** se fraccionó en un gel de poliacrilamida 17,5% y se hibridó con una sonda de DNA específica para GF y para P marcada con [α -³²P] dCTP. El RNA de bajo peso molecular (LMW) fue utilizado como control de carga. **C)** La presencia del mRNA de P0 (calle 8) o el gRNA del CLRVDV (calle 9) fue detectado mediante *Northern blot* utilizando el ORF0 marcado con [α -³²P] dCTP como sonda.

4.3.7. Estudio de la actividad supresora del silenciamiento del RNA de las proteínas P3 y P4 del CLRVDV

Como se describió en la Sección 4.3.1., según la predicción de proteínas virales supresoras del silenciamiento realizada *in silico* mediante la herramienta plant VsupPred, la proteína P4 del CLRVDV podría tener actividad supresora. Por otra parte, si bien la predicción no indica que la proteína P3 tenga características de supresor del silenciamiento, el *score* arrojado por el programa fue aún menor que para la proteína P0 y por ello se decidió incorporarla en el análisis.

N. benthamiana 16c infiltradas con GFP más:

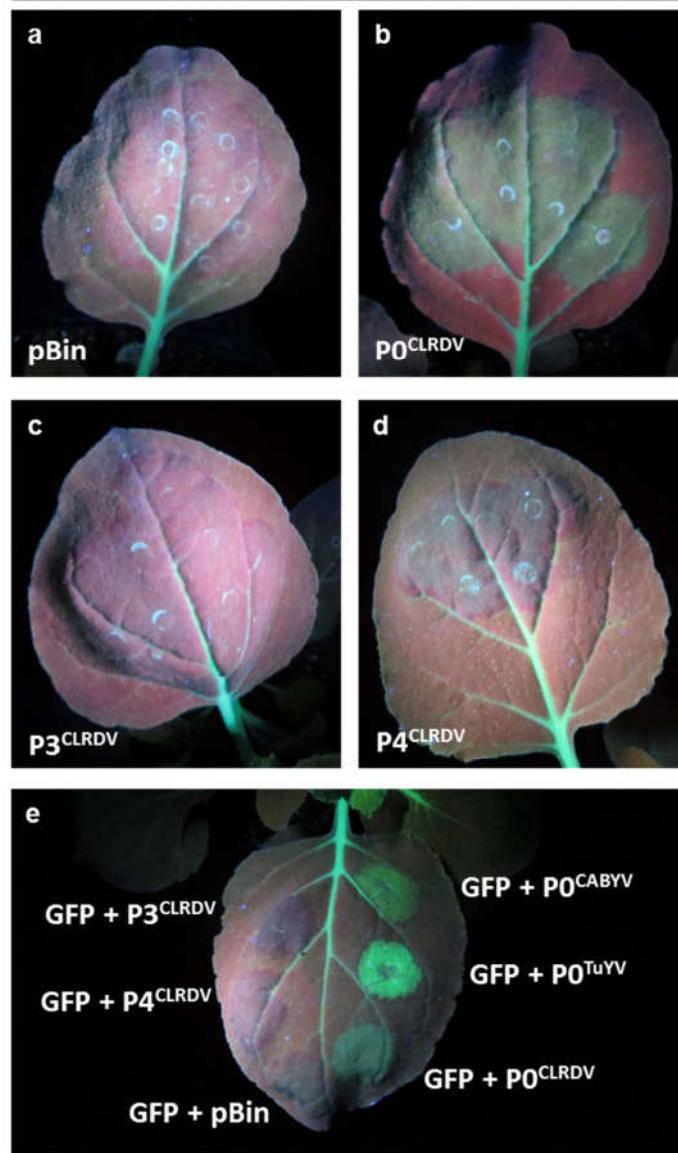


Figura 53. Ensayo de silenciamiento en plantas de *N. benthamiana* línea 16C. A) Hojas de *N. benthamiana* línea 16C infiltradas con una mezcla de agrobacterias conteniendo pBin-GFP junto con el vector pBin61 vacío (panel a y e), o bien combinado con las proteínas: pBin-P3^{CLR DV} (panel c y e), pBin-P4^{CLR DV} (panel d y e) y el control positivo pBin-P0^{CLR DV} (panel b y e). También se utilizó pBin-P0^{TuYV} y pBin-P0^{CaBYV} como control (panel e). Las fotos fueron tomadas con luz UV a los 5 días postinfección.

Para evaluar si las proteínas P3 y P4 poseen actividad supresora del silenciamiento del RNA se agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* línea 16c con agrobacterias conteniendo las construcciones pBin-GFP y las proteínas a evaluar (pBin-P3^{CLR DV} o pBin-P4^{CLR DV}) (Figura 53) y de *N. benthamiana* con pBin-GFP, la horquilla hpGF para inducir el silenciamiento (pBin-hpGF) y las proteínas a evaluar (Figura 54).

N. benthamiana infiltradas con GFP más:

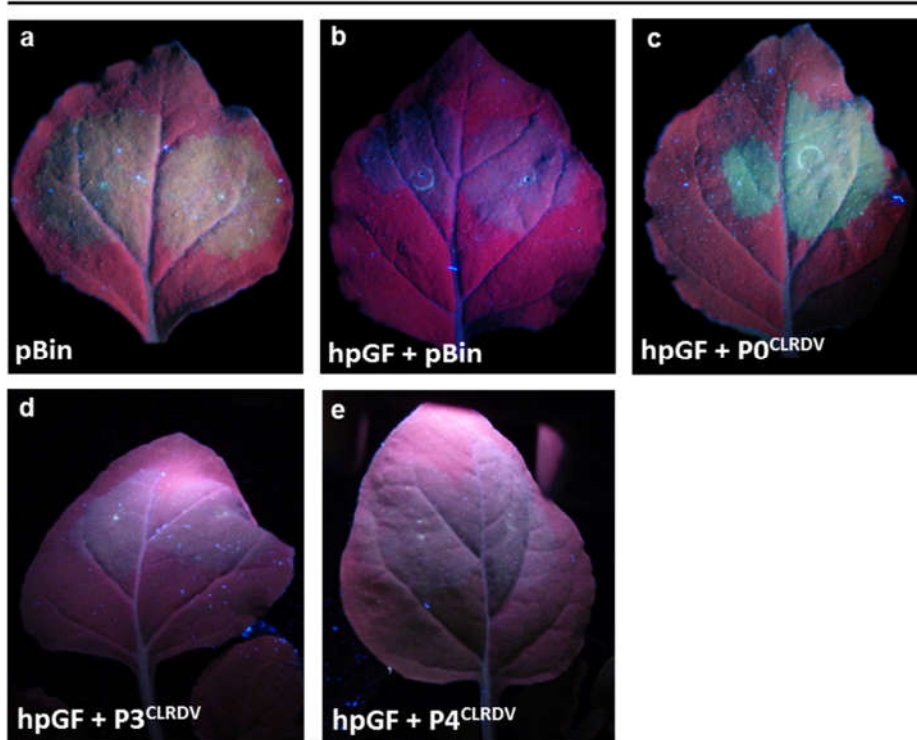


Figura 54. Ensayo de silenciamiento en plantas de *N. benthamiana*. A) Hojas de *N. benthamiana* infiltradas con una mezcla de agrobacterias conteniendo pBin-GFP junto con el vector pBin61 vacío (panel a), pBin-GFP junto con el vector pBin-hpGF inductor del silenciamiento (panel b, control con el vector vacío pBin61) o bien combinado con las proteínas: pBin-P3^{CLR DV} (panel d), pBin-P4^{CLR DV} (panel e) y el control positivo pBin-P0^{CLR DV} (panel c). Las fotos fueron tomadas con luz UV a los 5 días postinfección.

Como se observa en las Figuras 53 y 54 cinco días después de la inoculación los parches de las hojas inoculadas con las proteínas P3 y P4 se vieron de color rojo a la luz UV (Figura 53, paneles d y e; Figura 54, paneles c, d y e), es decir, no presentaron supresión del silenciamiento en ninguno de los dos sistemas evaluados. La supresión del silenciamiento solo se observó en el control que expresa P0^{CLR DV}. Por lo tanto, se puede concluir que las proteínas P3 y P4 no poseen actividad supresora del silenciamiento local, o al menos no es detectable por el método utilizado.

4.3.8. Estudio del mecanismo de acción de la proteína P0 del CLR DV

Recientemente se ha demostrado que las proteínas P0 de los polerovirus TuYV y CABYV interactúan con las proteínas ASK1 y ASK2 de *A. thaliana* de los complejos SKP1-Cullin F-Box (SCF) de la familia de E3 ubiquitín ligasas. Los complejos SCF están encargados de transferir ubiquitina a las proteínas sustrato y según los estudios realizados el dominio F-Box de las proteínas P0 permite la interacción con las proteínas ASK confiriéndole especificidad de sustrato al complejo SCF y permitiendo la marcación la proteína AGO1 para su degradación en la vía de

autofagia (Introducción, Sección 1.3.5.5.) (Derrien y Genschik 2014). A partir de estos resultados se estudió el mecanismo de acción de P0 a nivel molecular y se evaluó la conservación del mecanismo de acción en el patosistema CLRDV-Algodón.

Se identificó el dominio F-Box (**LPXXL/IX₍₁₀₋₁₃₎P**) en la proteína P0 del CLRDV y comparando con el dominio presente en otros virus del género *Polerovirus* se determinó que el dominio F-Box de la proteína P0^{CLR_{VDV}} está conservado (**LPFIIX₍₁₀₎P**) (Figura 55).

CLR _{VDV}	68	LPFIIRGI----	SSSRFALP--	83
CLR _{VDV} ^{at}	68	LPFLVGGI----	SSSRFALPR-	84
CtRLV	61	LPCILNNDYKMGGS	AIWCKPD-	81
CpCSV	62	LPFLFGS--	FEFFGDQLVWPW-	80
CYDV-RPV	64	LPILLTGESYSWRG-	HLNLPL-	83
PLRV	76	LPRHLHYECLWGLL	CGTHPA-	96
WYDV-GPV	76	LPIRFHAHLRWGLA	IGYTPV-	96
TuYV	63	LPLHLGDHIHDDVR	KSILAPE-	83
BchV	61	LPNLIWSSWDHGTIL	YGDRPF-	81
TVDV	56	LPXLLSSRC---	PFFSGNAPH-	73
BMVYV	53	LPLLL ^{SK} QL--	DPGSFIYTPG-	71
CABYV	54	LPLLISEQL---	SGDYVYTPG-	71
MABYV	56	LPLLISEQL---	SGDYVYTPGV	74
		**	.	*

Figura 55. Alineamiento del dominio F-Box de la proteína P0 de distintos polerovirus. CtRLV: carrot red leaf virus, CpCSV: chickpea chlorotic stunt virus, CYDV: cereal yellow dwarf virus, PLRV: potato leafroll virus, WYDV-GPV: wheat yellow dwarf virus-GPV, TuYV: turnip yellows virus, BChV: beet chlorosis virus, TVDV: tobacco vein distorting virus, BMVYV: beet mild yellowing virus, CABYV: cucurbit aphid-borne yellow virus, y MABYV: melon aphid-borne yellows virus. En gris se resaltan las posiciones conservadas del dominio F-Box.

Considerando el mecanismo descrito en bibliografía y teniendo en cuenta la presencia del dominio F-box se analizó la interacción de la proteína P0^{CLR_{VDV}} con las proteínas previamente identificadas en *A. thaliana* (ASK1 y ASK2) y sus correspondientes ortólogos en *N. benthamiana* (SKP1) y *G. hirsutum* (GSK1) mediante el sistema de doble híbrido en levaduras.

4.3.9. Construcción de vectores para evaluar interacciones por doble híbrido en levaduras

Se amplificaron las secuencias del ORF que codifica para la proteína P0 del CLRDV y la proteína GSK1 de *G. hirsutum* (ortólogo de ASK1 de *A. thaliana*) mediante RT-PCR a partir de cDNA con *primers* específicos (Materiales y Métodos, Sección 3.17., Tabla 11) que contienen sitios de restricción para facilitar el subclonado en los vectores pGBKT7 y pGADT7. Los productos de PCR se clonaron en el vector pGEMT-e y se secuenciaron para verificar la integridad de los ORFs.

Luego, los ORFs se subclonaron en los vectores de destino para obtener las construcciones pGBK-P0^{CLRDV}, pGAD-P0^{CLRDV}, pGBK-GSK1 y pGAD-GSK1 (Figura 56). Por otro lado, las construcciones de pGAD-Ask1, pGBK-Ask1, pGAD-Ask2 y pGBK-Ask2 de las proteínas ASK1 y ASK2 de *A. thaliana*, pGAD-Skp1 de *N. benthamiana* y pGAD-P0^{TuYV} fueron cedidas por la Dra. Véronique Ziegler-Graff del IBMP, Strasbourg, Francia (Figura 56). Con todas las construcciones se cotransformaron levaduras competentes de la cepa AH109.



Figura 56. Esquema de los vectores plasmídicos utilizados en el ensayo de doble híbrido en levaduras. pGBK posee genes de la vía de síntesis del triptófano (TRP1) para la selección en levaduras. Río abajo del promotor constitutivo de la alcohol deshidrogenasa 1 (P_{ADH1}) se encuentra el dominio de unión al DNA del factor de transcripción GAL4 (GAL4 DNA-BD), un péptido señal (C-Myc) para la expresión de las proteínas con un tag y un sitio de clonado múltiple (MCS). pGAD posee genes de la vía de síntesis de la Leucina (LEU2) para la selección en levaduras. Río abajo del promotor constitutivo de la ADH1 se encuentra el dominio de activación del factor de transcripción GAL4 (GAL4 AD), un pepetido señal (HA) para la expresión de las proteínas con un tag y un sitio de clonado múltiple (MCS). Con los plásmidos de la serie pGAD y pGBK en las distintas combinaciones se cotransformaron levaduras de la cepa AH109 mediante la técnica de acetato de litio.

4.3.10. Análisis de la interacción de la proteína P0^{CLRDV} con las proteínas ASK1 y ASK2 de *A. thaliana*, SKP1 de *N. benthamiana* y GSK1 de *G. hirsutum*

Teniendo en cuenta los antecedentes previos se evaluó la posible interacción de la proteína P0^{CLRDV} con las proteínas ASK1 y ASK2 de *A. thaliana* (Figura 57). Las levaduras cotransformadas se incubaron a 28 °C y también a 21 °C, ya que a menor temperatura se disminuye la actividad metabólica favoreciendo la aparición de las interacciones más débiles. En los controles no se observó autoactivación en la cotransformación de pGBKT7-P0^{CLRDV} con el vector pGAD vacío y en pGAD-P0^{CLRDV} con pGBK vacío (Figura 57). A diferencia de lo observado con la proteína P0^{TuYV}, la proteína P0^{CLRDV} no interactuó con las proteínas ASK1 y ASK2 a ninguna de las dos temperaturas de incubación ensayadas. Se realizó el análisis con las proteínas fusionadas a ambos dominios

(Figura 57 A y C), para descartar algún impedimento estérico que impida la interacción entre las proteínas o la reconstrucción del factor de transcripción GAL4. Además, para descartar la posibilidad de que la ausencia de interacción se deba a que la proteína $P0^{CLRDV}$ no se exprese, se evaluó la expresión de la proteína P0 con anticuerpos contra el epítipo de c-Myc presente en la proteína de fusión mediante *Western blot* (Figura 57 B). Como se observa en la Figura 57 B, se detectaron las proteínas con el tamaño esperado producto de la fusión de cada P0 con el dominio de unión al DNA (*Binding domain*, BD) y el *tag* de c-Myc.

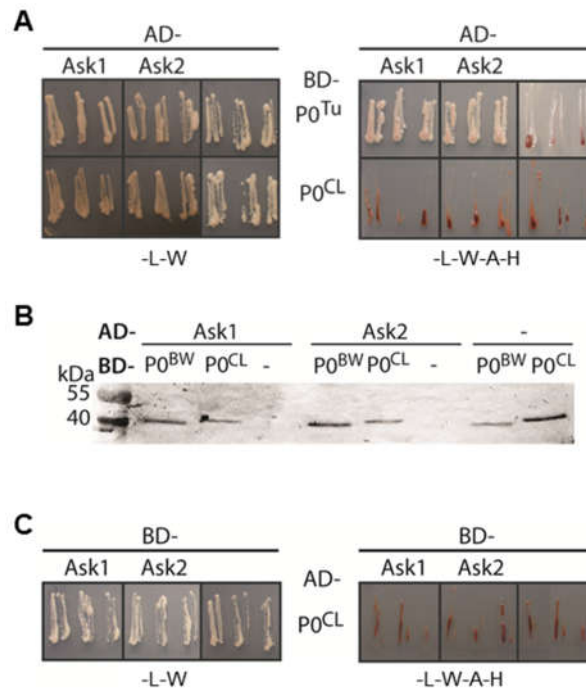


Figura 57. Evaluación de la interacción de $P0^{CLRDV}$ con las proteínas ASK1 y ASK2 de *A. thaliana*. **A)** Se cotransformaron levaduras con los vectores pGBK- $P0^{CLRDV}$ o pGBK- $P0^{Tu}$ combinados con pGAD-Ask1, pGAD-Ask2 o pGAD. $P0^{Tu}$ es un control positivo de la interacción. El medio sin leucina ni triptófano (-L-W) permite la selección de las levaduras cotransformadas y la ausencia de adenina e histidina permite la selección de levaduras donde ocurre la interacción entre las proteínas analizadas (-L-W-A-H). Se muestra la evaluación realizada a 21 °C. **B)** Análisis de la expresión de las proteínas $P0^{CLRDV}$ y $P0^{Tu}$ a partir de extractos de proteínas de las levaduras cotransformadas en (A) por *Western blot*. Se utilizaron anticuerpos comerciales que reconocen el epítipo c-Myc presente a continuación del dominio BD. **C)** Se cotransformaron levaduras con el vector pGAD- $P0^{CLRDV}$ combinado con pGBK-Ask1, pGBK-Ask2 o pGBK. Se muestra la evaluación realizada a 21 °C.

Por otra parte, teniendo en cuenta la capacidad infectiva de CLRDV en *N. benthamiana*, se evaluó la interacción de la proteína $P0^{CLRDV}$ con el ortólogo a ASK1 de *N. benthamiana*, SKP1. Como se muestra en la Figura 58 el crecimiento de levaduras en la cuádruple selección demostró que la proteína $P0^{CLRDV}$ interactúa con la proteína SKP1.

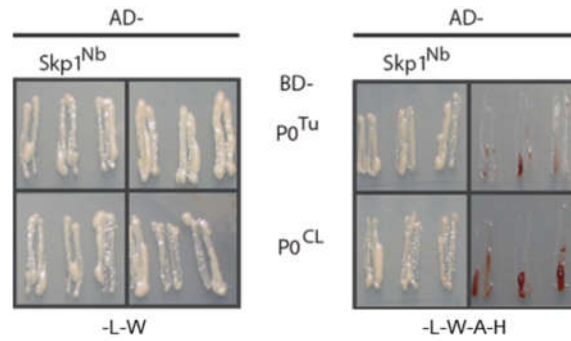


Figura 58. Evaluación de la interacción de la proteína P0^{CLRDV} con la proteína SKP1 de *N. benthamiana*. Se cotransformaron levaduras con los vectores pGBK-P0^{CLRDV} o pGBK-P0^{Tu} combinados con pGAD-Skp1 o pGAD. P0^{Tu} es un control positivo de la interacción. El medio sin leucina y triptófano (-L-W) permite la selección de las cotransformantes y la ausencia de adenina e histidina permite la selección de levaduras donde ocurre la interacción entre las proteínas analizadas (-L-W-A-H). Se muestra la evaluación realizada a 21 °C.

Con el objetivo de dilucidar si el mecanismo de acción se encuentra conservado en el hospedante natural del virus, evaluamos la interacción de la proteína P0^{CLRDV} con el ortólogo de ASK1 en *G. hirsutum*, la proteína GSK1 (Figura 59). La interacción se evaluó con las proteínas P0^{CLRDV} y GSK1 expresadas en ambos vectores, probando las dos combinaciones posibles. En las dos combinaciones (Figura 59, A y B) se detectó crecimiento de las levaduras en la cuádruple selección y de esta manera se comprobó que la proteína P0^{CLRDV} interactúa con GSK1.

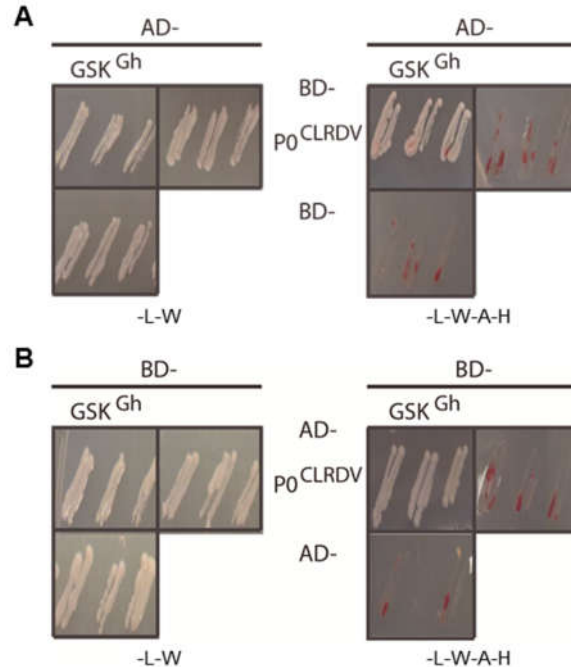


Figura 59. Evaluación de la interacción de la proteína P0^{CLRDV} con la proteína GSK1 de *G. hirsutum*. A) Se cotransformaron levaduras con los vectores pGBK-P0^{CLRDV} o pGBK combinados con pGAD-Gsk1 o pGAD. B) Se cotransformaron levaduras con los vectores pGAD-P0^{CLRDV} o pGAD combinados con pGBK-Gsk1 o pGBK. El medio sin leucina y triptófano (-L-W) permite la selección de las cotransformantes y la ausencia de adenina e histidina permite la selección de levaduras donde ocurre la interacción entre las proteínas analizadas (-L-W-A-H). Se muestra la evaluación realizada a 21 °C.

Los resultados indican que la interacción de la proteína PO^{CLRDV} con el componente GSK1 del complejo SCF ubiquitina ligasa estaría conservado en *G. hirsutum* y en un hospedante no natural como *N. benthamiana*.

4.3.11. Construcción de vectores para la expresión de PO^{CLRDV} con tag de c-Myc y HA.

Para continuar con el estudio del mecanismo de acción de la proteína PO del CLRDV, y teniendo en cuenta que no hay disponibles anticuerpos específicos contra la proteína PO^{CLRDV}, fue necesario generar construcciones que permitan la expresión de PO^{CLRDV} fusionada a los tags de c-MYC y HA para corroborar la expresión de la proteína PO mediante inmunodetección con anticuerpos específicos contra los tags.

Para ello, se amplificó la secuencia del ORF0 que codifica para la proteína PO mediante RT-PCR a partir de cDNA del CLRDV con *primers* específicos que contienen el codón de inicio de la traducción, pero sin el codón de terminación para la fusión carboxilo terminal, y en el caso contrario de la fusión amino terminal se amplificó el ORF0 sin el codón de inicio de la traducción, pero conteniendo el codón de terminación. A su vez, los *primers* se diseñaron con los sitios *aatB* necesarios para el clonado en el vector de entrada pDNOR del sistema *Gateway* donde se clonaron las distintas versiones del ORF0 y se secuenciaron para verificar su integridad. Luego, los ORFs se subclonaron en los vectores de destino pGWB614 (3xHA, amino terminal), pGWB615 (3xHA, amino terminal), pGWB617 (4xMyc, carboxilo terminal) y pGWB618 (4xMyc, amino terminal) para obtener los clones p614-PO^{CLRDV}HA, p615-HAPO^{CLRDV}, p617-PO^{CLRDV}myc y p618-mycPO^{CLRDV} (Figura 60) donde cada uno de los ORFs se encuentra bajo el control del promotor 35S del CaMV y sobre el final de la secuencia se encuentra el terminador de la transcripción Tnos (terminador de la Nopalina sintetasa) (Nakamura y col., 2010). Con dichas construcciones se transformaron células competentes de *A. tumefaciens* cepa GV3105 por electroporación.

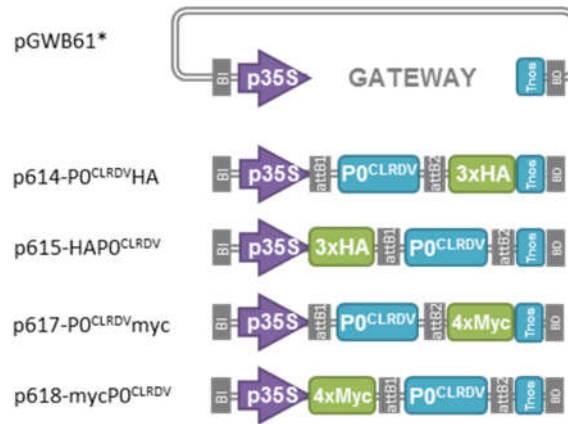


Figura 60. Esquema de los vectores plasmídicos construidos. La serie de vectores pGWB61* son vectores de destino con el sistema *Gateway* utilizados para la expresión de proteínas en plantas. Según la nomenclatura dispuesta por los creadores (Nakamura y col., 2010), el número final de la serie indica el *tag* y la posición en la que queda fusionado a la proteína. Todas las construcciones se encuentran bajo el control del promotor constitutivo p35S del CaMV y poseen como terminador de la transcripción el Tnos. BI y BD: bordes izquierdo y derecho del T-DNA del plásmido Ti de agrobacterias. Todos los vectores binarios fueron introducidos en *A. tumefaciens* cepa GV3101.

4.3.12. Evaluación de la funcionalidad de la proteína P0^{CLRDV} fusionada a los *tags* c-Myc y HA en posición amino y carboxilo terminal

Una vez obtenidas las construcciones, se evaluó la funcionalidad de la proteína P0^{CLRDV} fusionada a c-Myc o HA en el amino o en el carboxilo terminal. Al igual que los ensayos descritos en la Sección 4.3.4., se coagroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* línea 16c con *A. tumefaciens* conteniendo la construcción pBin-GFP combinada con pBin61 (Figura 61, panel a) o las construcciones a evaluar p617-P0^{CLRDV}myc, p618-mycP0^{CLRDV}, p615-HAPO^{CLRDV}, p614-P0^{CLRDV}HA (Figura 61 paneles c, d, f y e respectivamente) o el control pBin-P0^{CLRDV} (Figura 61, panel b).

Se observó que la proteína P0^{CLRDV} conserva la actividad supresora cuando se encuentra fusionada al *tag* de c-Myc (Figura 61, paneles c y d). Sin embargo, se observó que la actividad supresora de P0^{CLRDV} con c-Myc en el carboxilo terminal (Figura 61, panel d) es similar en intensidad a la observada con la proteína P0^{CLRDV} sin *tag* (Figura 61, panel b) y cuando c-Myc se encuentra en el amino terminal la actividad supresora disminuye (Figura 61, panel c).

Las diferencias observadas en los parches inoculados se encontraron también en los análisis moleculares (Figura 62) donde la construcción P0^{CLRDV}-myc presenta mayor cantidad de mRNA de GFP (Figura 62C, calle 6) y menor producción de siRNA específicos contra el transgen GFP (Figura 62D, calle 6).

***N. benthamiana* 16c infiltradas con GFP más:**

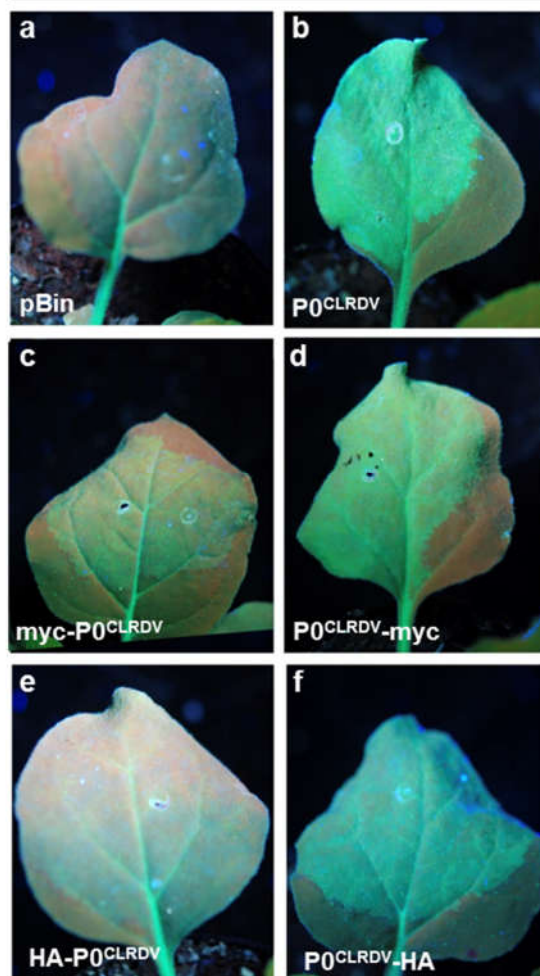


Figura 61. Ensayo de silenciamiento en plantas de *N. benthamiana* línea 16c. A) Hojas de *N. benthamiana* línea 16c agroinfiltradas con una mezcla de agrobacteria conteniendo las construcciones pBin-GFP junto con el vector pBin61 vacío (panel a), pBin-P0^{CLR DV} (panel b), p618-mycP0^{CLR DV} (panel c), p617-P0^{CLR DV}myc (panel d), p615-HAP0^{CLR DV} (panel e) o p614-P0^{CLR DV}HA (panel f). Las fotos fueron tomadas con luz UV 5 días post infección.

En las fusiones con el *tag* HA la diferencia entre ambas posiciones de fusión es mayor (Figura 61, paneles e y f) siendo menor la actividad supresora con el *tag* en posición carboxilo respecto de la proteína sin fusión y casi nula la actividad supresora en HA-P0^{CLR DV}. Luego del análisis de los resultados se seleccionó la construcción que produce la proteína P0 con el *tag* c-myc en posición carboxilo terminal (P0^{CLR DV}-myc).

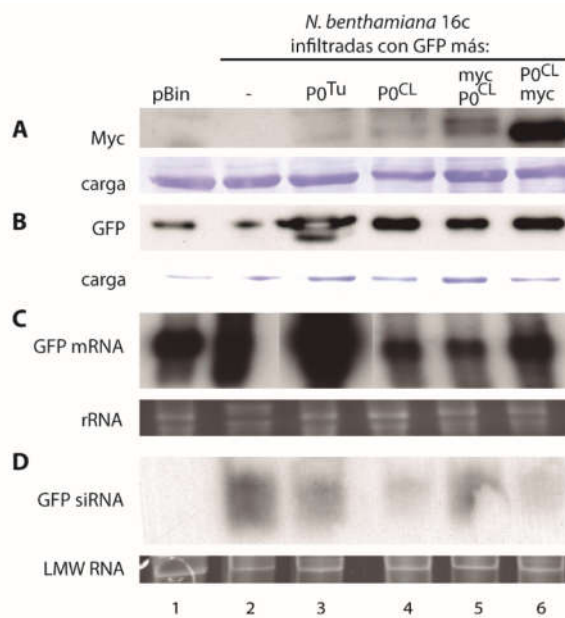


Figura 62. Análisis molecular del ensayo de silenciamiento en plantas de *N. benthamiana* línea 16c. **A)** Análisis de proteínas totales extraídas a partir de los parches de hojas de *N. benthamiana* 16c infiltradas con agrobacterias conteniendo las construcciones pBin61 (calle1), pBin-GFP más: pBin61 (calle 2), pBin-PO^{Tu} (calle 3), pBin-PO^{CLRDV} (calle 4), p618-mycPO^{CLRDV} (calle 5) o p617-PO^{CLRDV}myc (calle6). Las muestras fueron corridas en un gel de poliacrilamida 12%, transferidas a membrana de nitrocelulosa y analizadas con un anticuerpo anti-myc mediante *Western blot*. La proteína Rubisco teñida con Coomasie blue fue utilizada como control de carga. **B)** Se analizaron las muestras descritas en **(A)** con una anticuerpo anti-GFP mediante *Western blot*. La proteína Rubisco teñida con Coomasie blue fue utilizada como control de carga. **C)** Análisis del mRNA de GFP en las muestras descritas en **(A)** por *Northern blot*. El RNA total (10 µg) se hibridó con una sonda de DNA marcada con [α -³²P] dCTP específica para GFP. Los rRNAs teñidos con bromuro de etidio se utilizaron como control de carga. **D)** RNA total (10 µg) extraído se fraccionó en un gel de poliacrilamida 17,5% y se hibridó con una sonda de DNA específica para GFP marcada con [α -³²P] dCTP. El RNA de bajo peso molecular (LMW) fue utilizado como control de carga.

4.3.13. Estudio de la desestabilización de la proteína ARGONAUTA 1 mediada por la proteína PO^{CLRDV}

Recientemente se ha postulado que el efecto supresor de las proteínas PO de los polerovirus está relacionado con la desestabilización de la proteína efectora de la vía del silenciamiento del RNA ARGONAUTA 1 (AGO1) (Baumberger y col., 2007, Fusaro y col., 2012, Bortolamiol y col., 2007). Utilizando el ensayo de agroinfiltración desarrollado por Baumberger y col., (2007) se analizó el efecto de la proteína PO^{CLRDV} sobre la estabilidad de la proteína AGO1. Para ello se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con agrobacterias que contienen las construcciones que codifican para la proteína AGO1 de *A. thaliana* fusionada en el extremo amino terminal a GFP (eGFP-AGO1) o fusionada al tag FLAG (FLAG-AGO1), la proteína P19 (pBin-P19) y las proteínas PO^{CLRDV}, PO^{CLRDV}myc o PO^{TuYV}myc (pBin-PO^{CLRDV}, p617-PO^{CLRDV}myc o p617-PO^{TuYV}myc) (Figura 63). El supresor del silenciamiento P19 del tomato bushy stunt virus (TBSV, *Tombusvirus*) se utiliza para evitar el silenciamiento *sense* de los transcritos de AGO1 y asegurar su expresión. Se ensayaron dos construcciones de AGO1 para descartar la posibilidad de que el tamaño de la fusión

interfiera con el resultado. En la primera AGO1 forma una proteína de fusión con GFP (GFP-AGO1) y en la segunda AGO1 se encuentra unida a un *tag* FLAG (FLAG-AGO1) (Figura 63, A y B).

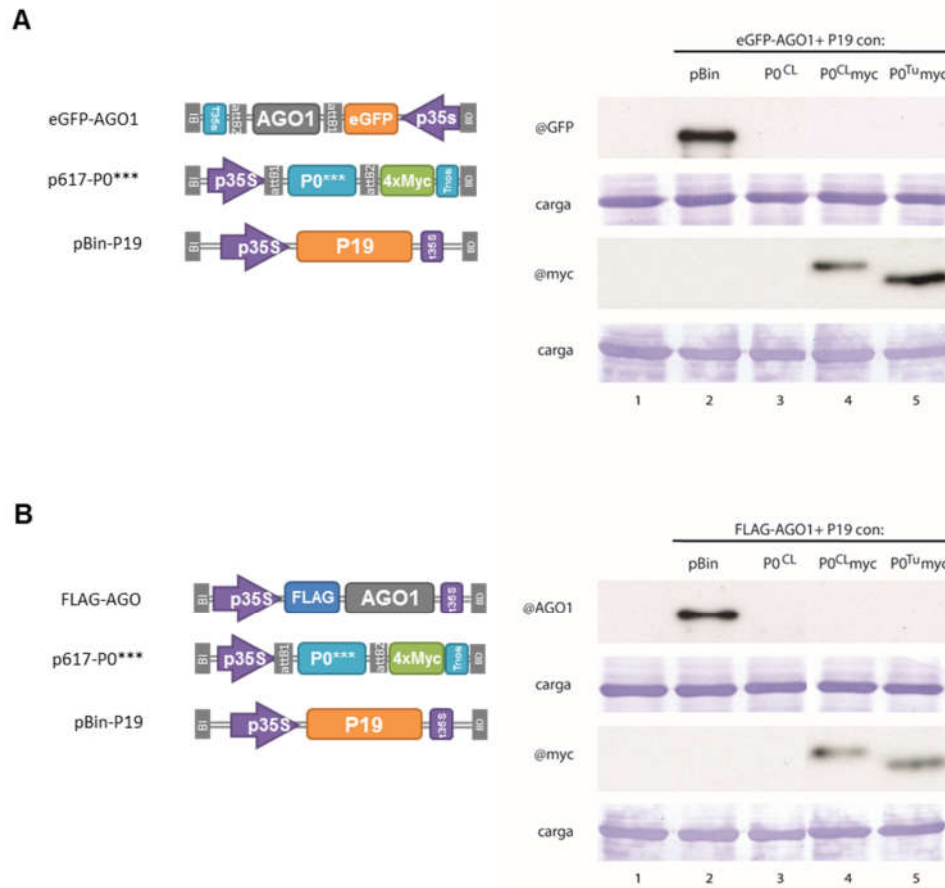


Figura 63. Evaluación de la desestabilización de AGO1 en presencia de P0^{CLRDV}. Se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con una mezcla de *A. tumefaciens* conteniendo las construcciones (esquematisadas a la izquierda de la figura) **A**) AGO1-eGFP o **B**) FLAG-AGO1 y pBin-p19 combinadas con pBin61 (calle 2), pBin61-P0^{CLRDV} (calle 3), p617-P0^{CL} (calle 4) o p617-P0^{TU}-myc (calle 5). A los tres días post infiltración se tomaron muestras de la hoja agroinfiltrada, se extrajeron proteínas totales y se evaluó la presencia de las proteínas AGO1 y P0 mediante SDS-PAGE (8 y 12% respectivamente) y posterior *Western blot* con un anticuerpo **A**) policlonal anti-GFP y **B**) policlonal anti-AGO1. Tanto en **(A)** como en **(B)** con un anticuerpo anti-Myc se detectó la proteína P0. Se muestra el control de carga de la proteína Rubisco teñida con *Coomassie blue*.

Se tomaron muestras de las hojas inoculadas a los tres días post inoculación y se realizó la extracción de proteínas totales para analizar los niveles de expresión de la proteína P0 y de la proteína AGO1. Se confirmó la expresión de los supresores del silenciamiento mediante anticuerpos específicos contra el *tag* de c-Myc mediante *Western Blot* (Figura 63). Para evaluar el efecto de los supresores del silenciamiento sobre la estabilidad de AGO1 se detectó su expresión mediante *Western Blot* utilizando anticuerpos específicos contra GFP o AGO (Figura 63A y B respectivamente).

En el control agroinfiltrado con eGFP-AGO1 (o FLAG-AGO1) y pBin-p19 combinados con el vector pBin61 vacío se observó la expresión de la proteína AGO1 (Figura 63 A y B, calle 2). En las plantas infiltradas con los supresores PO^{CLRDV} y $PO^{CLRDV}myc$ (Figura 63 A y B, calles 3 y 4) se observó una disminución de la proteína AGO1, al igual que en las infiltradas con la proteína PO^{TuVY} , con respecto a las plantas inoculadas con el vector vacío pBin61. Estos resultados indican que la proteína PO^{CLRDV} produce la desestabilización de AGO1 y confirman que el mecanismo de acción de PO^{CLRDV} es conservado respecto de otras proteínas PO caracterizadas previamente (PO^{Tu} , Figura 63 A y B, calle 5).

Los resultados descriptos permiten inferir que PO^{CLRDV} es supresor del silenciamiento y su mecanismo de acción se explicaría a través de su interacción con las proteínas GSK1 o SKP1 que forman parte del complejo SCF ubiquitina ligasa y por medio de las cuales induce la degradación de la proteína AGO1, un componente clave de la vía del silenciamiento del RNA.

4.3.14. Estudio de la localización subcelular de la proteína PO^{CLRDV}

Con el objetivo de estudiar la localización subcelular de la proteína PO^{CLRDV} en células vegetales se desarrollaron construcciones génicas que permiten la expresión de la proteína PO^{CLRDV} fusionada a la proteína eGFP (*enhanced GFP*). Para ello se utilizaron los vectores de destino con el sistema *Gateway* desarrollados por Karimi y col. (2002). Las mismas construcciones obtenidos en el vector pDONR, descritas en la Sección 4.3.11., se subclonaron en los vectores pB7WGF2 y pB7FWG2.

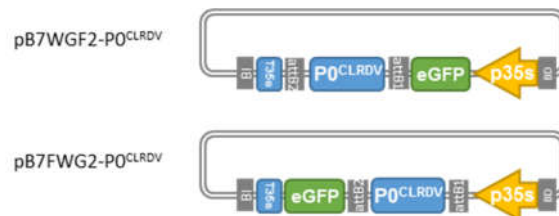


Figura 64. Esquema de los vectores plasmídicos construidos. Los vectores pB7WGF2 y pB7FWG2 son vectores de destino con el sistema *Gateway* utilizados para la expresión de proteínas en plantas. Todas las construcciones se encuentran bajo el control del promotor constitutivo p35S del CaMV y poseen como terminador de la transcripción T35s. pB7WGF2 permite la fusión de eGFP al extremo amino de la proteína de interés, mientras que pB7FWG2 al extremo carboxilo. BI y BD: bordes izquierdo y derecho del T-DNA del plásmido Ti de agrobacterias. Todos los vectores binarios fueron introducidos en la cepa GV3101 de *A. tumefaciens*.

Se evaluó la funcionalidad de la proteína PO^{CLRDV} con las fusiones en posición amino y carboxilo terminal de la proteína eGFP en ensayos de coagroinfiltración en *N. benthamiana* línea 16c similares a los descriptos en la Sección 4.3.4. Si bien la proteína PO es funcional con ambas fusiones, la fusión de eGFP en el carboxilo terminal de la proteína ($PO^{CLRDV}eGFP$) presenta menor

interferencia con la actividad supresora de la proteína P0 (Figura 65A, panel d). En el análisis molecular los niveles de proteína P0 fusionada y del transgen de GFP son mayores en las hojas agroinfiltradas con la proteína P0^{CLRDV}eGFP respecto de aquellas agroinfiltradas con eGFP-P0^{CLRDV} (Figura 65B, calle 2).

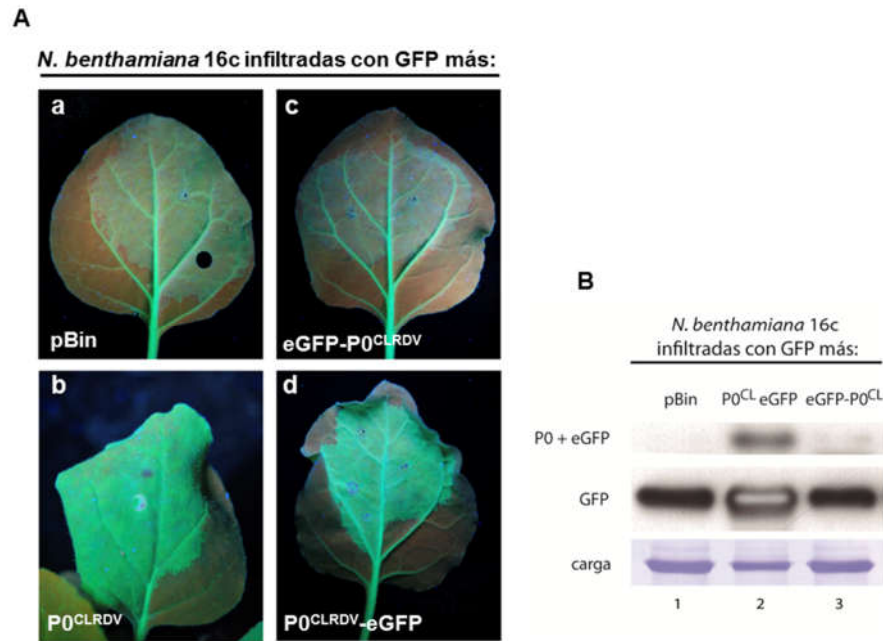


Figura 65. Ensayo de silenciamiento en plantas de *N. benthamiana* línea 16c y su análisis molecular. A) Hojas de *N. benthamiana* línea 16c agroinfiltradas con pBin-GFP junto con pBin vacío (panel a) o pBin-P0^{CLRDV} (panel b) o pB7WGF2-P0^{CLRDV} (panel c) o pB7FWG2-P0^{CLRDV} (panel d). **B)** A los 5 días post infiltración se tomaron muestras de las hojas infiltradas, se extrajeron proteínas totales y se analizó mediante SDS-PAGE (12%) y posterior *Western blot* la presencia de la proteína GFP mediante un anticuerpo policlonal anti-GFP, capaz de reconocer GFP y eGFP. Se identificaron las proteínas de fusión P0-eGFP y eGFP-P0 y la proteína GFP. Se muestra el control de carga de la proteína Rubisco sobre la membrana coloreada con *Coomassie blue*.

La fusión de eGFP en el carboxilo terminar de la proteína P0^{CLRDV} no interfiere con su actividad supresora del silenciamiento, es por ello que se seleccionó la construcción pB7FWG2-P0^{CLRDV} para analizar la localización subcelular de la proteína. Para ello se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* y 24 horas postinfiltración se observaron las mismas mediante microscopia confocal. Como se observa en la Figura 66 la proteína P0 del CLRDV se localiza en el citoplasma y núcleo de las células del mesófilo analizadas, con excepción del nucléolo (Figura 66, paneles C y E).

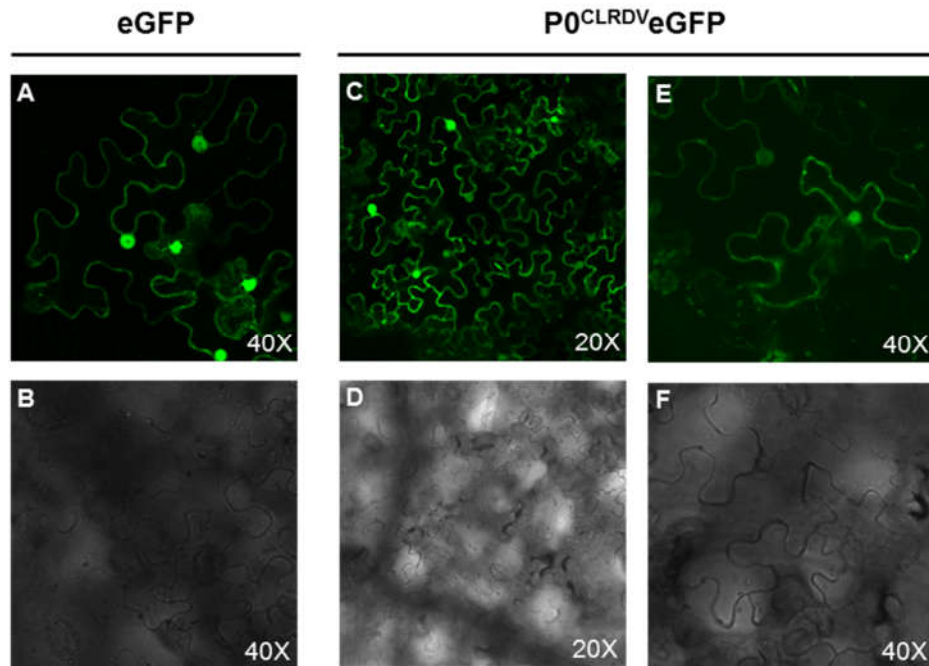


Figura 66. Análisis con microscopía confocal de la localización subcelular de la proteína $P0^{CLR DV}$ en células epidérmicas de *N. benthamiana*. **A)** Se muestra la localización de la proteína eGFP sin función. **(C) y (E)** se muestra la localización subcelular de $P0^{CLR DV}$ eGFP capturada a 20X y 40X de amplificación respectivamente. **(B), (D) y (F)** son las imágenes en campo claro de las fotos **A, C y E** respectivamente.

4.3.15. Caracterización del dominio F-Box de la proteína P0 del CLR DV.

El dominio F-Box (**LPXXL/IX₍₁₀₋₁₃₎P**) está presente en la proteína P0 del CLR DV y de otros virus del género *Polerovirus* (Figura 55). Según estudios realizados en otros virus de la familia *Luteoviridae* este dominio sería el responsable de la actividad supresora del silenciamiento de la proteína P0 (Pazhouhandeh y col., 2006, Fusaro y col., 2012, Han y col., 2010). Con el objetivo de analizar si la actividad supresora del silenciamiento de la proteína P0 del CLR DV está dada por la conservación del dominio F-Box se realizaron mutantes en distintas posiciones del dominio (Figura 67). Las posiciones para mutar se eligieron en función de los aminoácidos más conservados del dominio (Leucina 68, Prolina 69 y Prolina 83). En el mutante $P0^{mut2}$ se modificaron los aminoácidos Leucina 68, Prolina 69 y Prolina 83, sustituyéndolos por Alaninas (Figura 67). Buscando determinar la importancia del motivo LP en $P0^{CLR DV}$, se desarrolló el mutante $P0^{mut3}$ con los residuos Leucina 68, Prolina 69 sustituidos por Alaninas (Figura 67).

A su vez, se incorporó en el análisis de mutantes la proteína P0 del CLR DV-at. Este virus constituye una cepa del CLR DV recientemente caracterizada (Agrofoglio y col., 2017) que se manifiesta con sintomatología atípica en germoplasma de algodón resistente y susceptible a la infección por CLR DV. La proteína $P0^{CLR DV-at}$ posee un 88% de identidad con la proteína $P0^{CLR DV}$ y su actividad supresora del silenciamiento es más débil (Agrofoglio, Tesis doctoral, 2017). La

proteína $P0^{CLRDV-at}$ presenta varios cambios en la secuencia de aminoácidos con respecto a la proteína $P0^{CLRDV}$. Uno de los cambios se encuentra en una de las posiciones conservadas del dominio F-Box (**LPXXL/IX₍₁₀₎P**), donde el aminoácido de la posición 72 Isoleucina (I) presente en $CLRDV$ (**LPFI₍₁₀₎P**) cambia por el aminoácido Valina (V) en el $CLRDV-at$ (**LPFLV₍₁₀₎P**) (Figura 67 y Anexo II: alineamiento entre $P0^{CLRDV}$ y $P0^{CLRDV-at}$). Con el fin de caracterizar si la actividad supresora más débil del $P0^{CLRDV-at}$ está dada por la mutación en el dominio F-Box se realizó el mutante de $P0^{CLRDV-at}$, donde se sustituyó el residuo Valina 72 por Isoleucina obteniéndose la mutante $P0^{mut4}$ (donde el dominio F-Box del $P0^{CLRDV-at}$ es igual al de la proteína $P0^{CLRDV}$). También en la proteína $P0^{CLRDV}$ se mutó la Isoleucina 72 por Valina obteniéndose la mutante $P0^{mut1}$ (donde el dominio F-Box del $P0^{CLRDV}$ es igual al de la proteína $P0^{CLRDV-at}$).



Figura 67. Alineamiento del dominio F-Box de las proteínas $P0^{CLRDV}$, $P0^{CLRDV-at}$ y los mutantes. Los mutantes $P0^{mut1}$, $P0^{mut2}$ y $P0^{mut3}$ se realizaron sobre la proteína $P0^{CLRDV}$ y el mutante $P0^{mut4}$ se realizó sobre la proteína $P0^{CLRDVat}$. $P0^{mut1}$ y $P0^{mut4}$ poseen un cambio de aminoácido en la posición 72, $P0^{mut1}$ (I→V) mientras que el $P0^{mut4}$ posee el cambio inverso (V→I). El $P0^{mut2}$ posee tres cambios de aminoácidos, las posiciones L68, P69 y P83 fueron cambiadas por Alanina. $P0^{mut3}$ posee dos cambios de aminoácido, las posiciones L68 y P69 fueron cambiadas por Alanina.

Para la obtención de los mutantes se utilizó la técnica *overlap extention* PCR. Esta técnica permite mutar de manera específica mediante la extensión de segmentos génicos solapados por PCR. En un paso inicial de PCR se producen dos productos de amplificación solapados donde ambos poseen el cambio de secuencia que involucra la mutación deseada. A continuación, esos productos de PCR son utilizados en una mezcla 1:1 como templado para un nuevo paso de PCR (Materiales y Métodos, Sección 3.20.).

Una vez obtenidos los ORFs de las cuatro proteínas $P0$ mutantes se realizó el clonado de los mismos en el vector pGEMT-e, se secuenciaron para verificar la integridad de las secuencias y se subclonaron en vectores de expresión en levaduras para ensayos de doble híbrido (Figura 68). Con ellas, se analizó la interacción de las versiones mutadas de $P0^{CLRDV}$ y $P0^{CLRDV-at}$ con las proteínas del complejo SCF ubiquitina ligasa SKP1 y GSK1, ortólogos de ASK1 en *N. benthamiana* y en *G. hirsutum* respectivamente (Sección 4.3.10.).

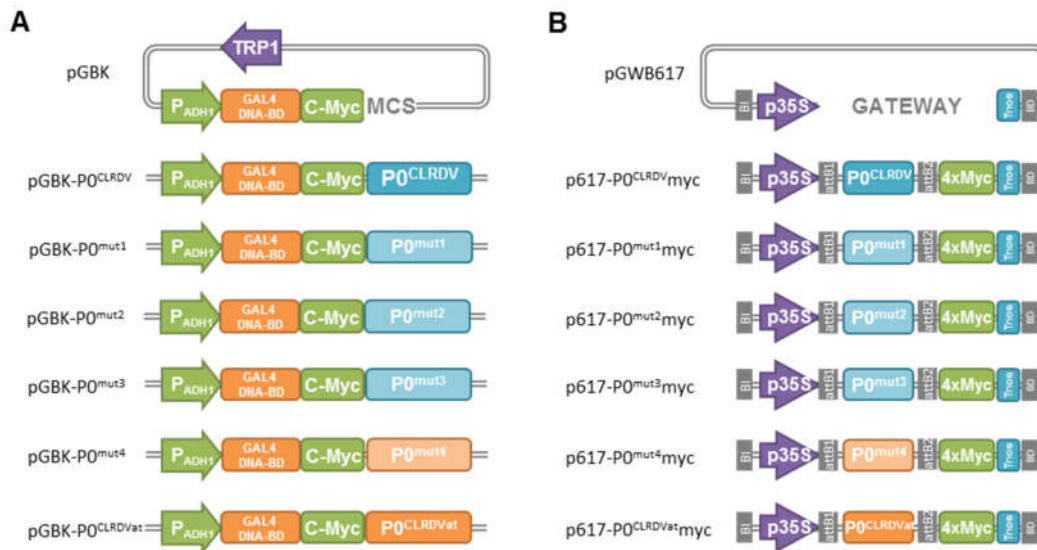


Figura 68. Esquema de los vectores plasmídicos construidos para ensayos de interacción doble híbrido en levaduras y ensayos de supresión del silenciamiento. **A)** Para los ensayos de doble híbrido las proteínas fueron subclonadas en el vector pGBK descrito en la figura 56, obteniéndose las construcciones pGBK-P0^{CLR DV}, pGBK-P0^{mut1}, pGBK-P0^{mut2}, pGBK-P0^{mut3}, pGBK-P0^{mut4} y pGBK-P0^{CLR DV^{at}}. **B)** Para los ensayos de supresión del silenciamiento las proteínas fueron subclonadas por recombinación en el vector pGWB617 descrito en la figura 60, obteniéndose las construcciones p617-P0^{CLR DV}^{myc}, p617-P0^{mut1}^{myc}, p617-P0^{mut2}^{myc}, p617-P0^{mut3}^{myc}, p617-P0^{mut4}^{myc}, p617-P0^{CLR DV^{at}}^{myc}.

A su vez cada uno de los cuatro mutantes fue amplificado por PCR (Tabla 7) y clonado en el vector de entrada pDNOR del sistema *Gateway* para su posterior subclonado en el vector pGWB617 (4xMyc en posición carboxilo terminal) para la expresión transitoria en plantas (Figura 61). La elección del vector de destino se realizó de acuerdo a los resultados de la Sección 4.3.12. Se obtuvieron las construcciones p617-P0^{mut1}, p617-P0^{mut2}, p617-P0^{mut3}, p617-P0^{mut4} y p617-P0^{CLR DV^{at}} con las que se transformaron células competentes de *A. tumefaciens* cepa GV3105 por electroporación. A continuación, se realizaron ensayos de supresión de silenciamiento en *N. benthamiana* línea 16c (Sección 4.3.16.). Por último, se evaluó la desestabilización de la proteína AGO1 en presencia de los cuatro mutantes mediante ensayos en *N. benthamiana* (Sección 4.3.18.).

4.3.16. Análisis de la actividad supresora del silenciamiento de los mutantes en el dominio F-Box de las proteínas P0^{CLR DV} y P0^{CLR DV^{at}} en el sistema de *N. benthamiana* línea 16c

Con el objetivo de evaluar la actividad supresora de los mutantes de las proteínas P0 en el dominio F-Box se realizaron ensayos en *N. benthamiana* línea 16c (Figura 69). Las plantas fueron infiltradas con agrobacterias conteniendo la construcción pBin-GFP combinada con p617-P0^{mut1}^{myc}, p617-P0^{mut2}^{myc}, p617-P0^{mut3}^{myc}, p617-P0^{mut4}^{myc} o los controles p617-P0^{CLR DV}^{myc} o p617-P0^{CLR DV^{at}}^{myc}.

***N. benthamiana* 16c infiltradas con GFP más:**

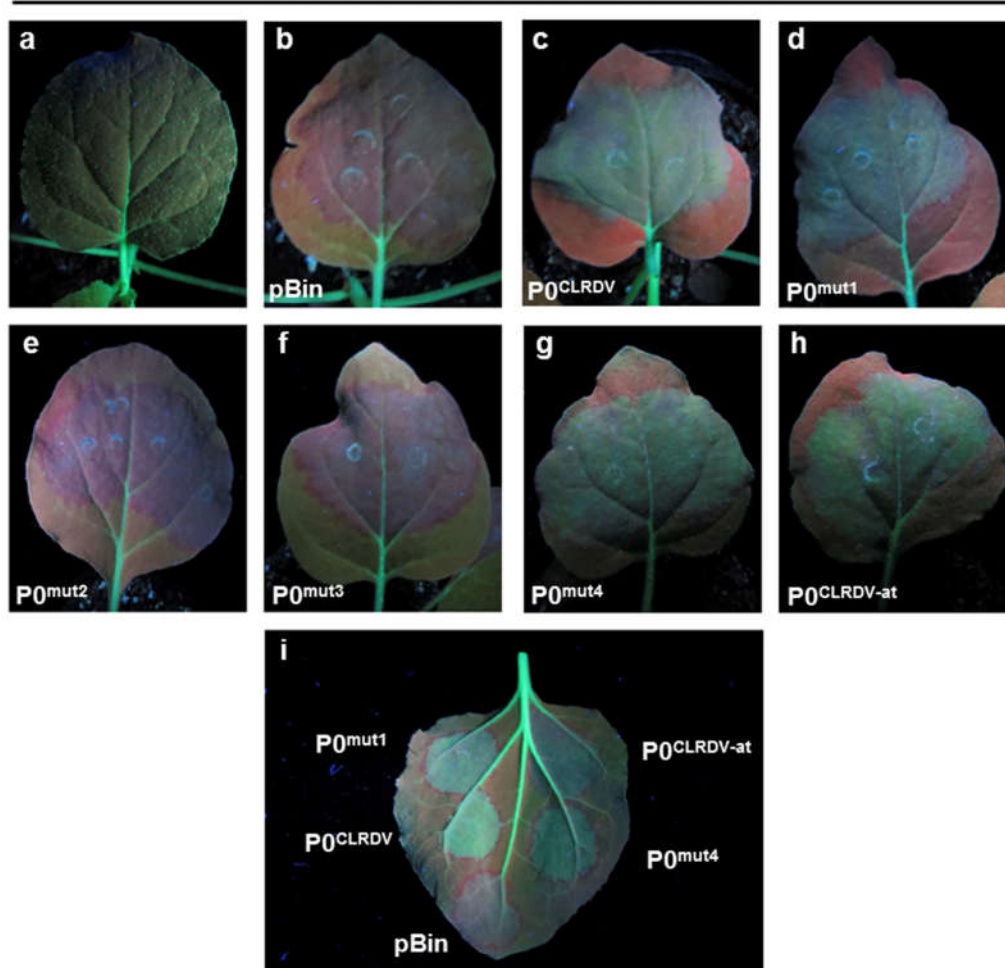


Figura 69. Ensayo de silenciamiento en plantas de *N. benthamiana* línea 16c. Hojas de *N. benthamiana* línea 16c agroinfiltradas con una mezcla de agrobacterias conteniendo pBin-GFP junto con el vector pBin61 vacío (panel b, i), p617-P0^{CLRDV}myc (panel c, i), p617-P0^{mut1}myc (panel d, i), p617-P0^{mut2}myc (panel e), p617-P0^{mut3}myc (panel f), p617-P0^{mut4}myc (panel g, i) o p617-P0^{CLRDV^{at}}myc (panel h, i). Las fotos fueron tomadas con luz UV 5 días post infección.

En los parches de inoculación donde se expresan las proteínas mutantes P0^{mut2} y P0^{mut3} la expresión de GFP se encuentra silenciada (Figura 69, paneles e y f). En los análisis moleculares se observa una disminución en los mRNA de GFP y en los niveles de expresión de la proteína en ambos mutantes respecto del P0^{CLRDV} (Figura 70A y C, calles 3, 5 y 6). A su vez, se manifiesta un aumento en la producción de siRNA específicos contra GFP respecto del P0^{CLRDV} (Figura 70B, calles 3, 5 y 6). La expresión de ambas proteínas P0^{mut2} y P0^{mut3} es menor respecto de los P0 salvajes y aquellos mutantes con actividad supresora (Figura 70D) señalando que, al perder la actividad supresora, los mRNA de dichas proteínas sufren silenciamiento *sense*.

Estos resultados indican que las mutaciones en el dominio F-Box presente en los mutantes P0^{mut2} y P0^{mut3} anulan la actividad supresora de la proteína P0^{CLRDV} demostrando que el dominio F-box

es fundamental para la funcionalidad de la proteína PO^{CLRDV} como supresor del silenciamiento. Como se indica en la Figura 67, los cambios de aminoácidos introducidos en PO^{mut3} (L68→A y P69→A) están incluidas en el PO^{mut2} (L68→A, P69→A y P83→A), teniendo en cuenta que ambos mutantes se comportaron de manera equivalente (Figura 70, calles 5 y 6), se puede inferir que las posiciones L68 y P69 son indispensables para la actividad supresora PO^{CLRDV} .

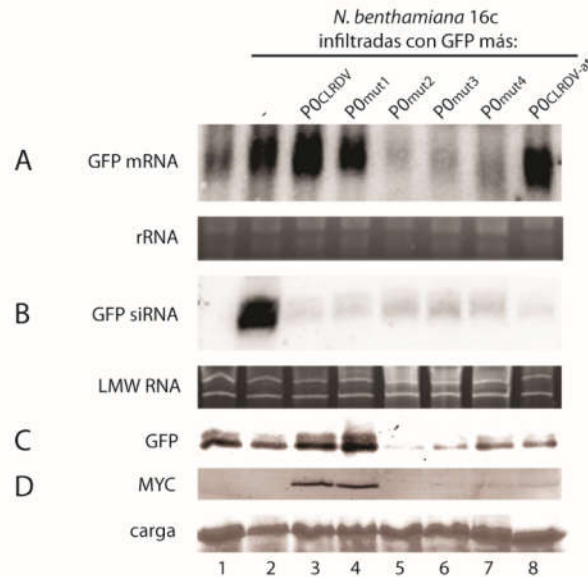


Figura 70. Análisis molecular del ensayo de silenciamiento en plantas de *N. benthamiana* línea 16c. **A)** Análisis del mRNA de GFP en los parches infiltrados con agrobacterias conteniendo las construcciones pBin-GFP y pBin vacío (calle 2), pBin-GFP más: p617- PO^{CLRDV} myc (calle 3), p617- PO^{mut1} myc (calle 4), p617- PO^{mut2} myc (calle 5), p617- PO^{mut3} myc (calle 6), p617- PO^{mut4} myc (calle 7) o p617- $PO^{CLRDV-at}$ myc (calle 8) por *Northern blot*. Los RNAs se hibridaron con una sonda de DNA marcada con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP específica para GFP. Los rRNAs teñidos con bromuro de etidio se utilizaron como controles de carga. **B)** RNA total (10 μg) extraído a partir de las muestras descritas en **(A)** se fraccionó en un gel de poliacrilamida 17,5% y se hibridó con una sonda de DNA específica para GFP marcada con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP. El RNA de bajo peso molecular (LMW) fue utilizado como control de carga. **C)** Proteínas totales extraídas a partir de las muestras descritas en **(A)** fueron corridas en un gel de poliacrilamida 12%, transferidas a membrana de nitrocelulosa y analizadas con un anticuerpo anti-GFP y **D)** anti-MYC mediante *Western blot*. La proteína Rubisco teñida con rojo Ponceau fue utilizada como control de carga.

Al igual que las proteínas PO^{CLRDV} y $PO^{CLRDV-at}$, los mutantes PO^{mut1} y PO^{mut4} conservaron la actividad supresora del silenciamiento (Figura 69, paneles d y g). La proteína PO^{mut1} (consenso F-Box $^{CLRDV-at}$ en PO^{CLRDV}) disminuyó su actividad respecto de PO^{CLRDV} , pero su actividad fue todavía más fuerte que la proteína $PO^{CLRDV-at}$. La proteína PO^{mut4} (consenso F-Box $^{CLRDV-at}$ en PO^{CLRDV}) aumentó su actividad respecto de $PO^{CLRDV-at}$ pero fue todavía menor que la proteína PO^{CLRDV} (Figura 69, panel i). A nivel molecular, los niveles de mRNA y proteína de GFP son comparables entre cada uno de ellos (Figura 70A y C, calles 3, 4, 7 y 8) y la producción de siRNA específicos contra GFP es menor respecto del control silenciado (Figura 70B, calles 2, 3, 4, 7 y 8). A partir de estos resultados se puede concluir que la diferencia de aminoácido en la posición 72 (V72 o I72) explicaría

parcialmente las diferencias de intensidad de supresión entre ambos supresores revelando que posiblemente haya otro u otros residuos involucrados en la actividad supresora.

4.3.17. Análisis de la interacción de los mutantes de las proteínas PO^{CLRDV} y PO^{CLRDV-at} en el dominio F-Box con las proteínas SKP1 de *N. benthamiana* y GSK1 de *G. hirsutum*

Con el objetivo de completar la caracterización funcional del dominio F-Box analizamos la capacidad de interacción de las mutantes de la proteína PO^{CLRDV} y PO^{CLRDV-at} con la proteína SKP1 de *N. benthamiana* y GSK1 de *G. hirsutum* mediante la técnica de doble híbrido en levaduras. La proteína PO^{CLRDV-at}, a pesar de tener una mutación en el dominio F-box mantiene la interacción con las proteínas SKP1 y GSK1 (Agrofoglio, Tesis doctoral, 2017). En los ensayos de interacción se utilizaron las construcciones de las mutantes PO^{mut1}, PO^{mut2}, PO^{mut3} y PO^{mut4} en el vector de doble híbrido pGBK (Figura 71).

Consistente con la observación en los ensayos de supresión en *N. benthamiana* línea 16c (Sección 4.3.16.), las proteínas PO^{mut2} y PO^{mut3}, que perdieron la actividad supresora de silenciamiento, no interactúan con las proteínas SKP1 y GSK1, mientras que las proteínas PO^{mut1} y PO^{mut4}, que conservan el dominio F-box de una proteína funcional y poseen actividad supresora de silenciamiento, sí interactúan con las proteínas SKP1 y GSK1 (Figura 71). La expresión de las cuatro proteínas fue confirmada por *Western blot* (la figura no se muestra). Los resultados indican que la conservación de los aminoácidos LP del dominio F-Box de la proteína PO^{CLRDV} es indispensable para que ocurra la interacción y para que la proteína PO conserve la actividad supresora de silenciamiento.

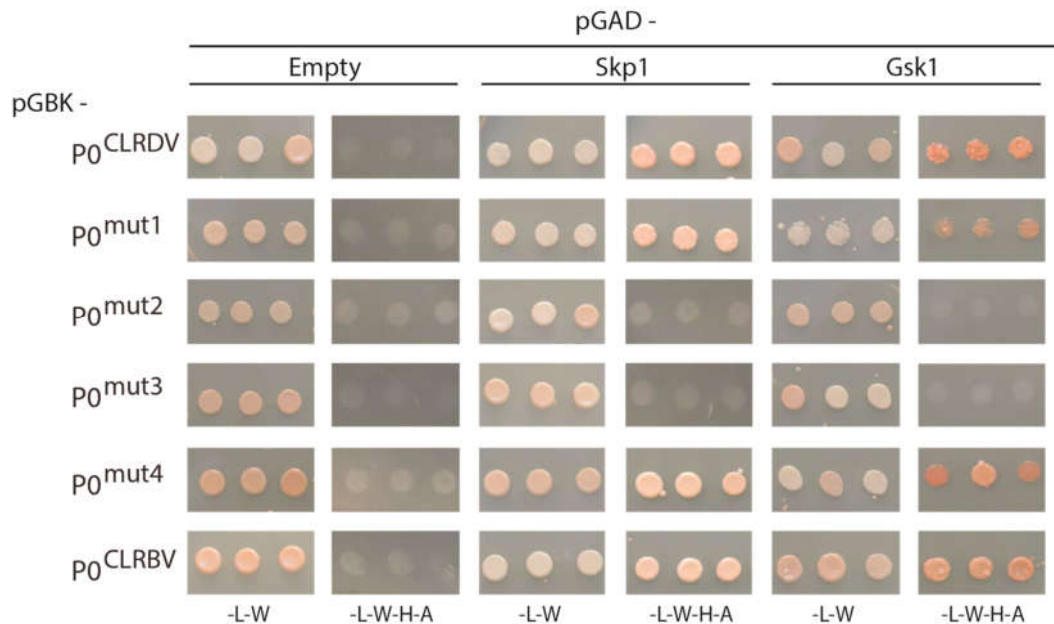


Figura 71. Evaluación de la interacción de los mutantes de la proteína PO en el dominio F-Box con las proteínas SKP1 y GSK1. Las proteínas P0^{CLR DV} y P0^{CLR DV-at} se utilizaron como controles positivos de la interacción. El medio sin leucina y triptófano (-L-W) permite la selección de las levaduras cotransformadas y la ausencia de adenina e histidina permite la selección de levaduras donde ocurre la interacción entre las proteínas analizadas (-L-W-A-H).

Si bien la diferencia de aminoácido en la posición 72 del dominio F-Box entre P0^{CLR DV} y P0^{CLR DV-at} (I y V, respectivamente) no interfiere con la interacción de ambas proteínas con SKP1 o GSK1, la diferencia en la intensidad de la actividad supresora podría explicarse por algún cambio en la fuerza en la interacción de cada proteína con SKP1 o GSK1. Para evaluar la fuerza de interacción entre dos proteínas se siembran diluciones de los cultivos de las levaduras cotransformadas para detectar diferencias en la tasa de crecimiento. La diferencia en la interacción entre el par de proteínas evaluadas se manifiesta con un cambio en la velocidad de crecimiento, siendo mayor cuando la interacción es más fuerte. Para evaluar la fuerza de interacción entre las proteínas P0^{CLR DV}, P0^{mut1}, P0^{mut4} y P0^{CLR DV-at} se prepararon diluciones seriadas (0,5; 0.5x10⁻¹; 0.5x10⁻²) de los cultivos de las levaduras cotransformadas con la proteína supresora y con las proteínas SKP1 o GSK1 (Figura 72).

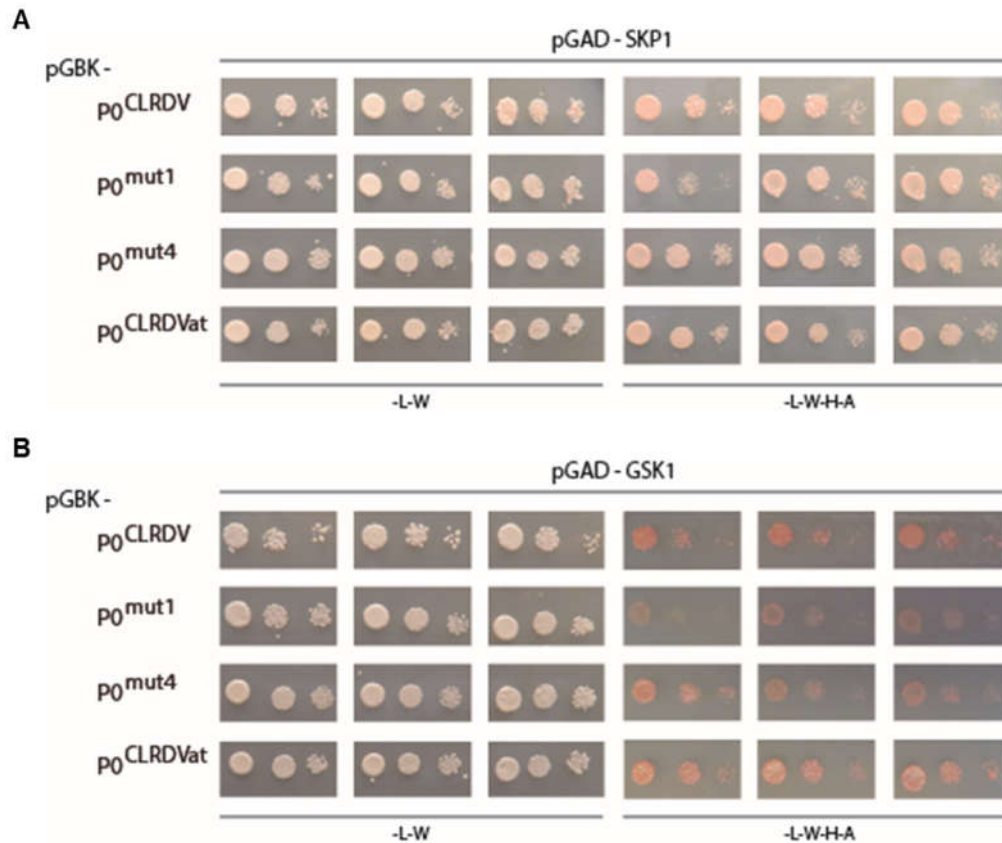


Figura 72. Evaluación de la intensidad de la interacción de las proteínas P0 mutantes en el dominio F-Box con las proteínas (A) SKP1 y (B) GSK1. En ambos paneles se muestran tres clones independientes para cada interacción, cada uno de ellos con tres diluciones (DO: 0,5; $0,5 \times 10^{-1}$ y $0,5 \times 10^{-2}$). El medio sin leucina y triptófano (-L-W) permite ver la viabilidad de las levaduras y la ausencia de adenina e histidina permite la selección de levaduras donde ocurre la interacción entre las proteínas analizadas (-L-W-A-H). Se muestra la interacción a 21 °C.

En la Figura 72 se muestra el crecimiento de tres colonias independientes de levaduras por cada una de las cotransformaciones. En primer lugar, se observa que las proteínas P0^{CLR DV} y P0^{CLR DV-at} interactúan con la misma intensidad con GSK1 y SKP1 (Figura 72A y B, respectivamente). A su vez, las proteínas mutantes P0^{mut1} y P0^{mut4} muestran la misma intensidad de interacción con GSK1 y SKP1, y similar a lo observado con las proteínas P0 de las cuales provienen. Teniendo en cuenta que cada una de las proteínas P0 del CLR DV y del CLR DV-at interactúa con SKP1 y GSK1 de la misma forma, entonces es esperable que los mutantes que llevan el cambio de aminoácido de uno o de otro se comporten de la misma manera que la proteína P0 de la cual proviene. Luego del análisis de los resultados podemos concluir que, al menos por este método, no se pudo detectar diferencias en la intensidad de interacción entre las proteínas estudiadas.

4.3.18. Evaluación *in planta* de la desestabilización de AGO1 mediada por los mutantes en el dominio F-Box de las proteínas P0^{CLRDV} y P0^{CLRDVat}

Con el objetivo de completar la caracterización de los mutantes de las proteínas P0 en el dominio F-Box, se evaluó la capacidad de cada uno de ellos de desestabilizar la proteína AGO1 (como se describe en la Sección 4.3.13.). Para ello se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con las construcciones que codifican para la proteína AGO1 de *A. thaliana* fusionada en el extremo amino terminal a GFP (eGFP-AGO1), el supresor del silenciamiento P19 (pBin-P19) y las proteínas P0^{CLRDV}, P0^{mut1}, P0^{mut2}, P0^{mut3}, P0^{mut4} o P0^{CLRDV-at} (p617-P0^{CLRDV}, p617-P0^{mut1}, p617-P0^{mut2}, p617-P0^{mut3}, p617-P0^{mut4} o p617-P0^{CLRDV-at}) (Figura 73).

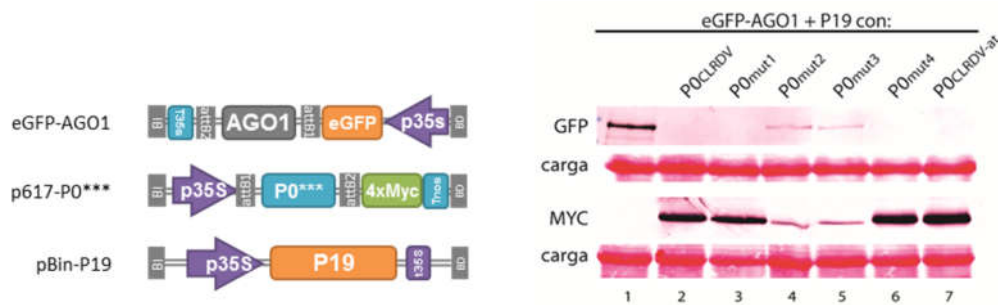


Figura 73. Evaluación de la desestabilización de AGO1 en presencia de las proteínas P0 mutadas en el dominio F-Box. Se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con una mezcla de *A. tumefaciens* conteniendo las construcciones (esquematizadas a la izquierda de la figura) AGO1-eGFP y pBin-p19 combinadas con pBin61 (calle 1), p617-P0^{CLRDV} (calle 2), p617-P0^{mut1} (calle 3), p617-P0^{mut2} (calle 4), p617-P0^{mut3} (calle 5), p617-P0^{mut4} (calle 6) o p617-P0^{CLRDV-at} (calle 7). A los tres días postinfiltración se tomaron muestras, se extrajeron proteínas totales y se evaluó la presencia de las proteínas AGO1 y P0 mediante SDS-PAGE (8 y 12% respectivamente) y posterior *Western blot* con un anticuerpo policlonal anti-GFP y anti-MYC. La proteína Rubisco teñida con rojo Ponceau fue utilizada como control de carga.

Pasados tres días de la agroinfiltración se tomaron muestras de las hojas inoculadas y se realizó la extracción de proteínas totales. Para evaluar el efecto de los supresores del silenciamiento sobre la estabilidad de AGO1, se detectó dicha proteína utilizando anticuerpos específicos contra GFP mediante *Western Blot* (Figura 73). En el control, agroinfiltrado con las construcciones eGFP-AGO1 y pBin-P19 se observa la expresión de la proteína AGO1 (Figura 73, calle 1) mientras que en presencia de las proteínas P0^{mut1} y P0^{mut4} no se detecta la expresión de AGO1 (Figura 73, calles 3 y 6, respectivamente), al igual que en los controles positivos donde se expresan las proteínas P0^{CLRDV} y P0^{CLRDV-at} (Figura 73, calle 2 y 7). La expresión de AGO1 en las hojas que expresan las proteínas P0^{mut2} y P0^{mut3} (que no poseen actividad supresora del silenciamiento y no interaccionan con GSK1 y SKP1) disminuyó con respecto del control (Figura 73, calles 1, 4 y 5), pero aún es detectable. En todos los tratamientos se detectó la expresión de los supresores del silenciamiento mediante anticuerpos específicos contra el *tag* de Myc (Figura 73, calles 2-7) mediante *Western Blot*. Se observa que en presencia de proteínas P0 con actividad

supresora del silenciamiento como las proteínas $P0^{CLRDV}$, $P0^{CLRDV-at}$, $P0^{mut1}$ y $P0^{mut4}$ los niveles de proteína también son mayores, (Figura 73, calles 2, 7, 3 y 6), en cambio la expresión de las proteínas $P0^{mut2}$ y $P0^{mut3}$, que perdieron la actividad supresora, es menor debido al mecanismo de silenciamiento *sense* que no se encuentra suprimido (Figura 73, calles 4 y 5).

Los resultados obtenidos con las mutantes $P0^{mut1}$ y $P0^{mut4}$ confirman que el cambio en el residuo de la posición 72 entre $P0^{CLRDV}$ (Isoleucina) y $P0^{CLRDVat}$ (Valina) modifica la intensidad de la actividad supresora sin alterar la capacidad de desestabilizar a la proteína AGO1 (Figura 73, calles 3 y 6).

Si bien se detecta la proteína AGO1 en las hojas que expresan $P0^{mut2}$ y $P0^{mut3}$, los niveles de expresión aún se encuentran por debajo del control (pBin-AGO1 y pBin-P19, Figura 73, calle 1). Si estas mutaciones llevaran a P0 a perder por completo la capacidad de desestabilizar AGO1, entonces independientemente de los niveles de expresión de los mutantes la expresión de AGO1 debería encontrarse en el mismo orden del control.

4.3.19. Estudio del efecto de la expresión de $P0^{CLRDV}$ y de $P0^{CLRDV-at}$ sobre el desarrollo de la infección por PVX en *N. benthamiana*

La proteína P0 del CLRDV y de la variante CLRDV-at presentan características funcionales muy similares: ambos poseen actividad supresora del silenciamiento del RNA, aunque con una diferencia en su intensidad, son capaces de interactuar con las proteínas SKP1 y GSK1 y desestabilizar la proteína AGO1. Con el objetivo de evaluar la virulencia de las proteínas $P0^{CLRDV}$ y $P0^{CLRDV-at}$ se estudió el efecto de la expresión de cada una de ellas en el contexto de la infección de un virus heterólogo. Se empleó un clon infectivo del virus PVX el cual contiene una copia extra del promotor de la proteína de cápside viral río arriba de un sitio de clonado múltiple que permite el clonado y la expresión de la proteína que se desea estudiar (Figura 74). Este sistema es utilizado para la expresión de proteínas en plantas y en particular para identificar factores de virulencia. Si la proteína evaluada es un factor de virulencia se observa la exacerbación de los síntomas de PVX por la presencia de la proteína viral. Para este ensayo se obtuvieron dos construcciones, en cada una de ellas se clonó el ORF0 que codifica para la proteína $P0^{CLRDV}$ y $P0^{CLRDV-at}$ en el clon infectivo del virus PVX (Figura 74).

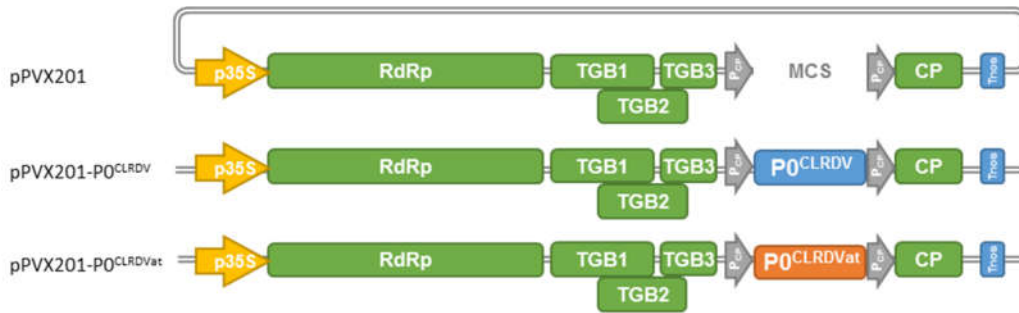


Figura 74. Esquema de los vectores plasmídicos construidos. pPVX201 es un vector plasmídico que contiene el clon infeccioso del virus PVX. El cDNA del genoma viral se encuentra bajo el control del promotor constitutivo del CaMV p35S y posee el Tnos como terminador de la transcripción. En el genoma viral, sobre la región 3' se encuentra la proteína de cápside con su correspondiente promotor, y en este vector el promotor se encuentra duplicado y a continuación se ubica un sitio de clonado múltiple para la inserción del ORF que se desee estudiar. Todas las construcciones fueron clonadas en *E. coli*, purificadas e introducidas en las plantas por inoculación mecánica.

Se infectaron plantas de *N. benthamiana* mediante inoculación mecánica con los vectores PVX-PVX- $P0^{CLR DV}$, PVX- $P0^{CLR DV-at}$ y el clon infeccioso de PVX (Figura 75) y se analizó en forma comparativa el desarrollo de síntomas de la infección. A los quince días posteriores a la inoculación se observó que las plantas inoculadas con el PVX- $P0^{CLR DV}$ (Figura 75, paneles c y e) desarrollaron síntomas más severos de infección con lesiones necróticas en los pecíolos y venas, denominadas *damping off* y muerte de las hojas superiores mientras que las plantas inoculadas con PVX manifestaron síntomas leves de mosaico en las hojas sistémicas (Figura 75, paneles b). Por otro lado, las plantas inoculadas con el PVX- $P0^{CLR DV-at}$ (Figura 75, panel d y f) también desarrollaron síntomas más severos de infección que el PVX, como mosaico y necrosis leve en las hojas superiores, sin embargo, fueron más suaves que los observados en las plantas inoculadas con PVX- $P0^{CLR DV}$. Estos resultados indican que la proteína P0 de ambos virus es un factor de patogenicidad tal como fue descrito para la proteína P0 de TuYV (Pfeffer y col., 2002). Sin embargo, la menor severidad de los síntomas desarrollados por las plantas inoculadas con PVX- $P0^{CLR DV-at}$ sugiere que la proteína $P0^{CLR DV-at}$ es un factor de virulencia más débil que $P0^{CLR DV}$.

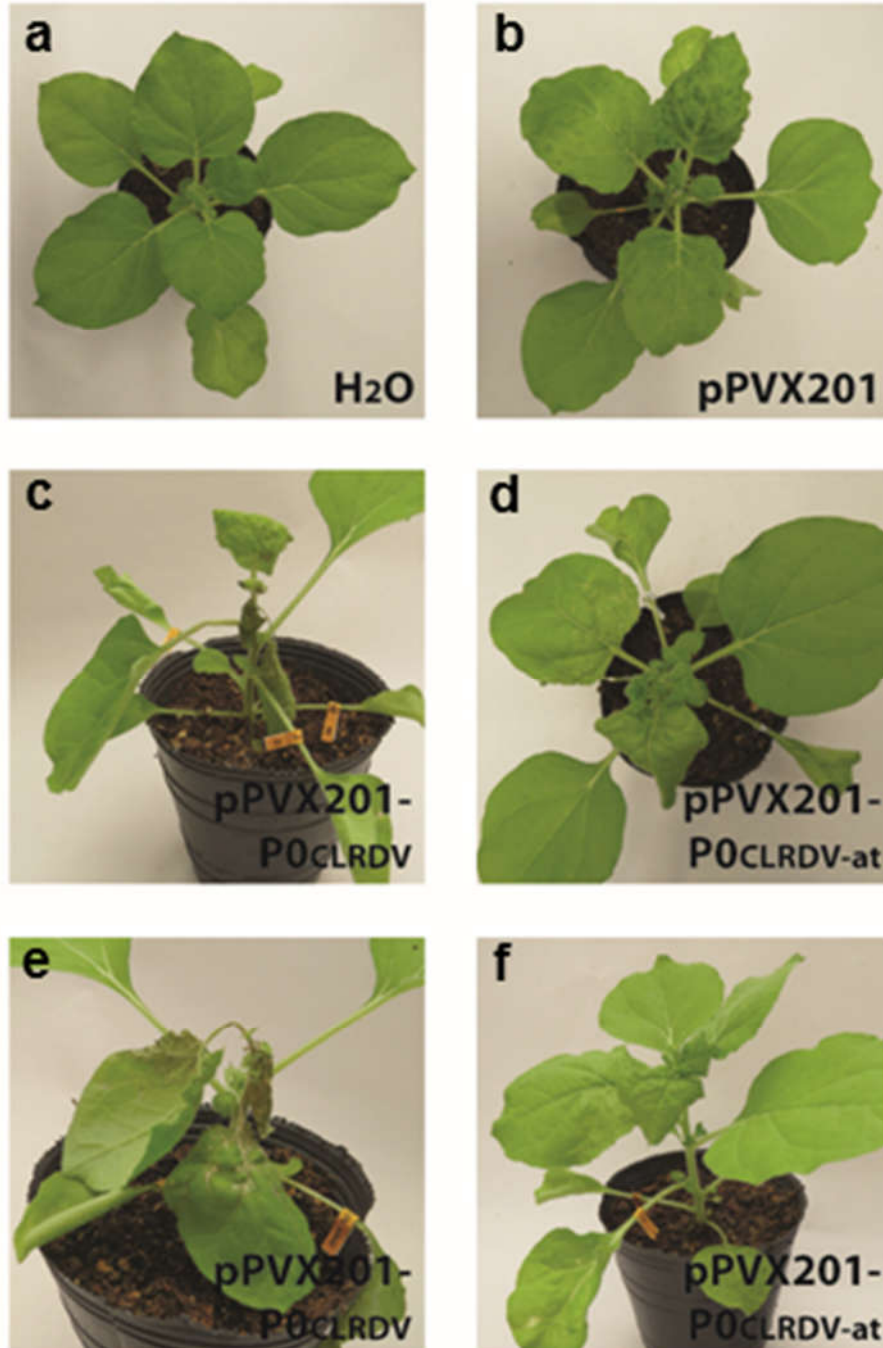


Figura 75. Evaluación de la virulencia asociada a las proteínas P0^{CLRDV} y P0^{CLRDV-at}. Plantas de *N. benthamiana* infectadas con los vectores PVX (panel b), PVX-P0^{CLRDV} (paneles c y e) y PVX-P0^{CLRDV-at} (panel d y f). Las plantas fueron inoculadas con agua como control (panel a). Las fotografías fueron tomadas a los 15 días postinoculación.

Se tomaron muestras de hojas apicales (infección sistémica) de cada tratamiento, se realizaron extracciones de RNA y se determinó la estabilidad de los virus recombinantes mediante la detección del ORF0 (utilizando los *primers* P0 Up y P0 Low) y el ORF de la cápside del virus PVX (con los *primers* Coat-PVX-sense-XbaI y Coat-PVX-antisense-KpnI) mediante RT-PCR (Figura 76A).

Además, se detectó el RNA genómico y subgenómicos de PVX mediante *Northern blot* utilizando la secuencia del ORF0 y la secuencia que codifica para la CP de PVX como sondas (Figura 76 D y C, respectivamente). El análisis por PCR mostró la integridad de la construcción en el RNA de la progenie viral. A su vez el análisis por *Northern Blot* del RNA extraído de las hojas superiores reveló que el ORF0 se conserva en el RNA viral de la progenie (Figura 76D).

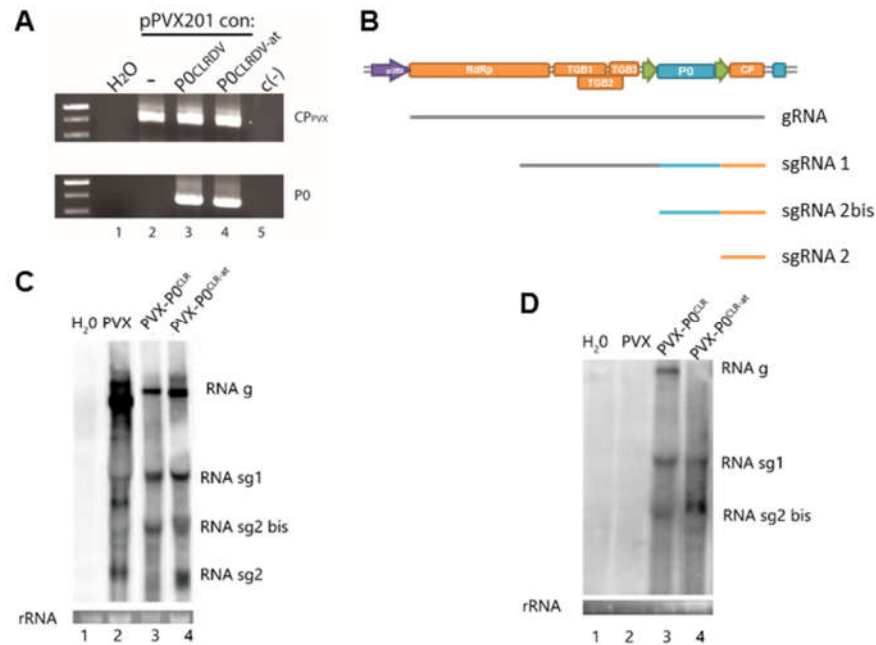


Figura 76. Análisis de las plantas infectadas con PVX, PVX-PO^{CLR}DV y PVX-PO^{CLR}DV-at. **A)** Detección del mRNA que codifica para la proteína de cápside del virus PVX (panel superior) y del mRNA del ORF0 (panel inferior) del CLRDV y CLRDV-at en hojas apicales (infección sistémica) por RT-PCR. **B)** Esquema del genoma viral del PVX y los respectivos RNA subgenómicos. **C)** Detección del RNA genómico y subgenómicos del virus PVX, pPVX-PO^{CLR}DV y pPVX-PO^{CLR}DV-at (cálles 2, 3 y 4, respectivamente) en tejidos no inoculados por *Northern blot* utilizando como sonda la secuencia de la cápside de PVX y **D)** del ORF0 de CLRDV marcadas con [α -³²P] dCTP. CLR: CLRDV; CLR-at: CLRDV-at.

Finalmente, todos los ensayos realizados para la caracterización de la actividad supresora del silenciamiento del RNA de la proteína P0 del CLRDV permiten concluir que: la proteína P0 suprime el silenciamiento génico postranscripcional local pero no sistémico, no interfiere en la producción de siRNAs primarios, pero inhibe la producción de siRNAs secundarios. Además, la proteína P0 interactúa con las proteínas SKP1 y GSK1, componentes del complejo SCF ubiquitina ligasa y la expresión de P0 desestabiliza a la proteína AGO1. El dominio F-Box de la proteína P0 está implicado en la interacción con SKP1 y GSK1, es indispensable para la actividad supresora del silenciamiento y para desestabilizar la proteína AGO1.

Discusión y Conclusiones

5. DISCUSIÓN

Las enfermedades de origen viral causan grandes pérdidas de producción en las especies cultivadas, razón por la cual la caracterización a nivel molecular de los patógenos es fundamental. La metodología utilizada para el control de las enfermedades se basa principalmente en la disminución de los insectos vectores con insecticidas que resultan potencialmente tóxicos para el ambiente y tienen un impacto ecológico negativo. El uso de variedades resistentes es la mejor estrategia para el manejo de las enfermedades de origen viral, pero no siempre se cuenta con materiales resistentes o tolerantes a los patógenos. Por otro lado, el estudio de los patógenos y su interacción con sus plantas hospedantes es de gran importancia para desarrollar estrategias antivirales efectivas o perfeccionar las que se emplean en la actualidad, tanto por ingeniería genética como por mejoramiento convencional asistido por biotecnología.

El algodón es uno de los cultivos económicamente más importantes del mundo y en nuestro país es un cultivo regional clave en el Noreste. La enfermedad azul del algodón es en la actualidad uno de los principales problemas fitopatológicos del cultivo en Sudamérica y es producido por el cotton leafroll dwarf virus (CLRDV). El genoma del CLRDV fue secuenciado por nuestro grupo confirmando que el virus debe clasificarse como una nueva especie dentro del género *Polerovirus* (familia *Luteoviridae*) (Distéfano y col., 2010). El hecho de que el virus se transmite únicamente por el áfido vector y no se puede transmitir en forma mecánica, limita las herramientas con las cuales se cuenta para el estudio del virus.

El presente trabajo de Tesis representa el primero en que se aborda la caracterización de las proteínas codificadas por el CLRDV con el objetivo de profundizar los conocimientos básicos que se tienen sobre las funciones virales. Se desarrolló y caracterizó un clon infectivo del CLRDV, una herramienta fundamental para el estudio de la expresión y función de los genes virales. Asimismo, la identificación del supresor del silenciamiento del RNA entre las proteínas del CLRDV tiene importantes implicaciones en el estudio de la patogénesis y la comprensión del mecanismo y la función de la maquinaria del silenciamiento génico durante la infección viral.

5.1. Construcción y estudio de la capacidad de replicación de un clon infectivo de cDNA del cotton leafroll dwarf virus en plantas de algodón y plantas modelo

Los polerovirus se transmiten estrictamente por áfidos de una manera circulativa y no propagativa y no es posible su transmisión mediante inoculación mecánica, semillas o polen (Mayo y D'Arcy 1999, Smith y Barker 1999, Domier 2011). Los virus pertenecientes a este género poseen tropismo vascular, limitando la replicación viral y el movimiento a las células acompañantes del floema, las células del parénquima floemático y los tubos cribosos de plantas hospedadoras (Mutterer y col., 1999). Como fue descrito para otros virus del género, el CLRDV está restringido al tejido floemático de las plantas de algodón (Takimoto y col., 2009) y no es posible la transmisión del virus mecánicamente. Sin embargo, existen varios mecanismos para la incorporación de DNA foráneo en plantas, entre los que la biobalística y la agoinoculación son los más utilizados (Barampuram y Zhang 2011). La agoinoculación se basa en la capacidad de *Agrobacterium tumefaciens* de transferir eficazmente el T-DNA del plásmido Ti a células vegetales (Zambryski 1988). Este método ha sido ampliamente utilizado para la inoculación de clones infectivos de virus de RNA y es el principal método utilizado para iniciar la infección viral con virus de la familia *Luteoviridae*. El RNA viral transcripto *in vivo* a partir del DNA transferido por *Agrobacterium* inicia la expresión de proteínas virales no estructurales implicadas en la replicación y la supresión del silenciamiento del RNA, permitiendo el inicio de un ciclo viral y posterior propagación sistémica del virus a lo largo de la planta. Es por ello que la producción de clones infectivos de cDNA es un paso esencial para desarrollar un sistema de genética reversa ya que permite la caracterización del virus a nivel molecular y biológico mediante la incorporación de mutaciones específicas en el cDNA viral clonado o ensamblar versiones quiméricas del virus para luego estudiar el efecto en las plantas hospedadoras. En los últimos años se han desarrollado con éxito clones infectivos para varios polerovirus que son inoculados en el hospedador mediante agroinfiltración, entre ellos el potato leafroll virus (PLRV) (Sadowy y col., 1998, Franco-Lara y col., 1999), turnip yellows virus (TuYV) (Leiser y col., 1992), beet mild yellow virus (BMV) (Stephan y Maiss 2006, Stevens y Viganó 2007, Klein y col., 2014), cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) (Prüfer y col., 1995). Además, la técnica de agroinfección fue utilizada para la inoculación de los clones infectivos de PLRV, TuYV y BMV no solo en sus hospedadores naturales sino también en plantas de *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana clevelandii*, *Arabidopsis thaliana*, *Montia perfoliata* y *Physalis floridana* en las cuales han permitido establecer la infección (Franco-Lara y col. 1999, Leiser y col. 1992, Stephan y Maiss 2006, Stevens y Viganó 2007, Klein y col. 2014).

Durante el presente trabajo se desarrolló y caracterizó un clon infectivo de cDNA del CLRDV con el objetivo de conseguir una estrategia alternativa de infección, independizándose de la transmisión por el insecto vector, y generar un sistema de estudio del virus por genética reversa. Las plantas de algodón agroinfiltradas con el clon infectivo desarrollaron síntomas típicos de infección por CLRDV y se detectó el RNA viral y la proteína mayoritaria de la cápside (P3) no sólo en los cotiledones infiltrados sino también en hojas superiores no infiltradas. La metodología de agroinfiltración en las hojas de plantas de algodón no fue posible por las características propias del tejido, por lo que fue necesario buscar alternativas para la inoculación. En el presente trabajo se demostró que la agroinfiltración en los cotiledones expandidos de plantas de algodón es efectivo para la inoculación del clon infectivo de cDNA del CLRDV y el establecimiento de la infección. Además, publicaciones posteriores confirmaron la efectividad de esta metodología (Gao y Shan 2013, Pang y col., 2013, Mustafa y col., 2016).

Los resultados mostraron que la actividad biológica de la progenie viral derivada del clon infectivo del CLRDV es equivalente a la producida por el virus transmitido por el insecto vector. La transmisión de los polerovirus mediante los áfidos vectores requiere de la formación de partículas virales completas. El virus producido como producto de la inoculación del clon infectivo pudo ser transmitido por el áfido *A. gossypi* a nuevas plantas de algodón donde se desarrollaron los síntomas típicos de la enfermedad azul, sugiriendo que las partículas virales del CLRDV se ensamblan correctamente en las plantas agroinfectadas.

El cultivar de algodón resistente a la infección por CLRDV inoculado con el clon infectivo del virus vía agroinfiltración no mostró síntomas de enfermedad azul y tampoco se detectó replicación viral en los tejidos sistémicos al sitio de inoculación. Estos resultados indican que la inoculación del virus por una vía muy diferente a la que ocurre en la naturaleza no afecta el comportamiento del virus en las variedades de algodón previamente caracterizadas como resistentes a la enfermedad y pone de manifiesto la potencialidad de la técnica de agroinfección para la selección de nuevo germoplasma de algodón resistente a la infección por CLRDV.

El clon infectivo del CLRDV resulta una herramienta biotecnológica importante para la evaluación de la resistencia al CLRDV de líneas mejoradas de algodón utilizando el método de agroinfección. Tradicionalmente, en los programas de mejoramiento del cultivo de algodón, la selección de variedades con resistencia genética a la enfermedad azul se realiza mediante la infección de las plantas con insectos vectores virulíferos que fueron criados en el laboratorio y que adquirieron el virus de plantas infectadas. Este método es complejo porque requiere mantener la población de áfidos viable durante todo el año, instalaciones especiales para evitar

el escape de los insectos y a su vez la cantidad de vectores disponible limita el número de plantas a evaluar. La técnica de agroinfiltración no solo presenta ventajas operativas frente al método actual de inoculación del virus mediante la transmisión por áfidos, sino también la eficiencia de infección obtenida es mayor (Casse, Tesis de Maestría, 2016). La técnica de infección con el clon infectivo del CLRDV desarrollada durante el presente trabajo se está utilizando actualmente como sistema de infección de rutina en el programa de mejoramiento de algodón que posee el INTA en la EEA Saénz Peña-Chaco, siendo un método más sencillo y económico que el sistema de pulgones infectivos. El clon infectivo permite reducir el tiempo del proceso de selección del gen de resistencia al CLRDV en líneas avanzadas del programa de mejoramiento genético de algodón.

Los polerovirus tienen la capacidad de infectar plantas diferentes a sus huéspedes naturales cuando la infección se realiza a través de los clones infectivos (Leiser y col., 1992). En este sentido, se demostró que la agroinfiltración del clon infectivo del CLRDV en *Nicotiana benthamiana* y *Arabidopsis thaliana* permite establecer la infección en ellas detectándose el RNA genómico, el subgenómico y la proteína P3 en hojas inoculadas y sistémicas, e incluso en *N. benthamiana* se manifestaron síntomas de infección viral. Si bien no son plantas de interés agronómico, ni hospedantes naturales del virus, ambas representan buenos modelos para el estudio y caracterización de la interacción entre la planta y el virus. Entre las ventajas de poder trabajar con estas especies se encuentra el hecho de que cuentan con la totalidad de sus genomas secuenciados, ensamblados y anotados. Una gran cantidad de conocimientos se han obtenido a partir de estudios realizados con ellas (Meinke y col., 1998; Goodin y col., 2008). *A. thaliana* ha sido utilizada en la identificación de factores del hospedante que contribuyen a la susceptibilidad o al desarrollo de síntomas en las interacciones virus-planta (Pallas y García 2011). En particular, *N. benthamiana* se utilizó en la caracterización de otros polerovirus como el PLRV, TuYV y más recientemente BYDV-PAV y CYDV-RPV (Franco-Lara y col., 1999; Leiser y col., 1992; Yoon y col., 2011). Estas últimas dos especies infectan naturalmente monocotiledóneas, lo cual revela la versatilidad de *N. benthamiana* como herramienta para el estudio de las infecciones virales.

Los análisis moleculares de las plantas agroinfectadas con el CLRDV muestran que los niveles de acumulación de RNA viral y proteína de la cápside (P3) fueron mayores en las hojas inoculadas de *N. benthamiana* y los cotiledones de *G. hirsutum* respecto de las hojas sistémicas de ambas especies (Figura 36). Según se indica en bibliografía, la diferencia en la acumulación del RNA viral entre el sitio de inoculación y las hojas superiores posiblemente se deba a que la agroinfiltración es más eficiente en la transferencia del DNA y de esta manera la mayoría de las células en la

zona de infiltración reciben el genoma viral mientras que la infección por el virus en las hojas superiores se limita a las células acompañantes del floema (Llave 2010; Pfeffer y col., 2002).

Distintos estudios realizados con el clon infectivo del Beet yellows virus (BYV), del foxtail mosaic virus (FoMV) y de los polerovirus BYDV-PAV y CYDV-RPV indican que el empleo de supresores del silenciamiento heterólogos inoculados en *trans* junto con los clones infectivos pueden aumentar la infectividad del virus en la especie *N. benthamiana* (Chiba y col., 2006, Liu y Kearney 2010, Yoon y col., 2011). En particular para el clon infectivo del CLRDV no se detectó un incremento en la infección combinada con los supresores HC-Pro del PVY, P19 del TBSV o P38 del TCV. Sin embargo, la acción en *trans* el supresor 2b del CMV en el parche de inoculación incrementó los índices de infección de un 50% a un 100%. La proteína 2b es un factor de virulencia viral que no solo actúa como supresor del silenciamiento, sino también está involucrada en otros procesos como el movimiento viral local y sistémico y la regulación de la respuesta mediada por ácido salicílico del hospedador (Díaz-pendon y col., 2007). Esto podría indicar que la presencia de la proteína 2b en el sitio de inoculación posee un efecto sinérgico con el supresor del silenciamiento presente en el genoma del CLRDV o bien actúa sobre otros mecanismos en la célula y facilita el movimiento del virus local y sistémicamente o regula la defensa del hospedador favoreciendo la infección viral. La sinergia observada en infecciones mixtas del PVY y el CMV involucra a dos virus no relacionados que codifican supresores dirigidos al silenciamiento local y sistémico, respectivamente (Brigneti y col., 1998). Tal es el caso de la proteína P0 del CLRDV que presenta actividad supresora del silenciamiento a nivel local (Figura 47) por lo tanto la presencia de la proteína 2b del CMV colaboraría sinérgicamente suprimiendo el movimiento sistémico de la señal del silenciamiento y favoreciendo la infección del CLRDV.

A diferencia de *N. benthamiana*, *A. thaliana* es susceptible a una gama reducida de patógenos. Los clones infectivos del TuYV, el BMYV y el BWYV-USA permiten la infección de estos virus en *A. thaliana*. Al igual que para el CLRDV, en las infecciones con estos polerovirus las plantas permanecen asintomáticas pero se detecta la acumulación de virus en las hojas sistémicas entre las tres y las cuatro semanas después de la inoculación (Reinbold y col., 2012). Los virus de las plantas son patógenos biotróficos que necesitan un tejido vivo para su multiplicación y, por lo tanto, en el equilibrio infección-defensa, normalmente no causan la muerte de las plantas. En algunos casos, la infección por virus puede no tener ningún efecto patológico aparente o incluso proporcionar una ventaja selectiva al huésped, pero en muchos casos causa los fenotipos sintomáticos de la enfermedad. Estos fenotipos patológicos son el resultado de la interferencia

y/o la competencia por una cantidad sustancial de recursos del huésped, que puede alterar la fisiología del huésped para causar la enfermedad (Pallas y García 2011).

Distintos protocolos de agroinfiltración coinciden en que el rango óptimo de concentración de agrobacterias para la expresión génica transitoria se encuentra entre un DO_{600} de 0,6 y 1, tanto en plantas modelo (Kim y col., 2009) como en cultivos de interés agronómico (Wroblewski y col., 2005). En ambos trabajos concuerdan en que con una DO_{600} por debajo de 0,1 no se detecta expresión génica mientras que con una DO_{600} por encima de 1,2 se observa clorosis, marchitamiento e incluso necrosis del tejido inoculado. El estudio de la capacidad de replicación del clon infectivo de cDNA del CLRDV en plantas de algodón se realizó a partir de los resultados informados en otras plantas de interés agronómico con una DO_{600} de agrobacterias de 0,8. Luego, buscando optimizar los índices de infección, se probaron concentraciones entre 0,3 y 1,5 de OD_{600} , sin embargo, los porcentajes de infecciones más altos se obtuvieron con la DO_{600} de 0,8. En los cotiledones de algodón, la inoculación de bajas concentraciones de agrobacterias induciría la expresión transitoria sólo en unas pocas células reduciendo la expresión de los genes virales. A pesar de que las cepas de agrobacterias que se utilizan normalmente en los protocolos de agroinfiltración son de laboratorio, y han sido modificadas para que no expresen genes de virulencia, se han identificado respuestas hipersensibles en varias especies, desencadenadas por factores de avirulencia como la flagelina (Wroblewski y col., 2005). A altas concentraciones (DO_{600} : 1,5) a pesar de que no se observan en los cotiledones de algodón síntomas de estrés o hipersensibilidad (clorosis, necrosis, etc.), posiblemente los mecanismos de defensa de la planta se gatillen en respuesta a la alta concentración de PAMPs o moléculas inductoras de la defensa de la planta frente a patógenos bacterianos impidiendo la transferencia de genes a las células vegetales o afectando la viabilidad de las agrobacterias.

La infección por CLRDV mediada por la inoculación del clon infectivo mediante *Agrobacterium* se estableció sistémicamente en las tres especies ensayadas. Sin embargo, el porcentaje de plantas infectadas varió considerablemente entre los distintos hospedantes y en cada una de las repeticiones. Mientras que se infectaron entre el 53 y el 92% de las plantas agroinfiltradas de *G. hirsutum*, sólo del 28,6 al 66% y del 25 al 74% de las plantas de *N. benthamiana* y *A. thaliana*, respectivamente, mostraron ser positivas a la infección por CLRDV. Sin embargo, los índices de infección más altos se obtuvieron al agroinfiltrar el clon infectivo en *A. thaliana* y en *G. hirsutum* en plantas más jóvenes, en estadios de desarrollo previos a los utilizados en los primeros ensayos de puesta a punto de la infección. Se ha informado que variaciones mínimas en la edad de las plantas o en las condiciones de crecimiento de *A. thaliana* afectan la expresión génica

transitoria mediada por la agroinfiltración (Kim y col., 2009). Los resultados obtenidos en las infecciones de algodón demuestran que, al igual que en las plantas modelo, la eficiencia de infección mediante la agroinfección con el clon infectivo del CLRDV es dependiente del estadio de desarrollo de las plantas.

El desarrollo del clon infectivo del CLRDV constituye una herramienta muy importante para la caracterización del virus permitiendo la mutagénesis de regiones específicas del genoma. El clon infectivo del CLRDV se utilizó recientemente en la identificación de la proteína de la variante atípica del CLRDV (CLRDV-at) responsable del quiebre de la resistencia al CLRDV. Para ello se desarrollaron construcciones quiméricas en las cuales se sustituyeron diferentes proteínas virales del CLRDV por las del CLRDV-at. Así se identificó a la proteína P0 como la responsable del quiebre de la resistencia (Agrofoglio, Tesis Doctoral, 2017), demostrando que el clon infectivo del CLRDV constituye una herramienta que permite avanzar en el estudio de la función de los genes virales por genética reversa.

5.2. Estudio de la interacción entre sí de las proteínas codificadas por el CLRDV y con potenciales blancos moleculares del hospedante.

Las partículas virales de los polerovirus están compuestas por dos tipos de proteínas, la proteína mayoritaria de la cápside (P3) de 22 a 23 kDa y la minoritaria de 75 kDa conocida como proteína de *readthrough* (RT) o P3P5. Está demostrado para algunos polerovirus que la proteína RT se incorpora en la cápside a través de su dominio P3 mientras que el extremo P5 sobresale de la superficie del virión y es responsable de la interacción con proteínas dentro del áfido vector definiendo la especie de áfido que media la transmisión de cada virus (Reinbold y col., 2003). Según los resultados obtenidos en la evaluación de interacción entre las proteínas del CLRDV se detectó la interacción entre las proteínas P3 entre sí y con la proteína P3P5 del CLRDV consistente con sus funciones en el ensamblado de la cápside viral.

La encapsidación viral se consideró durante muchos años como un medio para proteger el RNA genómico del entorno desfavorable del floema. En rigor, no se ha encontrado actividad de RNAasa en este compartimento, pero si se ha identificado la maquinaria completa para la degradación de proteínas en proteasoma. Estudios recientes de proteómica identificaron aminopeptidasas y proteasas en la savia, lo que sugiere que los virus pueden reclutar factores celulares para proteger sus viriones o moverse sistémicamente como ribonucleoproteínas (complejos formados entre RNA viral y proteínas celulares y/o virales) (Hipper y col., 2013). La mayoría de estas proteínas celulares suelen ser específicas de cada par hospedador-virus y aún quedan muchos factores por descubrir, lo que ciertamente ayudará a desentrañar los mecanismos por los cuales los componentes celulares están involucrados en el movimiento viral sistémico (Hipper y col., 2013). Las construcciones obtenidas para la expresión de las proteínas P3 y P3P5 en el sistema de doble híbrido constituyen una importante herramienta para la identificación de factores de la planta hospedadora implicados en el movimiento u otros mecanismos virales empleando bibliotecas de cDNA del hospedador en experimentos de doble híbrido en levaduras.

Los polerovirus codifican una proteína de movimiento implicada en la circulación viral entre células que posee características celulares y bioquímicas comunes a otras proteínas de movimiento viral. Todas ellas comparten la capacidad de unirse a ssRNA, se localizan en los plasmodesmos de las células vegetales mediando el aumento del tamaño de exclusión, para ejercer su función forman homodímeros y se encuentran fosforiladas (Schmitz y col., 1997; Sokolova y col., 1997; Hofius y col., 2001; Tacke y col., 1993; Xia y col., 2012). Los resultados obtenidos en la evaluación de interacción entre las proteínas virales del CLRDV se detectó la interacción entre la proteína P4 con otras moléculas de P4, consistente con la capacidad de

formar homodímeros para ejercer su función en el movimiento viral. Asimismo, no se detectó interacción entre la proteína P4 y los componentes de la cápside viral (P3 y P3P5) lo cual refuerza aún más la posible interacción de las partículas virales con factores celulares que permitan su movilidad mientras la proteína P4 media la apertura de los plasmodesmos.

Los mutantes de TuYV defectuosos en la expresión de la proteína P4 son capaces de replicar en protoplastos de *Chenopodium quinoa*, pero se encuentra alterada su capacidad para moverse a largas distancias en algunos hospedadores (Ziegler-Graff y col., 1996). Dado que el rol de la proteína P4 en el movimiento de célula a célula no ha sido definida con precisión debido a la falta de sistemas experimentales, es posible que el movimiento vascular alterado de los mutantes P4 sea consecuencia de un retraso en el transporte de célula a célula. Se cree que existiría una coexistencia entre dos vías de movimiento, una dependiente y la otra independiente de la proteína P4 (Ziegler-Graff y col., 1996). A su vez, el descubrimiento de un nuevo ORF que codifica para la proteína P3a involucrada en el movimiento viral plantea nuevos interrogantes sobre como las proteínas P3a y P4 actúan, ya sea cooperativamente sobre la misma entidad viral (viriones o complejos ribonucleoproteicos, RNP), o si una proteína promueve el movimiento de RNP mientras la otra actúa sobre los viriones. Otros modos de acción alternativos serían que cada una de ellas funcione en plasmodesmos específicos (PD "convencional" o PPU), en células particulares del floema, en ciertas etapas de desarrollo o incluso en hospedadores específicos (Smirnova y col., 2015).

Existen antecedentes en bibliografía donde mediante el *screening* de distintas bibliotecas de doble híbrido se han logrado identificar interacciones hospedador-polerovirus de gran relevancia. Ejemplos de ellos son la interacción de P0^{TuYV} con las proteínas ASK1 y ASK2 de *A. thaliana* (Pazhouhandeh y col., 2006) o del dominio *readthrough* del mismo virus con la quinasa CIPK7 (*calcineurin B-like protein-interacting protein kinase-7*) (Rodríguez-Medina y col., 2015). Con el objetivo de identificar otros posibles blancos moleculares de la proteína P0^{CLRDV} se realizó un *screening* en una librería generada a partir del RNA de células acompañantes del floema de *A. thaliana*. Sin embargo, no fue posible identificar blancos moleculares a través de esta técnica debido a que no se obtuvieron resultados concretos que permitieran continuar con el análisis. Teniendo en cuenta que, a diferencia de otras proteínas P0 caracterizadas previamente, P0^{CLRDV} no interactúa con las proteínas ASK de *A. thaliana* (Figura 57), la ausencia de resultados positivos en el *screening* probablemente se deba a que *A. thaliana* no sea el hospedador indicado para realizar este tipo de búsquedas. De todas maneras, no se descarta la posibilidad de que haya existido algún problema técnico o error experimental.

5.3. Identificación del supresor del silenciamiento del RNA del CLRDV y caracterización del mecanismo de acción

El silenciamiento del RNA es uno de los principales mecanismos de defensa antiviral en plantas. La mayoría de los virus vegetales poseen una o más proteínas con actividad supresora del silenciamiento que interfieren en distintos pasos de la vía. Dentro de la Familia *Luteoviridae*, los virus pertenecientes a los géneros *Polerovirus* y *Enamovirus* poseen en su genoma el ORF0 que codifica para la proteína P0. La proteína P0 ha sido caracterizada como supresora del silenciamiento del RNA, y los niveles de actividad de supresión difieren entre las distintas especies del género y entre los aislamientos de una misma especie (Pfeffer y col., 2002; Mangwende y col., 2009; Almasi y col., 2015) (Introducción, Tabla 4). Pfeffer y col. (2002) demostraron que las proteínas P0 del TuYV y CABYV tienen una fuerte actividad supresora del silenciamiento mientras que la proteína P0 codificada por el PLRV tiene una actividad supresora menor. Asimismo, se demostró que la proteína P0 de distintos aislamientos del BMV (Kozłowska-Makulska y col., 2010) y de dos especies del CYDV (Almasi y col., 2015) presentan diferente eficiencia de actividad supresora mientras que la proteína P0 del BChV no posee actividad supresora del silenciamiento (Kozłowska-Makulska y col., 2010).

En el presente estudio se identificó a la proteína P0 del CLRDV como supresor del silenciamiento del RNA. Existe una gran cantidad de supresores del silenciamiento caracterizados que poseen diferentes mecanismos de acción, independientemente de la familia o género viral al cual pertenecen. Distintos estudios mostraron que dentro de los polerovirus se encuentran descriptos supresores con actividad supresora local como las proteínas P0 del TuYV y CABYV mientras que las proteínas P0 del PLRV, SCYLV, MaYMV y distintos aislamientos brasileiros del CLRDV bloquearían el movimiento de la señal del silenciamiento a nivel sistémico (Pfeffer y col., 2002; Delfosse y col., 2014; Fusaro y col., 2012; Mangwende y col., 2009; Chen y col., 2016; Cascardo y col., 2015). Según los resultados obtenidos en los experimentos aquí presentados la proteína P0 del CLRDV ejerce su acción a nivel local y no impide el movimiento de la señal del silenciamiento a células cercanas al sitio de inoculación ni tampoco a regiones distales de la planta, como hojas y tallos sistémicos, en el sistema de *N. benthamiana*. Cascardo y col. (2015) realizaron recientemente una caracterización de la proteína P0 proveniente de varios aislamientos del CLRDV de distintas regiones de Brasil y encontraron que todas poseen actividad supresora del silenciamiento, aunque algunas de ellas con menor intensidad. A su vez, han identificado que la proteína P0 de cinco de los aislamientos analizados es supresora del silenciamiento sistémico y la proteína P0 de tres aislamientos presentan una actividad supresora sistémica moderada porque inhiben la movilidad en la mitad de las plantas analizadas. Entre

estos últimos se encuentra el P0^{CLRDV} proveniente de nuestro país y previamente caracterizado (Delfosse y col., 2014). Si bien los resultados de ambos trabajos no coinciden entre sí, se han empleado protocolos diferentes. Cascardo y col. agroinfiltraron solo una hoja mientras que en los ensayos realizados en esta tesis cuentan con cuatro hojas agroinfiltradas. Es probable que la superficie sobre la cual se desencadena el silenciamiento no sea suficiente para que la señal del silenciamiento sea visible en los tejidos sistémicos, mientras que en los experimentos aquí presentados la señal sistémica es detectable. No se trata de la única discrepancia presente en bibliografía, los estudios realizados por Fusaro (2012) y Almasi (2015) sobre la proteína P0 del CYDV también presentan diferencias en la actividad supresora del silenciamiento a nivel sistémico. El mecanismo de silenciamiento del RNA e incluso la supresión mediada por proteínas virales son mecanismos muy sensibles a las condiciones ambientales (Szittyá y col., 2003). Si bien, los protocolos recomiendan trabajar a temperaturas por debajo de los 29 °C, no es la única condición ambiental que afecta estos ensayos. La intensidad de luz ha sido identificada como otra variable ambiental que afecta la progresión de estos ensayos (Szittyá y col., 2003, Patil y Fauquet 2015). A altas intensidades de luz ($\geq 450 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) y altas temperaturas (≥ 30 °C), el silenciamiento génico se localiza en el tejido foliar infiltrado, sin propagación sistémica y curiosamente en estas mismas condiciones ambientales las plantas de *N. benthamiana* muestran recuperación de los síntomas virales. Para corroborar si la proteína P0^{CLRDV} es efectivamente supresor del silenciamiento sistémico será necesario complementar los resultados con otras metodologías. Un método alternativo muy utilizado es el de injertos, donde se requieren plantas transgénicas que sobreexpresan un gen reportero (por ejemplo, T19, es una línea de *N. tabacum* que sobreexpresa GUS), una planta transgénica silenciada para el mismo gen reportero (por ejemplo, 6b5 es una línea de *N. tabacum* silenciada para la expresión de GUS) y una planta transgénica que exprese la proteína a evaluar (en este caso la proteína P0). El cruzamiento entre 6b5 y P0 (6b5 X P0) permitirá comprobar la actividad supresora de P0 en este sistema, revirtiendo el silenciamiento de GUS. Luego empleando la última porción del tallo y las raíces de 6b5 X P0 como “pie” y la porción superior del tallo de T19 como “copa”, al cabo de unos días sí efectivamente P0 posee actividad supresora del silenciamiento sistémico la señal no se movería desde el pie 6b5 X P0 hacia la copa T19 y la copa continuará expresando GUS, sí P0 no posee actividad supresora sistémica, en la copa se silenciará GUS.

Se ha evaluado la actividad supresora del silenciamiento del RNA de la proteína P0 de numerosos virus del género *Polerovirus*, sin embargo, pocas han sido caracterizadas en el contexto de la infección viral. La proteína P0 del TuYV no conserva la intensidad en la actividad supresora del silenciamiento en el contexto de la infección viral, siendo mucho más fuerte cuando la proteína

se sintetiza a partir de una construcción monocistrónica en lugar de a partir del RNA genómico viral (Pfeffer y col., 2002). En el contexto de la infección del CLRDV donde además de expresarse la proteína P0 están presentes el resto de las proteínas virales y se desencadenan otros mecanismos de la infección viral o de la defensa de la planta, la intensidad de la supresión del silenciamiento local fue equivalente a la observada en la expresión transitoria de la proteína P0^{CLRDV} sola. Por otra parte, al igual que la proteína P0 del CLRDV la proteína P0 del BMV muestra la misma intensidad en su actividad supresora en ambos contextos de expresión (Klein y col., 2014). Estas diferencias sugieren que la función de la proteína P0 no sólo depende de la eficiencia de traducción sino también de otros factores presentes en el contexto de la infección viral que podrían regular su actividad. Las plantas en las que se suprimió el silenciamiento por efecto de la expresión del clon infectivo del CLRDV se observó que la señal del silenciamiento se movió sistémicamente en la planta sugiriendo que el virus no tendría ninguna proteína capaz de impedir la movilidad de la señal del silenciamiento sistémico (Figura 47).

Los estudios realizados con el clon infectivo del TuYV y la expresión de la proteína P0^{TuYV} indican que la expresión del supresor del silenciamiento P0 en los polerovirus es un mecanismo muy coordinado. Por ejemplo, altos niveles de expresión de P0 en el contexto de la infección viral no favorece la infección e incluso los intentos de optimizar la región de iniciación de la traducción han fallado porque en la progenie viral las mutaciones en la secuencia entorno al inicio de la traducción se restablecieron o dieron como resultado una mutación adicional creando un codón de terminación río abajo (Pfeffer y col., 2002). Estos resultados indican que la coordinación fina de la expresión de P0 da lugar a la infección del virus y a su vez el silenciamiento antiviral es un mecanismo bien controlado que es regulado por el virus, el hospedante o ambos, para permitir su coexistencia (Csorba y col., 2010).

Durante este trabajo se desarrollaron construcciones que permiten la expresión de la proteína P0^{CLRDV} fusionada a *tags* (c-MYC o HA) o a la proteína eGFP. Se evaluó la funcionalidad como supresor del silenciamiento de la proteína P0 expresada a partir de todas las construcciones e independientemente del elemento fusionado (c-MYC, HA o eGFP), en la posición carboxilo terminal no interfiere sustancialmente con la actividad supresora. Esta observación posiblemente se encuentre vinculada con la posición del dominio F-Box próximo al amino terminal y su función en la actividad supresora de la proteína. Asimismo, las construcciones obtenidas constituyen importantes herramientas para el estudio y caracterización de la proteína a través de la expresión *in planta*.

Se encuentran descritos en bibliografía varios mecanismos de bloqueo del silenciamiento génico mediado por proteínas virales. En su mayoría son conservados dentro de los miembros del mismo género viral (Incarbone y Dunoyer 2013, Pallas y García 2011). Como se ha descrito previamente para otras proteínas P0, P0^{CLR_{RDV}} interfiere río abajo de la producción primaria de siRNA mediada por las enzimas DCL, bloqueando la producción de siRNA secundarios (Figura 52) asociados a la amplificación de la señal del silenciamiento (Bortolamiol y col., 2008; Fusaro y col., 2012; Almasi y col., 2015).

El silenciamiento génico involucra no sólo el bloqueo postranscripcional de la expresión génica sino también actúa a nivel transcripcional. Los siRNAs de 21 y 22 nt son los principales responsables de gatillar la degradación del RNA a nivel postranscripcional, mientras que los siRNAs de 24 nt están involucrados en el silenciamiento génico transcripcional (Incarbone y Dunoyer 2013, Llave 2010). En presencia de la proteína P0^{CLR_{RDV}} la población de siRNAs de GFP de 21 nt disminuye considerablemente más que la población de 24 nt (Figura 52, calle 8), a diferencia de lo que ocurre en presencia de las proteínas P0^{TuYV} y P0^{CABYV} en donde disminuyen por igual ambos tipos de siRNAs derivados de GFP. Así mismo en presencia del CLR_{RDV} la diferencia entre los siRNAs de GFP de 21-24 nt es sutil, pero sigue siendo visible (Figura 52, calle 9). Un análisis por secuenciación masiva de las poblaciones de miRNA en plantas de algodón infectadas por CLR_{RDV} mostró una reducción en la producción de miRNA de ambos tamaños respecto de las plantas sanas, sin embargo, mientras la población de miRNA de 21 nt disminuyó 4 veces, la de 24 nt solo 2,8 veces. En base a estos resultados se podría inferir que la diferencia en las poblaciones de siRNA sería una característica de la infección por CLR_{RDV} independientemente del hospedador, donde P0^{CLR_{RDV}} interfiere con la actividad de DCL4 y en menor medida con DCL3, ambas enzimas responsables del mecanismo de silenciamiento génico transcripcional (Silva y col., 2011). En este mismo trabajo evaluaron los niveles de mRNA de las cuatro DCL en plantas infectadas comparándolos con los resultados en plantas sanas. Los niveles de mensajeros de *Dcl1* (*GhDcl1*) y *Dcl3* (*GhDcl3*) no mostraron diferencias cuantitativas, sin embargo, se observaron diferencias en los niveles de mensajeros de las principales DCL involucradas en la respuesta antiviral: un aumento en *GhDcl4* y una disminución en *GhDcl2*. Estos resultados podrían revelar que al igual que otros virus vegetales CLR_{RDV} podría poseer otra proteína con actividad supresora del silenciamiento o bien la misma proteína P0^{CLR_{RDV}} podría interferir con la actividad de otros componentes de la vía del silenciamiento génico.

Los supresores virales validados experimentalmente exhiben una considerable diversidad en sus secuencias primarias, estructuras, orígenes, modo de acción supresora y evolución. Las

características más generales para la identificación de un supresor del silenciamiento es la presencia de dominios de interacción a RNA o de motivos de unión a componentes de la maquinaria del silenciamiento tales como el motivo GW/WG de unión a las proteínas AGO. Sin embargo, la presencia de estos motivos *per se* no es una evidencia suficiente para anotar una proteína viral como supresor de silenciamiento (Jagga y Gupta 2014). La actividad supresora del silenciamiento en otras familias y géneros virales se encuentra asociada a proteínas involucradas en más de una función viral, tales son los casos de P38 que compone la cápside viral del TCV (Azevedo y col., 2010), la subunidad menor de la replicasa viral del TMV (Vogler y col., 2007), la proteína de movimiento viral del banana bunchy top virus (BBTV) (Amin y col., 2011) son algunos ejemplos. Además, hay varios ejemplos de virus que poseen más de una proteína con función supresora del silenciamiento tales como las proteínas del triple bloque y la proteína rica en cisteínas codificada por el ORF6 del potato virus M (PVM) (Senshu y col., 2011) o las proteínas p20, p23 y CP del citrus tristeza virus (CTV) (Lu y col., 2004). El predictor *in silico* de supresores del silenciamiento de origen viral “plant VsupPred” emplea modelos de predicción estadística basada en las características de las secuencias de proteínas supresoras virales verificadas experimentalmente. Las características de las proteínas supresoras del silenciamiento con las que fue entrenado el predictor incluye la composición de aminoácidos y distribución de diversas propiedades fisicoquímicas. Si bien las predicciones *in silico* indicaron a las proteínas virales P0 y P4 del CLRDV como potenciales supresores del silenciamiento los resultados experimentales en el sistema de *N. benthamiana* demostraron que sólo P0 posee dicha función. El error en la predicción podría deberse a la presencia de un dominio de interacción a RNA en la proteína P4 del CLRDV, que se trata de una característica bioquímica en común entre las proteínas de movimiento viral y algunos supresores del silenciamiento que median su acción a través de la unión a siRNA. La evaluación de la actividad supresora del silenciamiento en las proteínas P3 y P4 del CLRDV indicó que no son supresores del silenciamiento local. A su vez, el hecho de que el clon infectivo no presente actividad supresora sistémica indica que el virus no tendría ninguna proteína con dicha función.

Se ha demostrado que las proteínas P0 de los polerovirus TuYV, CABYV y CYDV interactúan con las proteínas ASK1 y/o ASK2 de *A. thaliana* a través del dominio F-Box (Pazhouhandeh y col., 2006; Almasi y col., 2015). ASK1 y ASK2 son componentes del complejo SKP1-Cullin F-Box (SCF), que pertenece a la familia de las E3 ubiquitina ligasas responsables de la unión de ubiquitinas a las proteínas blanco. Al igual que otros miembros del género la proteína P0 del CLRDV posee el dominio F-Box (LPXXL/IX₍₁₀₋₁₃₎P) conservado, sin embargo los análisis de interacción entre la proteína P0^{CLRDV} y las proteínas ASK1 y ASK2 en el sistema de doble híbrido no mostraron

interacción entre ellas. No obstante, P0 del CLRDV interactuó con los ortólogos de ASK1 en *N. benthamiana*, SKP1 y en *G. hirsutum*, GSK1. Ambos hospedadores manifiestan síntomas claros de infección en los ensayos de inoculación del clon infectivo del CLRDV, sin embargo, en *A. thaliana* el virus es capaz de replicar y moverse dentro del hospedador, pero de manera asintomática. La detección de la interacción de la proteína P0 del CLRDV con la proteína SKP1 junto con la capacidad infectiva del virus y la manifestación de síntomas de infección en *N. benthamiana* demuestra la potencialidad de este hospedador para el estudio y caracterización de funciones virales en esta planta modelo. Asimismo, la interacción de la proteína P0 del CLRDV con la proteína GSK1 demuestra que el mecanismo de acción de P0 descrito en bibliografía se encuentra conservado en su hospedante natural.

El alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las tres proteínas ASK1, SKP1 y GSK1 muestra que ASK1 posee una porción de cinco residuos aminoacídicos que no alinea con las secuencias de los otros dos ortólogos (Anexo III). La región involucra los aminoácidos 72 a 76 o 71 a 75 dependiendo del algoritmo que se utilice para realizar el alineamiento (MUSCLE o CLUSTAL Ω). Las estructuras moleculares obtenidas por cristalografía de rayos X, indican que los aminoácido desalineados pertenecen a un *loop* desestructurado entre las α -hélices 3 y 4 mientras que la región involucrada en la interacción con los dominios F-Box de otras proteínas (SKP2 y TIR1) se encuentra en la región carboxilo terminal e involucra los residuos a partir de la posición 95 aproximadamente en adelante hasta el final de estas proteínas (Tan y col., 2007; Schulman y col., 2000). Al no encontrarse disponible la estructura cristalográfica de ninguna proteína P0 individual o en interacción con ASK1 (o SKP1) es difícil inferir la relevancia de este *loop* en la interacción entre ambas proteínas, pero quizás pueda explicar la falta de interacción de la proteína P0^{CLRDV} con la proteína ASK1 de *A. thaliana*.

La interacción entre las proteínas P0 y ASK ocurre a través del dominio F-Box que poseen las proteínas P0 (Pazhouhandeh y col., 2006; Zhuo y col., 2014). Se ha identificado que ciertos aminoácidos conservados del motivo son indispensables para la actividad supresora del silenciamiento de P0 (Pazhouhandeh y col., 2006; Baumberger y col., 2007; Bortolamiol y col., 2007; Han y col., 2010; Fusaro y col., 2012). Con el objetivo de determinar si la interacción con el sistema SCF ubiquitina ligasa y la actividad supresora del silenciamiento de la proteína P0 del CLRDV es dependiente de la conservación del dominio F-Box se realizaron mutantes de P0 en la región consenso del motivo. A partir del dominio F-Box de P0^{CLRDV} (LPFIIX₁₀P) se desarrollaron dos mutantes P0^{mut2} (**aaFIIX₁₀a**) y P0^{mut3} (**aaFIIX₁₀P**). Los análisis de la actividad supresora de los mutantes de P0 mediante ensayos basados en el silenciamiento de la proteína GFP, indicaron

que ambas proteínas pierden completamente la actividad supresora. Se detectó una disminución no solo en la cantidad de mRNA y proteína de GFP sino también en los niveles de expresión de las proteínas mutadas consistente con la ausencia de actividad supresora del silenciamiento. Estos resultados demuestran que el dominio F-box es fundamental para la funcionalidad de la proteína $P0^{CLRDV}$ como supresor del silenciamiento. Teniendo en consideración que los cambios de aminoácidos introducidos en $P0^{mut3}$ (L68→A y P69→A) están incluidas en el $P0^{mut2}$ (L68→A, P69→A y P83→A) es evidente que los residuos Leucina 68 y Prolina 69 son indispensables para la actividad supresora de la proteína $P0^{CLRDV}$. Estos resultados coinciden con los análisis realizados en las proteínas P0 de los polerovirus TuYV, SCYLV, MABYV y PLRV (Pazhouhandeh y col., 2006; Mangwende y col., 2009; Zhuo y col., 2014; Han y col., 2010) para los cuales también ha sido evaluado el efecto de las mutaciones en el dominio F-Box sobre la actividad supresora. Consistente con la capacidad en la supresión del silenciamiento, los mutantes $P0^{mut2}$ y $P0^{mut3}$ no mostraron interacción ni con la proteína SKP1 ni con GSK1 mediante doble híbrido en levaduras.

La supresión del silenciamiento mediada por la proteína P0 está asociada a la desestabilización de la proteína AGO1. Mediante ensayos de expresión transitoria de las proteínas P0 del CLRDV o sus mutantes y AGO1 en *N. benthamiana*, se logró determinar que en presencia de la proteína $P0^{CLRDV}$ la proteína AGO1 es degradada. De esta manera se confirmó que el mecanismo de acción de $P0^{CLRDV}$ es conservado respecto de otras proteínas P0 caracterizadas previamente (Baumberger y col., 2007; Fusaro y y col., 2012; Cascardo y col., 2015). A su vez, aquellos mutantes que perdieron su capacidad supresora del silenciamiento no fueron capaces de inducir la degradación de AGO1 señalando que el dominio F-box está implicado en el mecanismo de acción de la proteína $P0^{CLRDV}$.

Al igual que en los ensayos de expresión transitoria en *N. benthamiana* línea 16c donde se evaluó la actividad supresora del silenciamiento de los mutantes, en los análisis de estabilidad de AGO1 se observa que, mientras la proteína P19 asegura la expresión de todas las proteínas analizadas, hay una disminución en los niveles de expresión de los mutantes $P0^{mut2}$ y $P0^{mut3}$ del CLRDV respecto de las proteínas P0 supresoras del silenciamiento ($P0^{CLRDV}$ y $P0^{CLRDV-at}$). Este resultado es consistente con la ausencia de actividad supresora del silenciamiento de cada proteína *per se*. Asimismo, las proteínas $P0^{mut2}$ y $P0^{mut3}$ son dos mutantes que pierden la actividad supresora del silenciamiento y la capacidad de interactuar con la proteína SKP1 sin embargo aún se observa un efecto sobre la estabilidad de la proteína AGO1 ya que los niveles detectados de esta proteína se encuentran por debajo del control. Otros autores, realizando estos mismos ensayos, no

detectaron ni la diferencia en los niveles de expresión de las proteínas P0 mutadas ($P0^{TuVv}$ y $P0^{PLRV}$) ni la disminución de los niveles de AGO1 (Baumberger y col., 2007; Fusaro y col., 2012). Sin embargo, Zhuo y col. (2014) estudiando mutantes de la proteína P0 del PLRV obtuvieron resultados similares en el estudio de un mutante en el residuo de la posición 87 W→A (que no involucra el dominio F-box) que al igual que los mutantes $P0^{mut2}$ y $P0^{mut3}$ pierde la actividad supresora del silenciamiento, presenta bajos niveles de expresión y aún desestabiliza a AGO1. $P0^{PLRV}$ posee la particularidad de que además del dominio F-box presenta motivos GW/WG que le permitirían interactuar con la proteína AGO1. Estos resultados quizás sean un indicio de que $P0^{CLRDV}$ posee algún otro mecanismo alternativo que involucre otros dominios o regiones implicados en la regulación de los niveles de AGO1. Asimismo, en las proteínas P0 del MABYV, SCYLV y PLRV se han descrito otros residuos involucrados en la actividad supresora (F12, FL 30-31 y FW 211-212) de los cuales se desconoce su implicancia en la regulación de la estabilidad de AGO1 (Han y col., 2010; Mangwende y col., 2009; Zhuo y col., 2014).

CLRDV-at constituye una cepa del CLRDV recientemente caracterizada que se manifiesta con sintomatología atípica en germoplasma de algodón resistente y susceptible a la infección por CLRDV, produciendo una nueva enfermedad en las plantas de algodón (Agrofoglio y col., 2017). Con el fin de caracterizar si la actividad supresora más débil observada con la proteína $P0^{CLRDV-at}$ con respecto al $P0^{CLRDV}$ (Agrofoglio, Tesis Doctoral, 2017) está dada por la diferencia del residuo aminoacídico en la posición 72 dentro del consenso del dominio F-Box, se realizó el mutante $P0^{mut4}$ (cambiando el consenso del dominio F-Box del $P0^{CLRDV}$ al del $P0^{CLRDV-at}$) y el mutante $P0^{mut1}$ (cambiando el consenso del dominio F-Box del $P0^{CLRDV-at}$ al del $P0^{CLRDV}$) (Figura 67). Al igual que los P0 de los cuales derivan los cambios de aminoácidos, los mutantes $P0^{mut1}$ y $P0^{mut4}$ conservaron su actividad supresora con una leve variación en las intensidades de supresión, mientras $P0^{mut1}$ disminuyó su actividad respecto de $P0^{CLRDV}$, $P0^{mut4}$ la aumentó respecto de $P0^{CLRDV-at}$. Asimismo, los mutantes $P0^{mut1}$ y $P0^{mut4}$ aún conservaron la capacidad de interaccionar con las proteínas SKP1 y GSK1 en levaduras y de desestabilizar la proteína AGO1 en ensayos de expresión transitoria en *N. benthamiana*. Por lo tanto, el cambio de aminoácido en la posición 72 (V72 o I72) explicaría parcialmente las diferencias de intensidad de supresión entre ambos supresores ya que ninguno de los mutantes recuperó los niveles de supresión observados en el P0 del cual proviene su consenso F-Box. De esta manera se puede inferir que posiblemente haya otro u otros cambios en la secuencia de aminoácidos involucrados en la actividad supresora que expliquen las diferencias observadas entre $P0^{CLRDV}$ y $P0^{CLRDV-at}$ e incluso podrían estar asociadas a la capacidad de desestabilizar a la proteína AGO1 que conservan los mutantes $P0^{mut2}$ y $P0^{mut3}$.

Existe otra secuencia muy bien conservada entre las proteínas PO de distintos virus del género *Polerovirus*. Al igual que PO^{CABYV}, PO^{MABYV} y PO^{TuYV}; PO^{CLRDV} contiene una secuencia próxima a la región carboxilo terminal (K/R)IYGEDGX₃FWR (Anexo IV). Teniendo en cuenta las características de las proteínas F-Box celulares que además de interactuar con las proteínas ASK poseen un dominio de interacción al sustrato mediante el cual definen los blancos moleculares del complejo SCF ubiquitina ligasa, se propuso que este motivo podría representar un tipo de dominio de interacción con sustratos no descrito previamente (Pazhouhandeh y col., 2006; Han y col., 2010). Han y col. (2010) demostraron que la actividad de la proteína PO^{MABYV} como supresor del silenciamiento del RNA requiere, además del dominio F-Box, los residuos Fenilalanina y Triptófano (FW) del dominio cercano al extremo carboxilo. Si bien la proteína PO^{CLRDV} posee el motivo FW de la secuencia consenso, el dominio presenta solo un 50% de identidad con el descripto (PO^{CLRDV}: NLYGDGAX₃FWR). Esta variabilidad de la proteína PO^{CLRDV} podría explicar la diferencia observada en la actividad supresora respecto de las proteínas PO^{TuYV} y PO^{CABYV} (Mangwende y col., 2009; Han y col., 2010; Pazhouhandeh y col., 2006).

La localización subcelular de la proteína PO^{CLRDV} en el núcleo de la célula vegetal permite confirmar que se encuentra presente en el compartimento subcelular donde podría ejercer su función. La interacción de la proteína PO^{TuYV} con la proteína AGO1 ocurre en el núcleo de la célula. Además, las proteínas que integran los complejos SCF: ASK1, ASK2 y AtCUL1 se localizan principalmente en núcleo (Shen y col., 2002) y hay evidencia experimental que sugiere que la ubiquitinación por los complejos SCF ocurre principalmente en este compartimento celular (Bortolamiol y col., 2007).

Dada la importancia del silenciamiento del RNA como primera línea de defensa dirigida contra virus es esperable que este mecanismo se encuentre bajo vigilancia para desencadenar una segunda línea de defensa (ETI) o contra-contra defensa por parte del hospedador. La inmunidad desencadenada por efectores depende del reconocimiento molecular entre una proteína efectora y una proteína R producto de un gen de resistencia. En algunos casos, los efectores virales se unen directamente a las proteínas R de la planta y podrían potencialmente activarlas a través de esta unión, y a su vez se ha demostrado que la actividad de otros efectores ocurre indirectamente a través de una proteína blanco del hospedador que desencadena la activación de una proteína R. Cuando un efector codificado por un patógeno es reconocido en las plantas por el producto de un gen R del hospedador se desencadena la resistencia mediada por la respuesta hipersensible (HR) (Mandadi y Scholthof 2013). Varios supresores del silenciamiento, como el producto del gen VI del CaMV, la proteína 2b del tomato aspermy virus (TAV,

Cucumovirus) y la proteína p19 del TBSV (*Tombusvirus*), se han descrito como inductores de respuestas necróticas locales o sistémicas similares a las mediadas por los genes *R*. Aunque ninguna de estas respuestas es capaz de bloquear completamente la infección viral, son capaces de condicionar el desarrollo de síntomas (Pallas y García 2011, Wang y col., 2015). Respecto de la proteína P0, su función en la estabilidad de la proteína AGO1 y su tasa de evolución siendo la mayor del género *Polevirus* sugieren que participa en la carrera armamentista molecular con los hospedadores y es un posible inductor de ETI en algunas especies de plantas. A su vez, la baja identidad de secuencia entre los diferentes polerovirus sugiere que la inducción del ETI estaría mediada por una proteína del hospedador. P0^{CLRDV} induce necrosis en el sitio de inoculación al igual que lo observado con las proteínas P0 de CABYV, SCYLD, PLRV y CYDV (Mangwende y col., 2009; Fusaro y col., 2012), aunque las proteínas P0 del TuYV y MaYMV no producen necrosis en *N. benthamiana*. Por otro lado, la proteína P0 del TuYV, del PLRV y del CABYV causan una respuesta hipersensible en *N. glutinosa* accesión TW59 donde las mutaciones en el dominio F-Box de la proteína P0^{TuYV} no solo afecta su función como supresor del silenciamiento sino conlleva a una pérdida de respuesta hipersensible sugiriendo que el complejo SCF ubiquitina ligasa o bien la proteína AGO1 son posibles desencadenantes de la respuesta ETI del hospedador. Además de identificar a la proteína P0 como efector, los estudios en *N. glutinosa* accesión TW59 permitieron identificar el gen de resistencia a polerovirus de carácter dominante denominado *RPO1* (*Resistance to POleroviruses 1*) (Wang y col., 2015).

El clon infectivo del CLRDV desencadena una necrosis aun mayor que la proteína P0^{CLRDV} sola. Esto indica que otros mecanismos de la infección viral tales como la replicación viral o la expresión de otras proteínas virales podrían estar siendo reconocidos por la planta y exacerbarían el efecto de la proteína P0. Es importante destacar que las proteínas efectoras no solo son de origen viral, sino que las bacterias, en este caso *A. tumefaciens*, también poseen moléculas inductoras de la respuesta ETI (Pruss y col., 2008). En los resultados aquí descritos el control inoculado con agrobacterias conteniendo el vector pBin61 vacío no mostro necrosis (Figura 48, panel a), lo cual indica que se trata de un efecto de respuesta inmune frente a las proteínas virales y no a la bacteria utilizada como medio de inoculación.

El empleo de vectores recombinantes de PVX permite la identificación de determinantes de patogenicidad o virulencia. La expresión de, por ejemplo, supresores del silenciamiento produce una exacerbación de los síntomas de la infección del virus PVX (Brigneti y col., 1998). El estudio de la sintomatología de la infección de PVX en *N. benthamiana* con respecto a la infección de PVX portando la proteína P0 del CLRDV, mostró un significativo aumento en la severidad de los síntomas señalando a la proteína P0^{CLRDV} como un fuerte factor de virulencia tal como fue

descripto para la proteína P0 de TuYV (Pfeffer y col., 2002). Además, la necrosis sistémica condujo a la muerte de la planta, típica de una interacción susceptible indicando que P0 sería un factor de patogenicidad clave en la infección del CLRDV en *N. benthamiana*.

El análisis comparativo entre las proteínas P0 del CLRDV y del CLRDV-at mostró que la severidad de los síntomas desarrollados en las plantas inoculadas con cada una de las construcciones (PVX-P0^{CLRDV} y PVX-P0^{CLRDV-at}) sugiere que la proteína P0^{CLRDV} es un factor de virulencia más fuerte que P0^{CLRDV-at}. Estos resultados son consistentes con las observaciones en las intensidades de fluorescencia de los ensayos de supresión del silenciamiento en *N. benthamiana* línea 16c.

La expresión de la proteína P0 en *N. benthamiana* mediante la inoculación del vector vial pPVX201 a diferencia de lo observado en los ensayos de expresión transitoria en *N. benthamiana* y *N. benthamiana* línea 16c no indujo necrosis en las hojas inoculadas, sin embargo, se detectó marchitamiento. Si bien no se cuantificó la expresión de la proteína P0 la ausencia de necrosis puede deberse a bajos niveles de expresión de la proteína por efecto del promotor viral de PVX que regula la transcripción del mensajero que codifica para la proteína P0.

La maquinaria del silenciamiento del RNA no solo está implicada en la defensa antiviral sino también en el procesamiento de los miRNA responsables de regular una amplia gama de procesos como el desarrollo, la morfogénesis, la floración y la señalización hormonal (Palatnik y col., 2003; Mallory y col., 2004; Rubio-Somoza y Weigel, 2011). La desregulación de la homeostasis de miRNA producida por los virus y sus supresores del silenciamiento explicarían en parte los síntomas que presentan las plantas infectadas (Pallas y García, 2016; Zhang y col., 2015; Csorba y col., 2015). Las plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresaban la proteína P0 del TuYV mostraron alteraciones en el desarrollo y en los niveles de miRNAs (Bortolamiol y col., 2007). Recientemente, en plantas de *G. hirsutum* infectadas con CLRDV se identificaron 50 familias de miRNA con niveles alterados, entre los que se incluían miRNAs que regulan los niveles de mensajeros de genes implicados en la resistencia, respuesta a auxina y factores de transcripción (Romanel y col., 2012). Además, los siRNA derivados del silenciamiento del RNA viral pueden dirigirse contra genes endógenos del hospedador, como sucede con los siRNA derivados del RNA satélite del virus del CMV. Estos siRNAs silencian un gen de la ruta biosintética de la clorofila induciendo síntomas de amarillamiento en el tabaco. Pero la interferencia de los virus con la biogénesis de miRNAs no es una característica exclusiva de las proteínas virales supresoras del silenciamiento. Bazzini y col. (2007) han demostrado que la interacción entre la proteína de movimiento y la cápside del TMV, expresadas en plantas transgénicas, aumenta los

niveles de miRNAs y dicha desregulación podría ser la causa de las anomalías de desarrollo observados en estas plantas.

5.4. Perspectivas

El clon infectivo desarrollado en el presente trabajo representa el primero capaz de infectar plantas de algodón y representa una herramienta que permitirá avanzar en el conocimiento del patosistema algodón-virus-vector mediante estudios de genética reversa. Además, facilitará el trabajo en plantas modelo utilizadas para el estudio de la interacción planta-patógeno tales como *N. benthamiana*, así como el uso de las colecciones de mutantes de *A. thaliana* para profundizar en el estudio de las funciones virales y su interacción con el hospedador. Finalmente, el clon infectivo del CLRDV es una herramienta biotecnológica importante para la evaluación de la resistencia al CLRDV en las líneas de algodón desarrolladas en el programa de mejoramiento del INTA y permitirá acelerar los procesos de búsqueda de genes de resistencia en el banco de germoplasma de algodón.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis representan un avance en el conocimiento de la función de las proteínas codificadas por el CLRDV, especialmente en la comprensión de la función e interacciones de la proteína P0 con proteínas de sus hospedantes proporcionando un punto de partida para la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la enfermedad azul producida por la infección del CLRDV. Deja abiertos algunos interrogantes sobre la proteína P0 y las mutantes del CLRDV y su variante atípica que necesitaran ser abordados con más detalle para poder dilucidar los mecanismos que expliquen las diferencias observadas. Además, resta estudiar el efecto de las mutaciones del dominio F-box sobre la infectividad del virus para lo cual se utilizará el clon infectivo del CLRDV introduciendo las mutaciones en la proteína P0 y evaluando la infectividad viral en algodón.

Asimismo, el estudio a futuro de la interacción planta-virus a nivel molecular, a través de la identificación de proteínas de algodón o *N. benthamiana* capaces de interactuar con las proteínas virales, contribuirá a dilucidar las características particulares en el establecimiento de la infección, la defensa de la planta y el desarrollo de síntomas permitiendo profundizar en los conocimientos básicos para lograr a futuro un mejor control de la enfermedad.

6. CONCLUSIONES

- ✓ El método de agroinfiltración en los cotiledones de plantas de algodón es efectivo para la inoculación del clon infectivo de cDNA del CLRDV.
- ✓ El clon infectivo del CLRDV infecta y produce los síntomas de la enfermedad azul en plantas de algodón de una variedad susceptible al virus y no infecta plantas de una variedad resistente.
- ✓ Las partículas virales generadas a partir de la infección con el clon infectivo del CLRDV son transmisibles por el insecto vector *A. gossypii*.
- ✓ El clon infectivo del CLRDV infecta las plantas modelo *N. benthamiana* y *A. thaliana*.
- ✓ La proteína P3 del CLRDV interactúa con otras moléculas de P3 y con la proteína P3P5 y la proteína P4 interactúa con otras moléculas de P4.
- ✓ La proteína P0 del CLRDV posee actividad supresora del silenciamiento del RNA local inhibiendo la amplificación de la señal del silenciamiento. Su mecanismo de acción involucra la interacción con la proteína SKP1 (GSK1 en *G. hirsutum*) del sistema SCF ubiquitina ligasa promoviendo la degradación de la proteína AGO1 del complejo RISC.
- ✓ La actividad supresora y la interacción de la proteína P0 del CLRDV con las proteínas GSK1 y SKP1 son dependientes del dominio F-Box presente en la proteína P0.

Verónica Cecilia Delfosse
Doctorando

Ana Julia Distéfano
Directora de Tesis

Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agrofoglio, YC. 2017. Caracterización molecular del virus asociado a la enfermedad azul atípica del algodón y estudio del quiebre de la resistencia. s.l., Universidad de Buenos Aires.
- Agrofoglio, YC; Delfosse, C; Casse, F; Hopp, HE; Kresic, B; Distéfano, AJ. 2017. Identification of a New Cotton Disease Caused by an Atypical Cotton Leafroll Dwarf Virus in Argentina. *Phytopathology* 107(3): 1-8.
- Alcaide-Loridan, C; Jupin, I. 2012. Ubiquitin and Plant Viruses, Let's Play Together! *Plant Physiology* 160: 72-82.
- Ali, M; Hameed, S; Tahir, M. 2014. Luteovirus: insights into pathogenicity. *Archives of Virology* 159(11): 2853-2860.
- Almasi, R; Miller, WA; Ziegler-Graff, V. 2015. Mild and severe cereal yellow dwarf viruses differ in silencing suppressor efficiency of the P0 protein. *Virus Research* 208(January): 199-206.
- Alvarado, VY; Scholthof, HB. 2012. AGO2: A New Argonaute Compromising Plant Virus Accumulation. *Frontiers in Plant Science* 2: 112.
- Amin, I; Hussain, K; Akbergenov, R; Yadav, JS; Qazi, J; Mansoor, S; Hohn, T; Fauquet, CM; Briddon, RW. 2011. Suppressors of RNA silencing encoded by the components of the cotton leaf curl begomovirus-betasatellite complex. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 24(8): 973-983.
- Azevedo, J; Garcia, D; Pontier, D; Ohnesorge, S; Yu, A; Garcia, S; Braun, L; Bergdoll, M; Hakimi, MA; Lagrange, T; Voinnet, O. 2010. Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes & Development* 24(9): 904-915.
- Barampura, S; Zhang, ZJ. 2011. Recent advances in plant transformation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 701: 1-35.
- Bartel, DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116(2): 281-97.
- Baulcombe, DC; Chapman, S; Cruz, S. 1995. Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *The Plant Journal* 7(6): 1045-1053.
- Baumberger, N; Tsai, CH; Lie, M; Havecker, E; Baulcombe, DC. 2007. The Polerovirus Silencing Suppressor P0 Targets ARGONAUTE Proteins for Degradation. *Current Biology* 17(18): 1609-1614.
- Bazzini, AA; Hopp, HE; Beachy, RN; Asurmendi, S. 2007. Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(29): 12157-12162.
- van Bel, AJE. 2003. Transport Phloem: Low Profile, High Impact. *Plant Physiol.* 131(4): 1509-1510.
- Boissinot, S; Erdinger, M; Monsion, B; Ziegler-Graff, V; Brault, V. 2014. Both structural and non-structural forms of the readthrough protein of cucurbit aphid-borne yellows virus are essential for efficient systemic infection of plants. *PLoS ONE* 9(4): e93448.
- Enfermedad azul del Algodonero en la República Argentina (1997, P. R. Sáenz Peña, Chaco, Argentina). 1997. Ed. Bonacic Kresic, I. P. R. Sáenz Peña, Chaco, Argentina,
- Bonacic Kresic, I. 2006. Algodón. Manual de campo. 2006.
- den Boon, JA; Ahlquist, P. 2010. Organelle-Like Membrane Compartmentalization of Positive-Strand RNA Virus Replication Factories. *Annual Review of Microbiology* 64(1): 241-256.
- Bortolamiol, D; Pazhouhandeh, M; Marrocco, K; Genschik, P; Ronique Ziegler-Graff, V. 2007. The Polerovirus F Box Protein P0 Targets ARGONAUTE1 to Suppress RNA Silencing. *Current Biology* 17: 1615-1621.
- Bortolamiol, D; Pazhouhandeh, M; Ziegler-Graff, V. 2008. Viral suppression of RNA silencing by destabilisation of ARGONAUTE 1. *Plant signaling & behavior* 3(9): 657-9.
- Brault, V; Bergdoll, M; Mutterer, J; Prasad, V; Pfeffer, S; Erdinger, M; Richards, KE; Ziegler-Graff, V. 2003. Effects of point mutations in the major capsid protein of beet western yellows virus on capsid formation, virus accumulation, and aphid transmission. *Journal of virology* 77(5): 3247-56.
- Brault, V; van den Heuvel, JF; Verbeek, M; Ziegler-Graff, V; Reutenauer, A; Herrbach, E; Garaud, JC; Guilley, H; Richards, K; Jonard, G. 1995. Aphid transmission of beet western yellows luteovirus requires the minor capsid read-through protein P74. *The EMBO journal* 14(4): 650-9.
- Brigneti, G; Voinnet, O; Li, WX; Ji, LH; Ding, SW; Baulcombe, DC. 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *The EMBO journal* 17(22): 6739-46.
- Brown, CM; Dinesh-Kumar, SP; Miller, WA. 1996. Local and distant sequences are required for efficient readthrough of the barley yellow dwarf virus PAV coat protein gene stop codon. *Journal of virology* 70(9): 5884-92.
- Brown, JK. 1992. *Virus Diseases of Cotton*. Ed. RJ Hillocks. Cotton Dis Oxon, United Kingdom, Commonwealth Agricultural Bureaux International.
- Bruyère, A; Brault, V; Ziegler-Graff, V; Simonis, M-T; van den Heuvel, JFJM; Richards, K; Guilley, H; Jonard, G; Herrbach, E. 1997. Effects of mutations in the beet western yellows virus readthrough protein on its expression and packaging and on virus accumulation, symptoms, and aphid transmission. *Virology* 230(230): 323-334.
- «Mal de Misiones» nueva enfermedad del algodón de probable origen virósico. (1986, Neuquen). 1986. Ed. Campagnac, NA; Bonacic Kresic, M; Poisson, J. Neuquen, U.N. del Comahue. 503-511 p.
- Cardozo, T; Pagano, M. 2004. The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Bio* 5(9): 739-51.
- Cascardo, RS; Arantes, ILG; Silva, TF; Sachetto-Martins, G; Vaslin, MFS; Corrêa, RL. 2015. Function and diversity of P0 proteins among cotton leafroll dwarf virus isolates. *Virology journal* 12(1): 123.
- Casse, MF. 2016. Estudio del uso potencial de un clon infectivo del Cotton leafroll dwarf virus (CLRDV) como método alternativo al

sistema tradicional de infección con áfidos para la transmisión de la enfermedad azul del algodón. s.l., Universidad Nacional de Nordeste.

Cauquil, J. 1977. Studies on a cotton disease of viral origin: blue disease. *Coton et Fibres Tropicales* 32(3): 259-278.

Cauquil, J; Follin, JC. 1983. Presumed virus and mycoplasma-like organism diseases in subsaharan Africa and in the rest of the world. *Coton et Fibres Tropicales* 38(4): 293-317.

Cauquil, J; Vaissayre, M. 1971. La «maladie bleue» du cotonnier en Afrique : transmission de cotonnier à cotonnier par *Aphis gossypii* Glover. *Coton et Fibres Tropicales* 26(4): 463-466.

Chen, S; Jiang, G; Wu, J; Liu, Y; Qian, Y; Zhou, X. 2016. Characterization of a novel polerovirus infecting maize in China. *Viruses* 8(5).

Chiba, M; Reed, JC; Prokhnevsky, AI; Chapman, EJ; Mawassi, M; Koonin, E V.; Carrington, JC; Dolja, V V. 2006. Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replicon. *Virology* 346(1): 7-14.

Citovsky, V. 1993. Probing Plasmodesmal Transport with Plant Viruses. *Plant physiology* 102(4): 1071-1076.

Corrêa, RL; Silva, TF; Simões-Araújo, JL; Barroso, PA V; Vidal, MS; Vaslin, MFS. 2005. Molecular characterization of a virus from the family Luteoviridae associated with cotton blue disease. *Archives of Virology* 150(7): 1357-1367.

Csorba, T; Kontra, L; Burgyán, J. 2015. Viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology* 479-480: 85-103.

Csorba, T; Kontra, L; Burgyán, J. 2015. viral silencing suppressors_ Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology* 479(480): 85-103.

Csorba, T; Lóza, R; Hutvágner, G; Burgyán, J. 2010. Polerovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1. *Plant Journal* 62(3): 463-472.

D'Arcy, CJ; Domier, LL. 2000. Barley yellow dwarf. *The Plant Health Instructor* 2000.

Delfosse, VC; Agrofoglio, YC; Casse, MF; Hopp, E; Bonacic Kresic, I; Distéfano, AJ. 2015. Nuevo método para la evaluación del comportamiento sanitario de variedades de algodón frente a enfermedad azul. *Ciencia y Tecnología de los Cultivos Industriales* 8.

Delfosse, VC; Agrofoglio, YC; Casse, MF; Kresic, IB; Hopp, HE; Ziegler-Graff, V; Distéfano, AJ. 2014. The P0 protein encoded by cotton leafroll dwarf virus (CLRVD) inhibits local but not systemic RNA silencing. *Virus research* 180: 70-5.

Delfosse, VC; Casse, MF; Agrofoglio, YC; Kresic, IB; Hopp, HE; Ziegler-Graff, V; Distéfano, AJ. 2013. Agroinoculation of a full-length cDNA clone of cotton leafroll dwarf virus (CLRVD) results in systemic infection in cotton and the model plant *Nicotiana benthamiana*. *Virus Research* 175(1): 64-70.

Derrien, B; Baumberger, N; Schepetilnikov, M; Viotti, C; De Cillia, J; Ziegler-Graff, V; Isono, E; Schumacher, K; Genschik, P. 2012. Degradation of the antiviral component ARGONAUTE1 by the autophagy pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 15942-15946.

Derrien, B; Genschik, P. 2014. When RNA and protein degradation pathways meet. *Front Plant Sci* 5(April): 161.

Diaz-pendon, JA; Li, F; Li, W-X; Ding, S-W. 2007. Suppression of Antiviral Silencing by Cucumber Mosaic Virus 2b Protein in *Arabidopsis* Is Associated with Drastically Reduced Accumulation of Three Classes of Viral Small Interfering RNAs. *The Plant cell* 19(June): 2053-2063.

Distéfano, AJ; Kresic, IB; Hopp, HE. 2010. The complete genome sequence of a virus associated with cotton blue disease, cotton leafroll dwarf virus, confirms that it is a new member of the genus Polerovirus. *Archives of Virology* 155(11): 1849-1854.

Domier, LL. 2011. Luteovirus. *The Springer Index of Viruses*. New York, NY, Springer New York, p.821-826.

Doumayrou, J; Sheber, M; Bonning, BC; Allen Miller, W. 2016. Role of pea enation mosaic virus coat protein in the host plant and aphid vector. *Viruses* 8(11): 312.

Earley, K; Smith, M; Weber, R; Gregory, B; Poethig, R. 2010. An endogenous F-box protein regulates ARGONAUTE1 in *Arabidopsis thaliana*. *Silence* 1(1): 15.

Ebert, TA; Cartwright, B. 1997. Biology and ecology of *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). *Southwestern Entomologist* 22(1): 116-153.

Ebhardt, HA; Thi, EP; Wang, M-B; Unrau, PJ. 2005. Extensive 3' modification of plant small RNAs is modulated by helper component-proteinase expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(38): 13398-403.

Ellis, MH; Stiller, WN; Phongkham, T; Tate, WA; Gillespie, VJ; Gapare, WJ; Zhu, Q-H; Llewellyn, DJ; Wilson, IW. 2016. Molecular mapping of bunchy top disease resistance in *Gossypium hirsutum* L. *Euphytica* 210(1): 135-142.

Endres, MW; Gregory, BD; Gao, Z; Foreman, AW; Mlotshwa, S; Ge, X; Pruss, GJ; Ecker, JR; Bowman, LH; Vance, V. 2010. Two Plant Viral Suppressors of Silencing Require the Ethylene-Inducible Host Transcription Factor RAV2 to Block RNA Silencing. *PLoS Pathogens* 6(1): e1000729.

Fang, DD; Xiao, J; Canci, PC; Cantrell, RG. 2010. A new SNP haplotype associated with blue disease resistance gene in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 120(5): 943-953.

Franco-Lara, LF; Mcgeachy, KD; Commandeur, U; Martin, RR; Mayo, MA; Barker, H. 1999. Transformation of tobacco and potato with cDNA encoding the full-length genome of Potato leafroll virus : evidence for a novel virus distribution and host effects on virus multiplication. *Journal of General Virology* 80: 2813-2822.

Frohman, MA; Dush, MK; Martin, GR. 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(23): 8998-9002.

Fryxell, P. 1984. Taxonomy and germplasm resources. In Kohel R Madison, American Society of Agronomy.

Fusaro, AF; Correa, RL; Nakasugi, K; Jackson, C; Kawchuk, L; Vaslin, MFS; Waterhouse, PM. 2012. The Enamovirus P0 protein is a silencing suppressor which inhibits local and systemic RNA silencing through AGO1 degradation. *Virology* 426(2): 178-187.

- Galbieri, R; Cia, E; Fuzatto, MG; Franzon, RC; Belot, JL; Dias, J a. CDS. 2010. Transmissibilidade e reação de genótipos de algodoeiro a uma forma atípica do vírus do mosaico das nervuras. *Tropical Plant Pathology* 35(2): 88-95.
- Gallo, D; Nakano, O; Wiendel, FM; Silveira Neto, S; Carvalho, RPL; Batista, GC; Berti Filho, E; Para, JRP; Zucchi, RA; Alves, SB; Vendramin, JD. 1988. *Manual de entomologia agrícola*. 2da ed. São Paulo, Agronômica Ceres, 649.
- Gao, X; Shan, L. 2013. Functional genomic analysis of cotton genes with agrobacterium-mediated virus-induced gene silencing. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 975: 157-65.
- Glick, D; Barth, S; Macleod, KF. 2010. Autophagy : cellular and molecular mechanisms. *Journal of Pathology* The 221(1): 3-12.
- Goodin, MM; Zaitlin, D; Naidu, RA; Lommel, SA. 2008. *Nicotiana benthamiana* : Its History and Future as a Model for Plant-Pathogen Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21(8): 1015-1026.
- Goto, K; Kobori, T; Kosaka, Y; Natsuaki, T; Masuta, C. 2007. Characterization of Silencing Suppressor 2b of Cucumber Mosaic Virus Based on Examination of its Small RNA-Binding Abilities. *Plant and Cell Physiology* 48(7): 1050-1060.
- Gray, S; Gildow, FE. 2003. L UTEOVIRUS -A PHID I NTERACTIONS. *Annual Review of Phytopathology* 41(1): 539-566.
- Han, YH; Xiang, HY; Wang, Q; Li, YY; Wu, WQ; Han, CG; Li, DW; Yu, JL. 2010. Ring structure amino acids affect the suppressor activity of melon aphid-borne yellows virus P0 protein. *Virology* 406(1): 21-27.
- Haupt, S; Stroganova, T; Ryabov, E; Kim, SH; Fraser, G; Duncan, G; Mayo, MA; Barker, H; Taliansky, M. 2005. Nucleolar localization of potato leafroll virus capsid proteins. *Journal of General Virology* 86(10): 2891-2896.
- Hipper, C; Brault, V; Ziegler-Graff, V; Revers, F. 2013. Viral and cellular factors involved in Phloem transport of plant viruses. *Frontiers in plant science* 4(May): 154.
- Ho, SN; Hunt, HD; Horton, RM; Pullen, JK; Pease, LR. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77(1): 51-59.
- Hofius, D; Herbers, K; Melzer, M; Omid, A; Tacke, E; Wolf, S; Sonnewald, U. 2001. Evidence for expression level-dependent modulation of carbohydrate status and viral resistance by the potato leafroll virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Journal* 28(5): 529-543.
- Hutchinson, JB; Silow, RA; Stephens, SG. 1947. The Evolution of *Gossypium* and the Differentiation of the Cultivated Cottons
- Incarbone, M; Dunoyer, P. 2013. RNA silencing and its suppression: Novel insights from in planta analyses. *Trends in Plant Science* 18(7): 382-392.
- Innes, NL. 1983. Bacterial Blight of Cotton. *Biological Reviews* 58(1): 157-176.
- Jagga, Z; Gupta, D. 2014. Supervised learning classification models for prediction of plant virus encoded RNA silencing suppressors. *PLoS ONE* 9(5): 1-9.
- Jamou, RM; Boonrod, K; Fuellgrabe, MW; Ali-Shtayeh, MS; Krczal, G; Wassenegger, M. 2011. The helper component-proteinase of the Zucchini yellow mosaic virus inhibits the Hua Enhancer 1 methyltransferase activity in vitro. *Journal of General Virology* 92(9): 2222-2226.
- Kamer, G; Argos, P. 1984. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic acids research* 12(18): 7269-82.
- Karimi, M; Inzé, D; Depicker, A. 2002. GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* 7(5): 193-195.
- Kim, MJ; Baek, K; Park, CM. 2009. Optimization of conditions for transient Agrobacterium-mediated gene expression assays in Arabidopsis. *Plant Cell Reports* 28(8): 1159-1167.
- Kirkin, V; McEwan, DG; Novak, I; Dikic, I. 2009. A Role for Ubiquitin in Selective Autophagy. *Molecular Cell* 34(3): 259-269.
- Klein, E; Brault, V; Klein, D; Weyens, G; Lefèbvre, M; Ziegler-Graff, V; Gilmer, D. 2014. Divergence of host range and biological properties between natural isolate and full-length infectious cDNA clone of the Beet mild yellowing virus 2ITB. *Molecular Plant Pathology* 15(1): 22-30.
- Kobayashi, H; Tomari, Y. 2016. RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1859(1): 71-81.
- Kozłowska-Makulska, A; Guilley, H; Szyndel, MS; Beuve, M; Lemaire, O; Herrbach, E; Bouzoubaa, S. 2010. P0 proteins of European beet-infecting poleroviruses display variable RNA silencing suppression activity. *Journal of General Virology* 91(4): 1082-1091.
- Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lakatos, L; Csorba, T; Pantaleo, V; Chapman, EJ; Carrington, JC; Liu, Y-P; Dolja, V V; Calvino, LF; López-Moya, JJ; Burguán, J. 2006. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *The EMBO journal* 25(12): 2768-2780.
- Leiser, RM; Ziegler-Graff, V; Reutenauer, A; Herrbach, E; Lemaire, O; Guilley, H; Richards, K; Jonard, G. 1992. Agroinfection as an alternative to infecting plants with beet western yellows luteovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89(19): 9136-9140.
- Informe del PIC nº 320.536. Caracterización del agente causal de la enfermedad azul del algodón en el área centro chaqueña (1994, s.l.). 1994. Ed. Lenardon, S. s.l.,
- Li, X; Halpin, C; Ryan, MD. 2007. A novel cleavage site within the potato leafroll virus P1 polyprotein. *Journal of General Virology* 88(5): 1620-1623.
- Liu, Z; Kearney, CM. 2010. An efficient Foxtail mosaic virus vector system with reduced environmental risk. *BMC Biotechnology* 10(1): 88.
- Llave, C. 2010. Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends in Plant Science* 15(12): 701-707.
- Lu, R; Folimonov, A; Shintaku, M; Li, W-X; Falk, BW; Dawson, WO; Ding, S-W. 2004. Three distinct suppressors of RNA silencing

encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(44): 15742-15747.

Mallory, AC; Reinhart, BJ; Jones-Rhoades, MW; Tang, G; Zamore, PD; Barton, MK; Bartel, DP. 2004. MicroRNA control of *PHABULOSA* in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *The EMBO Journal* 23(16): 3356-3364.

Mandadi, KK; Scholthof, K-BG. 2013. Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease? *The Plant cell* 25(5): 1489-505.

Mangwende, T; Wang, ML; Borth, W; Hu, J; Moore, PH; Mirkov, TE; Albert, HH. 2009. The P0 gene of Sugarcane yellow leaf virus encodes an RNA silencing suppressor with unique activities. *Virology* 384(1): 38-50.

Mayo, MA; D'Arcy, CJ. 1999. Family Luteoviridae : a reclassification of luteoviruses. Eds. H Smith; H Barker. New York, NY, CABI Publishing, 15-22.

Mayo, MA; Ziegler-Graff, V. 1996. Molecular biology of luteoviruses. *Advances in virus research* 46: 413-60.

Meinke, DW; Cherry, JM; Dean, C; Rounsley, SD; Koornneef, M. 1998. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science (New York, N.Y.)* 282(5389): 662, 679-682.

Michaeli, S; Galili, G; Genschik, P; Fernie, AR; Avin-Wittenberg, T. 2016. Autophagy in Plants - What's New on the Menu? *Trends in Plant Science* 21(2): 134-144.

Michelotto, MD; Busoli, AC. 2007. Caracteriza??o da transmiss??o do v??rus do mosaico-das-nervuras do algodoeiro pelo pulg??o aphid gossypii com rela??o ?? persist??ncia e ao tempo necess??rio para inocula??o. *Bragantia* 66(3): 441-447.

Miller, WA; Dinesh-Kumar, SP; Paul, CP. 1995. Luteovirus Gene Expression. *Critical Reviews in Plant Sciences* 14(3): 179-211.

Doença azul do algodoeiro: novos aspectos a serem considerados no manejo. - Portal Embrapa (2008, s.l.). 2008. Ed. Miranda, JE; Suassuna, ND; Morello, C de L; Silva, MV de F; Freire, EC. s.l.,

Mizushima, N; Levine, B; Cuervo, AM; Klionsky, DJ. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451(7182): 1069-75.

Mondino, M; Peterlin, O; Elena, G. 2006. Algodón. *Cultivos Industriales. Algodón*. C Buenos Aires, Editorial Facultad de Agronomía.

Morel, J-B; Godon, C; Mourrain, P; Béclin, C; Boutet, S; Feuerbach, F; Proux, F; Vaucheret, H. 2002. Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *The Plant cell* 14(3): 629-39.

Mustafa, R; Shafiq, M; Mansoor, S; Briddon, RW; Scheffler, BE; Scheffler, J; Amin, I. 2016. Virus-Induced Gene Silencing in Cultivated Cotton (*Gossypium* spp.) Using Tobacco Rattle Virus. *Molecular Biotechnology* 58(1): 65-72.

Mutterer, J; Ziegler-Graff, V; Richards, KE. 1999. Agroinfection as a means of transmitting luteoviruses to host plants for study of gene expression. Eds. H Smith; H Barker. New York, NY, CABI Publishing, 43-67.

Nakamura, S; Mano, S; Tanaka, Y; Ohnishi, M; Nakamori, C; Araki, M; Niwa, T; Nishimura, M; Kaminaka, H; Nakagawa, T; Sato, Y; Ishiguro, S. 2010. Gateway binary vectors with the bialaphos resistance gene, bar, as a selection marker for plant transformation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 74(6): 1315-1319.

Nateshan, HM; Muniyappa, V; Swanson, MM; Harrison, BD. 1996. Host range, vector relations and serological relationships of cotton leaf curl virus from southern India. *Annals of Applied Biology* 128(2): 233-244.

Niehl, A; Heinlein, M. 2011. Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma* 248(1): 75-99.

Oparka, KJ; Cruz, SS. 2000. THE GREAT ESCAPE : Phloem Transport and Unloading of Macromolecules. *Cell* 51(December 2016): 323-347.

Oparka, KJ; Turgeon, R. 1999. Sieve Elements and Companion Cells—Traffic Control Centers of the Phloem. *The Plant Cell* 11: 739-750.

Palatnik, JF; Allen, E; Wu, X; Schommer, C; Schwab, R; Carrington, JC; Weigel, D. 2003. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425: 257-263.

Paliwal, RL. 2001. EL MAÍZ EN LOS TRÓPICOS: Mejoramiento y producción. *Fao* 2001: 392.

Pallas, V; García, JA. 2011. How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *Journal of General Virology* 92(12): 2691-2705.

Pallas, V; García, JA. 2016. Viral pathogenesis: still many missing pieces in the puzzle. *Current Opinion in Virology* 17: v-vii.

Pang, J; Zhu, Y; Li, Q; Liu, J; Tian, Y; Liu, Y; Wu, J. 2013. Development of Agrobacterium-mediated virus-induced gene silencing and performance evaluation of four marker genes in *Gossypium barbadense*. *PloS one* 8(9): e73211.

Patil, BL; Fauquet, CM. 2015. Light intensity and temperature affect systemic spread of silencing signal in transient agroinfiltration studies. *Molecular Plant Pathology* 16(5): 484-494.

Pazhouhandeh, M; Dieterle, M; Marrocco, K; Lechner, E; Berry, B; Brault, V; Hemmer, O; Kretsch, T; Richards, KE; Genschik, P; Ziegler-Graff, V. 2006. F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(6): 1994-1999.

Peter, KA; Gildow, F; Palukaitis, P; Gray, SM. 2009. The C terminus of the polerovirus p5 readthrough domain limits virus infection to the phloem. *Journal of virology* 83(11): 5419-29.

Pfeffer, S; Dunoyer, P; Heim, F; Richards, KE; Jonard, G; Ziegler-Graff, V. 2002. P0 of beet Western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *Journal of virology* 76(13): 6815-6824.

Prüfer, D; Wipf-Scheibel, C; Richards, K; Guillely, H; Lecoq, H; Jonard, G. 1995. Synthesis of a full-length infectious cDNA clone of cucurbit aphid-borne yellows virus and its use in gene exchange experiments with structural proteins from other luteoviruses. *Virology* 214(1): 150-8.

Pruss, GJ; Nester, EW; Vance, V. 2008. Infiltration with *Agrobacterium tumefaciens* Induces Host Defense and Development-Dependent Responses in the Infiltrated Zone. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21(12): 1528-1538.

- Pumplin, N; Voinnet, O. 2013. RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature reviews. Microbiology* 11(11): 745-60.
- Pupim, O; Schuster, I; Pinto, RB; Pires, E; Belot, JL; Silvie, P; Chitarra, LG; Hoffmann, LV; Barroso, P. 2008. Inheritance of resistance to cotton blue disease. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 43(5): 661-665.
- Reinbold, C; Herrbach, E; Brault, V. 2003. Posterior midgut and hindgut are both sites of acquisition of Cucurbit aphid-borne yellows virus in *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. *Journal of General Virology* 84(12): 3473-3484.
- Reinbold, C; Lacombe, S; Ziegler-Graff, V; Scheidecker, D; Wiss, L; Beuve, M; Carole, C; Brault, V. 2012. Closely related poleroviruses depend on distinct translation initiation factors to infect *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26(2): 120926072258005.
- Rodriguez-Medina, C; Boissinot, S; Chapuis, S; Gereige, D; Rastegar, M; Erdinger, M; Revers, F; Ziegler-Graff, V; Brault, V. 2015. A protein kinase binds the C-terminal domain of the readthrough protein of Turnip yellows virus and regulates virus accumulation. *Virology* 486: 44-53.
- Romanel, E; Silva, TF; Corrêa, RL; Farinelli, L; Hawkins, JS; Schrago, CEG; Vaslin, MFS. 2012. Global alteration of microRNAs and transposon-derived small RNAs in cotton (*Gossypium hirsutum*) during Cotton leafroll dwarf polerovirus (CLRDV) infection. *Plant Molecular Biology* 80(4-5): 443-460.
- Screening of cotton germplasm for «blue disease» under natural field infestation. (2003, Cape Town, South Africa). 2003. Ed. Royo, O; Erazzu, L; Bonacic Kresic, I; Poisson, J; Montenegro, A. Cape Town, South Africa, Agricultural Research Council-Institute for Industrial Crops. 305-316 p.
- Rubio-Somoza, I; Weigel, D. 2011. MicroRNA networks and developmental plasticity in plants. *Trends in Plant Science* 16(5): 258-264.
- Ruiz; Voinnet; Baulcombe. 1998. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *The Plant cell* 10(6): 937-46.
- Rummel, RD; Arnold, MD; Slosser, JE; Neece, KC; Pinchak, WE. 1995. Cultural factors influencing the abundance of *Aphis gossypii* Glover in Texas high plains cotton. *Southwestern Entomologist* 20(4): 395-406.
- Sadowy, E; Pluta, K; Gronenborn, B; Hulanicka, D. 1998. Infectious transcripts from cloned cDNA of potato leafroll luteovirus. *Acta biochimica Polonica* 45(2): 611-9.
- Sambrook, J; Fritsch, EF; Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Molecular cloning: a laboratory manual. no.Ed. 2.
- Pragas do Algodoeiro. In: *Mato Grosso Liderança e Competitividade (1999, s.l.)*. 1999. Ed. Santos, WJ. s.l.,
- Schmidt, JH; Wells, R. 1986. Recovery of soluble proteins from glanded cotton tissues with amines. *Analytical biochemistry* 154(1): 244-9.
- Schmitz, J; Stussi-Garaud, C; Tacke, E; Prüfer, D; Rohde, W; Rohfritsch, O. 1997. In Situ Localization of the Putative Movement Protein (pr17) from Potato Leafroll Luteovirus (PLRV) in Infected and Transgenic Potato Plants. *Virology* 235(2): 311-322.
- Schott, G; Mari-Ordóñez, A; Himber, C; Alioua, A; Voinnet, O; Dunoyer, P. 2012. Differential effects of viral silencing suppressors on siRNA and miRNA loading support the existence of two distinct cellular pools of ARGONAUTE1. *The EMBO Journal* 31(11): 2553-2565.
- Schulman, BA; Carrano, AC; Jeffrey, PD; Bowen, Z; Kinnucan, ER; Finnin, MS; Elledge, SJ; Harper, JW; Pagano, M; Pavletich, NP. 2000. Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. *Nature* 408(6810): 381-6.
- Senshu, H; Yamaji, Y; Minato, N; Shiraishi, T; Maejima, K; Hashimoto, M; Miura, C; Neriya, Y; Namba, S. 2011. A dual strategy for the suppression of host antiviral silencing: two distinct suppressors for viral replication and viral movement encoded by potato virus M. *J Virol* 85(19): 10269-10278.
- Shen, W-H; Parmentier, Y; Hellmann, H; Lechner, E; Dong, A; Masson, J; Granier, F; Lepiniec, L; Estelle, M; Genschik, P. 2002. Null Mutation of *AtCUL1* Causes Arrest in Early Embryogenesis in *Arabidopsis*. *Molecular Biology of the Cell* 13(6): 1916-1928.
- Silva, TF; Corrêa, RL; Castilho, Y; Silvie, P; Bélot, J-L; Vaslin, MFS. 2008. Widespread distribution and a new recombinant species of Brazilian virus associated with cotton blue disease. *Virology Journal* 5: 123.
- Silva, TF; Romanel, EAC; Andrade, RRS; Farinelli, L; Østerås, M; Deluen, C; Corrêa, RL; Schrago, CEG; Vaslin, MFS. 2011. Profile of small interfering RNAs from cotton plants infected with the polerovirus Cotton leafroll dwarf virus. *BMC molecular biology* 12(1): 40.
- Smirnova, E; Firth, AE; Miller, WA; Scheidecker, D; Brault, V; Reinbold, C; Rakotondrafara, AM; Chung, BY-W; Ziegler-Graff, V. 2015. Discovery of a Small Non-AUG-Initiated ORF in Poleroviruses and Luteoviruses That Is Required for Long-Distance Movement. *PLoS pathogens* 11(5): e1004868.
- Smith, H; Barker, H. 1999. *The Luteoviridae*. Eds. H Smith; H Barker. Wallingford, CABI Publishing.
- Sokolova, M; Prüfer, D; Tacke, E; Rohde, W. 1997. The potato leafroll virus 17K movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of protein kinase C. *FEBS Letters* 400(2): 201-205.
- Stadler, R; Lauterbach, C; Sauer, N. 2005. Cell-to-cell movement of green fluorescent protein reveals post-phloem transport in the outer integument and identifies symplastic domains in *Arabidopsis* seeds and embryos. *Plant physiology* 139(2): 701-12.
- Stephan, D; Maiss, E. 2006. Biological properties of Beet mild yellowing virus derived from a full-length cDNA clone. *Journal of General Virology* 87(2): 445-449.
- Stevens, M; Viganó, F. 2007. Production of a full-length infectious GFP-tagged cDNA clone of Beet mild yellowing virus for the study of plant-polerovirus interactions. *Virus Genes* 34(2): 215-221.
- Szittyá, G; Silhavy, D; Molnár, A; Havelda, Z; Lovas, A; Lakatos, L; Bánfalvi, Z; Burgyán, J. 2003. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *The EMBO journal* 22(3): 633-40.
- Tacke, E; Schmitz, J; Prüfer, D; Rohde, W. 1993. Mutational analysis of the nucleic acid-binding 17 kDa phosphoprotein of potato leafroll luteovirus identifies an amphipathic alpha-helix as the domain for protein/protein interactions. *Virology* 197(1): 274-282.

- Takimoto, JK; Queiroz-Voltan, RB; De Souza-Dias, JAC; Edvaldo, CIA. 2009. Alterações anatômicas em algodoeiro infectado pelo vírus da doença azul. *Bragantia* 68(1): 109-116.
- Tan, X; Calderon-Villalobos, LI a; Sharon, M; Zheng, C; Robinson, C V; Estelle, M; Zheng, N. 2007. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 446(7136): 640-5.
- Turgeon, R; Wolf, S. 2009. Phloem Transport: Cellular Pathways and Molecular Trafficking. *Annual Review of Plant Biology* 60(1): 207-221.
- Ueki, S; Citovsky, V. 2011. To Gate, or Not to Gate: Regulatory Mechanisms for Intercellular Protein Transport and Virus Movement in Plants. *Molecular Plant* 4(5): 782-793.
- Várallyay, E; Válóczy, A; Agyi, A; Burgyán, J; Havelda, Z. 2010. Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *The EMBO journal* 29(20): 3507-19.
- Vaucheret, H. 2006. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: Mechanisms and regulations. *Genes and Development* 20(7): 759-771.
- _____. 2008. Plant ARGONAUTES. *Trends in Plant Science* 13(7): 350-358.
- Vogler, H; Akbergenov, R; Shivaprasad, P V.; Dang, V; Fasler, M; Kwon, M-O; Zhanybekova, S; Hohn, T; Heinlein, M. 2007. Modification of Small RNAs Associated with Suppression of RNA Silencing by Tobamovirus Replicase Protein. *Journal of Virology* 81(19): 10379-10388.
- Wang, JY; Chay, C; Gildow, FE; Gray, SM. 1995. Readthrough Protein Associated with Virions of Barley Yellow Dwarf Luteovirus and Its Potential Role in Regulating the Efficiency of Aphid Transmission. *Virology* 206(2): 954-962.
- Wang, K Der; Empleo, R; Nguyen, TT V; Moffett, P; Sacco, MA. 2015. Elicitation of hypersensitive responses in *Nicotiana glutinosa* by the suppressor of RNA silencing protein P0 from poleroviruses. *Molecular Plant Pathology* 16(5): 435-448.
- Wang, K; Wang, Z; Li, F; Ye, W; Wang, J; Song, G; Yue, Z; Cong, L; Shang, H; Zhu, S; Zou, C; Li, Q; Yuan, Y; Lu, C; Wei, H; Gou, C; Zheng, Z; Yin, Y; Zhang, X; Liu, K; Wang, B; Song, C; Shi, N; Kohel, RJ; Percy, RG; Yu, JZ; Zhu, Y-X; Wang, J; Yu, S. 2012. The draft genome of a diploid cotton *Gossypium raimondii*. *Nature Genetics* 44(10): 1098-1103.
- van der Wilk, F; Houterman, P; Molthoff, J; Hans, F; Dekker, B; van den Heuvel, J; Huttinga, H; Goldbach, R. 1997. Expression of the potato leafroll virus ORF0 induces viral-disease-like symptoms in transgenic potato plants. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 10(2): 153-9.
- Wroblewski, T; Tomczak, A; Michelmore, R. 2005. Optimization of Agrobacterium-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and Arabidopsis. *Plant Biotechnology Journal* 3(2): 259-273.
- Xia, Z; Cao, R; Sun, K; Zhang, H. 2012. The movement protein of barley yellow dwarf virus-GAV self-interacts and forms homodimers in vitro and in vivo. *Archives of Virology* 157(7): 1233-1239.
- Yoon, JY; Choi, SK; Palukaitis, P; Gray, SM. 2011. Agrobacterium-mediated infection of whole plants by yellow dwarf viruses. *Virus Research* 160(1-2): 428-434.
- Zambryski, P. 1988. Basic Processes Underlying Agrobacterium-Mediated DNA Transfer to Plant Cells. *Annual Review of Genetics* 22(1): 1-30.
- Zhang, C; Wu, Z; Li, Y; Wu, J. 2015. Biogenesis, function, and applications of virus-derived small RNAs in plants. *Frontiers in Microbiology* 6(NOV): 1-12.
- Zhang, T; Hu, Y; Jiang, W; Fang, L; Guan, X; Chen, J; Zhang, J; Saski, CA; Scheffler, BE; Stelly, DM; Hulse-Kemp, AM; Wan, Q; Liu, B; Liu, C; Wang, S; Pan, M; Wang, Y; Wang, D; Ye, W; Chang, L; Zhang, W; Song, Q; Kirkbride, RC; Chen, X; Dennis, E; Llewellyn, DJ; Peterson, DG; Thaxton, P; Jones, DC; Wang, Q; Xu, X; Zhang, H; Wu, H; Zhou, L; Mei, G; Chen, S; Tian, Y; Xiang, D; Li, X; Ding, J; Zuo, Q; Tao, L; Liu, Y; Li, J; Lin, Y; Hui, Y; Cao, Z; Cai, C; Zhu, X; Jiang, Z; Zhou, B; Guo, W; Li, R; Chen, ZJ. 2015. Sequencing of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. acc. TM-1) provides a resource for fiber improvement. *Nature biotechnology* 33(5): 531-537.
- Zhang, X; Yuan, Y-R; Pei, Y; Lin, S-S; Tuschl, T; Patel, DJ; Chua, N-H. 2006. Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes & Development* 20(23): 3255-3268.
- Zhuo, T; Li, Y-Y; Xiang, H-Y; Wu, Z-Y; Wang, X-B; Wang, Y; Zhang, Y-L; Li, D-W; Yu, J-L; Han, C-G. 2014. Amino acid sequence motifs essential for P0-mediated suppression of RNA silencing in an isolate of potato leafroll virus from Inner Mongolia. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 27(6): 515-27.
- Ziegler-Graff, V; Brault, V; Mutterer, JD; Simonis, M-T; Herrbach, E; Guilley, H; Richards, KE; Jonard, G. 1996. The Coat Protein of Beet Western Yellows Luteovirus is Essential for Systemic Infection but the Viral Gene Products P29 and P19 are Dispensable for Systemic Infection and Aphid Transmission. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9(6): 501-510.
- Züst, T; Agrawal, AA. 2016. Mechanisms and evolution of plant resistance to aphids. *Nature Plants* 2(1): 1-9.
- Agrofoglio, YC. 2017. Caracterización molecular del virus asociado a la enfermedad azul atípica del algodón y estudio del quiebre de la resistencia. s.l., Universidad de Buenos Aires.
- Agrofoglio, YC; Delfosse, C; Casse, F; Hopp, HE; Kresic, B; Distéfano, AJ. 2017. Identification of a New Cotton Disease Caused by an Atypical Cotton Leafroll Dwarf Virus in Argentina. *Phytopathology* 107(3): 1-8.
- Alcaide-Loridan, C; Jupin, I. 2012. Ubiquitin and Plant Viruses, Let's Play Together! *Plant Physiology* 160: 72-82.
- Ali, M; Hameed, S; Tahir, M. 2014. Luteovirus: insights into pathogenicity. *Archives of Virology* 159(11): 2853-2860.
- Almasi, R; Miller, WA; Ziegler-Graff, V. 2015. Mild and severe cereal yellow dwarf viruses differ in silencing suppressor efficiency of the P0 protein. *Virus Research* 208(January): 199-206.
- Alvarado, VY; Scholthof, HB. 2012. AGO2: A New Argonaute Compromising Plant Virus Accumulation. *Frontiers in Plant Science* 2: 112.

- Amin, I; Hussain, K; Akbergenov, R; Yadav, JS; Qazi, J; Mansoor, S; Hohn, T; Fauquet, CM; Briddon, RW. 2011. Suppressors of RNA silencing encoded by the components of the cotton leaf curl begomovirus-betasatellite complex. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 24(8): 973-983.
- Azevedo, J; Garcia, D; Pontier, D; Ohnesorge, S; Yu, A; Garcia, S; Braun, L; Bergdoll, M; Hakimi, MA; Lagrange, T; Voinnet, O. 2010. Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes & Development* 24(9): 904-915.
- Barampuram, S; Zhang, ZJ. 2011. Recent advances in plant transformation. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 701: 1-35.
- Bartel, DP. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116(2): 281-97.
- Baulcombe, DC; Chapman, S; Cruz, S. 1995. Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *The Plant Journal* 7(6): 1045-1053.
- Baumberger, N; Tsai, CH; Lie, M; Havecker, E; Baulcombe, DC. 2007. The Polerovirus Silencing Suppressor P0 Targets ARGONAUTE Proteins for Degradation. *Current Biology* 17(18): 1609-1614.
- Bazzini, AA; Hopp, HE; Beachy, RN; Asurmendi, S. 2007. Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(29): 12157-12162.
- van Bel, AJE. 2003. Transport Phloem: Low Profile, High Impact. *Plant Physiol.* 131(4): 1509-1510.
- Boissinot, S; Erdinger, M; Monsion, B; Ziegler-Graff, V; Brault, V. 2014. Both structural and non-structural forms of the readthrough protein of cucurbit aphid-borne yellows virus are essential for efficient systemic infection of plants. *PLoS ONE* 9(4): e93448.
- Enfermedad azul del Algodonero en la República Argentina (1997, P. R. Sáenz Peña, Chaco, Argentina). 1997. Ed. Bonacic Kresic, I. P. R. Sáenz Peña, Chaco, Argentina,
- Bonacic Kresic, I. 2006. Algodón. Manual de campo. 2006.
- den Boon, JA; Ahlquist, P. 2010. Organelle-Like Membrane Compartmentalization of Positive-Strand RNA Virus Replication Factories. *Annual Review of Microbiology* 64(1): 241-256.
- Bortolamiol, D; Pazhouhandeh, M; Marrocco, K; Genschik, P; Ronique Ziegler-Graff, V. 2007. The Polerovirus F Box Protein P0 Targets ARGONAUTE1 to Suppress RNA Silencing. *Current Biology* 17: 1615-1621.
- Bortolamiol, D; Pazhouhandeh, M; Ziegler-Graff, V. 2008. Viral suppression of RNA silencing by destabilisation of ARGONAUTE 1. *Plant signaling & behavior* 3(9): 657-9.
- Brault, V; Bergdoll, M; Mutterer, J; Prasad, V; Pfeffer, S; Erdinger, M; Richards, KE; Ziegler-Graff, V. 2003. Effects of point mutations in the major capsid protein of beet western yellows virus on capsid formation, virus accumulation, and aphid transmission. *Journal of virology* 77(5): 3247-56.
- Brault, V; van den Heuvel, JF; Verbeek, M; Ziegler-Graff, V; Reutenauer, A; Herrbach, E; Garaud, JC; Guilley, H; Richards, K; Jonard, G. 1995. Aphid transmission of beet western yellows luteovirus requires the minor capsid read-through protein P74. *The EMBO Journal* 14(4): 650-9.
- Brigneti, G; Voinnet, O; Li, WX; Ji, LH; Ding, SW; Baulcombe, DC. 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *The EMBO journal* 17(22): 6739-46.
- Brown, CM; Dinesh-Kumar, SP; Miller, WA. 1996. Local and distant sequences are required for efficient readthrough of the barley yellow dwarf virus PAV coat protein gene stop codon. *Journal of virology* 70(9): 5884-92.
- Brown, JK. 1992. *Virus Diseases of Cotton*. Ed. RJ Hillocks. Cotton Dis Oxon, United Kingdom, Commonwealth Agricultural Bureaux International.
- Bruyère, A; Brault, V; Ziegler-Graff, V; Simonis, M-T; van den Heuvel, JFJM; Richards, K; Guilley, H; Jonard, G; Herrbach, E. 1997. Effects of mutations in the beet western yellows virus readthrough protein on its expression and packaging and on virus accumulation, symptoms, and aphid transmission. *Virology* 230(230): 323-334.
- «Mal de Misiones» nueva enfermedad del algodón de probable origen vírico. (1986, Neuquen). 1986. Ed. Campagnac, NA; Bonacic Kresic, M; Poisson, J. Neuquen, U.N. del Comahue. 503-511 p.
- Cardozo, T; Pagano, M. 2004. The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Bio* 5(9): 739-51.
- Cascardo, RS; Arantes, ILG; Silva, TF; Sachetto-Martins, G; Vaslin, MFS; Corrêa, RL. 2015. Function and diversity of P0 proteins among cotton leafroll dwarf virus isolates. *Virology journal* 12(1): 123.
- Casse, MF. 2016. Estudio del uso potencial de un clon infectivo del Cotton leafroll dwarf virus (CLRDV) como método alternativo al sistema tradicional de infección con áfidos para la transmisión de la enfermedad azul del algodón. s.l., Universidad Nacional de Nordeste.
- Cauquil, J. 1977. Studies on a cotton disease of viral origin: blue disease. *Coton et Fibres Tropicales* 32(3): 259-278.
- Cauquil, J; Follin, JC. 1983. Presumed virus and mycoplasma-like organism diseases in subsaharan Africa and in the rest of the world. *Coton et Fibres Tropicales* 38(4): 293-317.
- Cauquil, J; Vaissayre, M. 1971. La «maladie bleue» du cotonnier en Afrique : transmission de cotonnier à cotonnier par *Aphis gossypii* Glover. *Coton et Fibres Tropicales* 26(4): 463-466.
- Chen, S; Jiang, G; Wu, J; Liu, Y; Qian, Y; Zhou, X. 2016. Characterization of a novel polerovirus infecting maize in China. *Viruses* 8(5).
- Chiba, M; Reed, JC; Prokhnovsky, AI; Chapman, EJ; Mawassi, M; Koonin, E V.; Carrington, JC; Dolja, V V. 2006. Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replicon. *Virology* 346(1): 7-14.
- Citovsky, V. 1993. Probing Plasmodesmal Transport with Plant Viruses. *Plant physiology* 102(4): 1071-1076.
- Corrêa, RL; Silva, TF; Simões-Araújo, JL; Barroso, PA V; Vidal, MS; Vaslin, MFS. 2005. Molecular characterization of a virus from the family Luteoviridae associated with cotton blue disease. *Archives of Virology* 150(7): 1357-1367.
- Csorba, T; Kontra, L; Burgy??n, J. 2015. Viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology*

479-480: 85-103.

Csorba, T; Kontra, L; Burgyán, J. 2015. viral silencing suppressors_ Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology* 479(480): 85-103.

Csorba, T; Lóza, R; Hutvágner, G; Burgyán, J. 2010. Polorovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1. *Plant Journal* 62(3): 463-472.

D'Arcy, CJ; Domier, LL. 2000. Barley yellow dwarf. *The Plant Health Instructor* 2000.

Delfosse, VC; Agrofoglio, YC; Casse, MF; Hopp, E; Bonacic Kresic, I; Distéfano, AJ. 2015. Nuevo método para la evaluación del comportamiento sanitario de variedades de algodón frente a enfermedad azul. *Ciencia y Tecnología de los Cultivos Industriales* 8.

Delfosse, VC; Agrofoglio, YC; Casse, MF; Kresic, IB; Hopp, HE; Ziegler-Graff, V; Distéfano, AJ. 2014. The P0 protein encoded by cotton leafroll dwarf virus (CLRDV) inhibits local but not systemic RNA silencing. *Virus research* 180: 70-5.

Delfosse, VC; Casse, MF; Agrofoglio, YC; Kresic, IB; Hopp, HE; Ziegler-Graff, V; Distéfano, AJ. 2013. Agroinoculation of a full-length cDNA clone of cotton leafroll dwarf virus (CLRDV) results in systemic infection in cotton and the model plant *Nicotiana benthamiana*. *Virus Research* 175(1): 64-70.

Derrien, B; Baumberger, N; Schepetilnikov, M; Viotti, C; De Cillia, J; Ziegler-Graff, V; Isono, E; Schumacher, K; Genschik, P. 2012. Degradation of the antiviral component ARGONAUTE1 by the autophagy pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 15942-15946.

Derrien, B; Genschik, P. 2014. When RNA and protein degradation pathways meet. *Front Plant Sci* 5(April): 161.

Diaz-pendon, JA; Li, F; Li, W-X; Ding, S-W. 2007. Suppression of Antiviral Silencing by Cucumber Mosaic Virus 2b Protein in *Arabidopsis* Is Associated with Drastically Reduced Accumulation of Three Classes of Viral Small Interfering RNAs. *The Plant cell* 19(June): 2053-2063.

Distéfano, AJ; Kresic, IB; Hopp, HE. 2010. The complete genome sequence of a virus associated with cotton blue disease, cotton leafroll dwarf virus, confirms that it is a new member of the genus Polorovirus. *Archives of Virology* 155(11): 1849-1854.

Domier, LL. 2011. Luteovirus. *The Springer Index of Viruses*. New York, NY, Springer New York, p.821-826.

Doumayrou, J; Sheber, M; Bonning, BC; Allen Miller, W. 2016. Role of pea enation mosaic virus coat protein in the host plant and aphid vector. *Viruses* 8(11): 312.

Earley, K; Smith, M; Weber, R; Gregory, B; Poethig, R. 2010. An endogenous F-box protein regulates ARGONAUTE1 in *Arabidopsis thaliana*. *Silence* 1(1): 15.

Ebert, TA; Cartwright, B. 1997. Biology and ecology of *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). *Southwestern Entomologist* 22(1): 116-153.

Ebhardt, HA; Thi, EP; Wang, M-B; Unrau, PJ. 2005. Extensive 3' modification of plant small RNAs is modulated by helper component-proteinase expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(38): 13398-403.

Ellis, MH; Stiller, WN; Phongkham, T; Tate, WA; Gillespie, VJ; Gapare, WJ; Zhu, Q-H; Llewellyn, DJ; Wilson, IW. 2016. Molecular mapping of bunchy top disease resistance in *Gossypium hirsutum* L. *Euphytica* 210(1): 135-142.

Endres, MW; Gregory, BD; Gao, Z; Foreman, AW; Mlotshwa, S; Ge, X; Pruss, GJ; Ecker, JR; Bowman, LH; Vance, V. 2010. Two Plant Viral Suppressors of Silencing Require the Ethylene-Inducible Host Transcription Factor RAV2 to Block RNA Silencing. *PLoS Pathogens* 6(1): e1000729.

Fang, DD; Xiao, J; Canci, PC; Cantrell, RG. 2010. A new SNP haplotype associated with blue disease resistance gene in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 120(5): 943-953.

Franco-Lara, LF; McGeachy, KD; Commandeur, U; Martin, RR; Mayo, MA; Barker, H. 1999. Transformation of tobacco and potato with cDNA encoding the full-length genome of Potato leafroll virus : evidence for a novel virus distribution and host effects on virus multiplication. *Journal of General Virology* 80: 2813-2822.

Frohman, MA; Dush, MK; Martin, GR. 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(23): 8998-9002.

Fryxell, P. 1984. Taxonomy and germplasm resources. In Kohel R Madison, American Society of Agronomy.

Fusaro, AF; Correa, RL; Nakasugi, K; Jackson, C; Kawchuk, L; Vaslin, MFS; Waterhouse, PM. 2012. The Enamovirus P0 protein is a silencing suppressor which inhibits local and systemic RNA silencing through AGO1 degradation. *Virology* 426(2): 178-187.

Galbieri, R; Cia, E; Fuzatto, MG; Franzon, RC; Belot, JL; Dias, J a. CDS. 2010. Transmissibilidade e reação de genótipos de algodoeiro a uma forma atípica do vírus do mosaico das nervuras. *Tropical Plant Pathology* 35(2): 88-95.

Gallo, D; Nakano, O; Wiendel, FM; Silveira Neto, S; Carvalho, RPL; Batista, GC; Berti Filho, E; Para, JRP; Zucchi, RA; Alves, SB; Vendramin, JD. 1988. Manual de entomologia agrícola. 2da ed. São Paulo, Agronômica Ceres, 649.

Gao, X; Shan, L. 2013. Functional genomic analysis of cotton genes with agrobacterium-mediated virus-induced gene silencing. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 975: 157-65.

Glick, D; Barth, S; Macleod, KF. 2010. Autophagy : cellular and molecular mechanisms. *Journal of Pathology The* 221(1): 3-12.

Goodin, MM; Zaitlin, D; Naidu, RA; Lommel, SA. 2008. *Nicotiana benthamiana* : Its History and Future as a Model for Plant–Pathogen Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21(8): 1015-1026.

Goto, K; Kobori, T; Kosaka, Y; Natsuaki, T; Masuta, C. 2007. Characterization of Silencing Suppressor 2b of Cucumber Mosaic Virus Based on Examination of its Small RNA-Binding Abilities. *Plant and Cell Physiology* 48(7): 1050-1060.

Gray, S; Gildow, FE. 2003. L UTEOVIRUS -A PHID I NTERACTIONS. *Annual Review of Phytopathology* 41(1): 539-566.

Han, YH; Xiang, HY; Wang, Q; Li, YY; Wu, WQ; Han, CG; Li, DW; Yu, JL. 2010. Ring structure amino acids affect the suppressor activity of melon aphid-borne yellows virus P0 protein. *Virology* 406(1): 21-27.

- Haupt, S; Stroganova, T; Ryabov, E; Kim, SH; Fraser, G; Duncan, G; Mayo, MA; Barker, H; Taliansky, M. 2005. Nucleolar localization of potato leafroll virus capsid proteins. *Journal of General Virology* 86(10): 2891-2896.
- Hipper, C; Brault, V; Ziegler-Graff, V; Revers, F. 2013. Viral and cellular factors involved in Phloem transport of plant viruses. *Frontiers in plant science* 4(May): 154.
- Ho, SN; Hunt, HD; Horton, RM; Pullen, JK; Pease, LR. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77(1): 51-59.
- Hofius, D; Herbers, K; Melzer, M; Omid, A; Tacke, E; Wolf, S; Sonnewald, U. 2001. Evidence for expression level-dependent modulation of carbohydrate status and viral resistance by the potato leafroll virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Journal* 28(5): 529-543.
- Hutchinson, JB; Silow, RA; Stephens, SG. 1947. The Evolution of *Gossypium* and the Differentiation of the Cultivated Cottons
- Incarbone, M; Dunoyer, P. 2013. RNA silencing and its suppression: Novel insights from in planta analyses. *Trends in Plant Science* 18(7): 382-392.
- Innes, NL. 1983. Bacterial Blight of Cotton. *Biological Reviews* 58(1): 157-176.
- Jagga, Z; Gupta, D. 2014. Supervised learning classification models for prediction of plant virus encoded RNA silencing suppressors. *PLoS ONE* 9(5): 1-9.
- Jamous, RM; Boonrod, K; Fuellgrabe, MW; Ali-Shtayeh, MS; Krczal, G; Wassenegger, M. 2011. The helper component-proteinase of the Zucchini yellow mosaic virus inhibits the Hua Enhancer 1 methyltransferase activity in vitro. *Journal of General Virology* 92(9): 2222-2226.
- Kamer, G; Argos, P. 1984. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic acids research* 12(18): 7269-82.
- Karimi, M; Inzé, D; Depicker, A. 2002. GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* 7(5): 193-195.
- Kim, MJ; Baek, K; Park, CM. 2009. Optimization of conditions for transient *Agrobacterium*-mediated gene expression assays in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports* 28(8): 1159-1167.
- Kirkin, V; McEwan, DG; Novak, I; Dikic, I. 2009. A Role for Ubiquitin in Selective Autophagy. *Molecular Cell* 34(3): 259-269.
- Klein, E; Brault, V; Klein, D; Weyens, G; Lefèbvre, M; Ziegler-Graff, V; Gilmer, D. 2014. Divergence of host range and biological properties between natural isolate and full-length infectious cDNA clone of the Beet mild yellowing virus2ITB. *Molecular Plant Pathology* 15(1): 22-30.
- Kobayashi, H; Tomari, Y. 2016. RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1859(1): 71-81.
- Kozłowska-Makulska, A; Guillely, H; Szyndel, MS; Beuve, M; Lemaire, O; Herrbach, E; Bouzoubaa, S. 2010. P0 proteins of European beet-infecting poleroviruses display variable RNA silencing suppression activity. *Journal of General Virology* 91(4): 1082-1091.
- Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lakatos, L; Csorba, T; Pantaleo, V; Chapman, EJ; Carrington, JC; Liu, Y-P; Dolja, V V; Calvino, LF; López-Moya, JJ; Burguán, J. 2006. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *The EMBO journal* 25(12): 2768-2780.
- Leiser, RM; Ziegler-Graff, V; Reutenauer, A; Herrbach, E; Lemaire, O; Guillely, H; Richards, K; Jonard, G. 1992. Agroinfection as an alternative to insects for infecting plants with beet western yellows luteovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89(19): 9136-9140.
- Informe del PIC n° 320.536. Caracterización del agente causal de la enfermedad azul del algodón en el área centro chaqueña (1994, s.l.). 1994. Ed. Lenardon, S. s.l.,
- Li, X; Halpin, C; Ryan, MD. 2007. A novel cleavage site within the potato leafroll virus P1 polyprotein. *Journal of General Virology* 88(5): 1620-1623.
- Liu, Z; Kearney, CM. 2010. An efficient Foxtail mosaic virus vector system with reduced environmental risk. *BMC Biotechnology* 10(1): 88.
- Llave, C. 2010. Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends in Plant Science* 15(12): 701-707.
- Lu, R; Folimonov, A; Shintaku, M; Li, W-X; Falk, BW; Dawson, WO; Ding, S-W. 2004. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(44): 15742-15747.
- Mallory, AC; Reinhart, BJ; Jones-Rhoades, MW; Tang, G; Zamore, PD; Barton, MK; Bartel, DP. 2004. MicroRNA control of *PHABULOSA* in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *The EMBO journal* 23(16): 3356-3364.
- Mandadi, KK; Scholthof, K-BG. 2013. Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease? *The Plant cell* 25(5): 1489-505.
- Mangwende, T; Wang, ML; Borth, W; Hu, J; Moore, PH; Mirkov, TE; Albert, HH. 2009. The P0 gene of Sugarcane yellow leaf virus encodes an RNA silencing suppressor with unique activities. *Virology* 384(1): 38-50.
- Mayo, MA; D'Arcy, CJ. 1999. Family Luteoviridae : a reclassification of luteoviruses. Eds. H Smith; H Barker. New York, NY, CABI Publishing, 15-22.
- Mayo, MA; Ziegler-Graff, V. 1996. Molecular biology of luteoviruses. *Advances in virus research* 46: 413-60.
- Meinke, DW; Cherry, JM; Dean, C; Rounsley, SD; Koornneef, M. 1998. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science (New York, N.Y.)* 282(5389): 662, 679-682.
- Michaeli, S; Galili, G; Genschik, P; Fernie, AR; Avin-Wittenberg, T. 2016. Autophagy in Plants - What's New on the Menu? *Trends in*

- Plant Science 21(2): 134-144.
- Michelotto, MD; Busoli, AC. 2007. Caracterizaç?o da transmiss?o do v?rus do mosaico-das-nervuras do algodoeiro pelo pulg?o aphid gossypii com relaç?o ?? persist?ncia e ao tempo necess?rio para inoculaç?o. *Bragantia* 66(3): 441-447.
- Miller, WA; Dinesh-Kumar, SP; Paul, CP. 1995. Luteovirus Gene Expression. *Critical Reviews in Plant Sciences* 14(3): 179-211.
- Doença azul do algodoeiro: novos aspectos a serem considerados no manejo. - Portal Embrapa (2008, s.l.). 2008. Ed. Miranda, JE; Suassuna, ND; Morello, C de L; Silva, MV de F; Freire, EC. s.l.,
- Mizushima, N; Levine, B; Cuervo, AM; Klionsky, DJ. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451(7182): 1069-75.
- Mondino, M; Peterlin, O; Elena, G. 2006. Algodón. Cultivos Industriales. Algodón. C Buenos Aires, Editorial Facultad de Agronomía.
- Morel, J-B; Godon, C; Mourrain, P; Béclin, C; Boutet, S; Feuerbach, F; Proux, F; Vaucheret, H. 2002. Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *The Plant cell* 14(3): 629-39.
- Mustafa, R; Shafiq, M; Mansoor, S; Briddon, RW; Scheffler, BE; Scheffler, J; Amin, I. 2016. Virus-Induced Gene Silencing in Cultivated Cotton (*Gossypium* spp.) Using Tobacco Rattle Virus. *Molecular Biotechnology* 58(1): 65-72.
- Mutterer, J; Ziegler-Graff, V; Richards, KE. 1999. Agroinfection as a means of transmitting luteoviruses to host plants for study of gene expression. Eds. H Smith; H Barker. New York, NY, CABI Publishing, 43-67.
- Nakamura, S; Mano, S; Tanaka, Y; Ohnishi, M; Nakamori, C; Araki, M; Niwa, T; Nishimura, M; Kaminaka, H; Nakagawa, T; Sato, Y; Ishiguro, S. 2010. Gateway binary vectors with the bialaphos resistance gene, bar, as a selection marker for plant transformation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 74(6): 1315-1319.
- Nateshan, HM; Muniyappa, V; Swanson, MM; Harrison, BD. 1996. Host range, vector relations and serological relationships of cotton leaf curl virus from southern India. *Annals of Applied Biology* 128(2): 233-244.
- Niehl, A; Heinlein, M. 2011. Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma* 248(1): 75-99.
- Oparka, KJ; Cruz, SS. 2000. THE G REAT ESCAPE : Phloem Transport and Unloading of Macromolecules. *Cell* 51(December 2016): 323-347.
- Oparka, KJ; Turgeon, R. 1999. Sieve Elements and Companion Cells—Traffic Control Centers of the Phloem. *The Plant Cell* 11: 739-750.
- Palatnik, JF; Allen, E; Wu, X; Schommer, C; Schwab, R; Carrington, JC; Weigel, D. 2003. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425: 257-263.
- Paliwal, RL. 2001. EL MAÍZ EN LOS TRÓPICOS: Mejoramiento y producción. *Fao* 2001: 392.
- Pallas, V; García, JA. 2011. How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *Journal of General Virology* 92(12): 2691-2705.
- Pallas, V; García, JA. 2016. Viral pathogenesis: still many missing pieces in the puzzle. *Current Opinion in Virology* 17: v-vii.
- Pang, J; Zhu, Y; Li, Q; Liu, J; Tian, Y; Liu, Y; Wu, J. 2013. Development of Agrobacterium-mediated virus-induced gene silencing and performance evaluation of four marker genes in *Gossypium barbadense*. *PloS one* 8(9): e73211.
- Patil, BL; Fauquet, CM. 2015. Light intensity and temperature affect systemic spread of silencing signal in transient agroinfiltration studies. *Molecular Plant Pathology* 16(5): 484-494.
- Pazhouhandeh, M; Dieterle, M; Marrocco, K; Lechner, E; Berry, B; Brault, V; Hemmer, O; Kretsch, T; Richards, KE; Genschik, P; Ziegler-Graff, V. 2006. F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(6): 1994-1999.
- Peter, KA; Gildow, F; Palukaitis, P; Gray, SM. 2009. The C terminus of the polerovirus p5 readthrough domain limits virus infection to the phloem. *Journal of virology* 83(11): 5419-29.
- Pfeffer, S; Dunoyer, P; Heim, F; Richards, KE; Jonard, G; Ziegler-Graff, V. 2002. P0 of beet Western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *Journal of virology* 76(13): 6815-6824.
- Prüfer, D; Wipf-Scheibel, C; Richards, K; Guilley, H; Lecoq, H; Jonard, G. 1995. Synthesis of a full-length infectious cDNA clone of cucurbit aphid-borne yellows virus and its use in gene exchange experiments with structural proteins from other luteoviruses. *Virology* 214(1): 150-8.
- Pruss, GJ; Nester, EW; Vance, V. 2008. Infiltration with *Agrobacterium tumefaciens* Induces Host Defense and Development-Dependent Responses in the Infiltrated Zone. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21(12): 1528-1538.
- Pumplin, N; Voynet, O. 2013. RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature reviews. Microbiology* 11(11): 745-60.
- Pupim, O; Schuster, I; Pinto, RB; Pires, E; Belot, JL; Silvie, P; Chitarra, LG; Hoffmann, LV; Barroso, P. 2008. Inheritance of resistance to cotton blue disease. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43(5): 661-665.
- Reinbold, C; Herrbach, E; Brault, V. 2003. Posterior midgut and hindgut are both sites of acquisition of Cucurbit aphid-borne yellows virus in *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. *Journal of General Virology* 84(12): 3473-3484.
- Reinbold, C; Lacombe, S; Ziegler-Graff, V; Scheidecker, D; Wiss, L; Beuve, M; Carole, C; Brault, V. 2012. Closely related poleroviruses depend on distinct translation initiation factors to infect *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26(2): 120926072258005.
- Rodriguez-Medina, C; Boissinot, S; Chapuis, S; Gereige, D; Rastegar, M; Erdinger, M; Revers, F; Ziegler-Graff, V; Brault, V. 2015. A protein kinase binds the C-terminal domain of the readthrough protein of Turnip yellows virus and regulates virus accumulation. *Virology* 486: 44-53.
- Romanel, E; Silva, TF; Corrêa, RL; Farinelli, L; Hawkins, JS; Schrago, CEG; Vaslin, MFS. 2012. Global alteration of microRNAs and transposon-derived small RNAs in cotton (*Gossypium hirsutum*) during Cotton leafroll dwarf polerovirus (CLRVD) infection. *Plant Molecular Biology* 80(4-5): 443-460.

- Screening of cotton germplasm for «blue disease» under natural field infestation. (2003, Cape Town, South Africa). 2003. Ed. Royo, O; Erazzu, L; Bonacic Kresic, I; Poisson, J; Montenegro, A. Cape Town, South Africa, Agricultural Research Council-Institute for Industrial Crops. 305-316 p.
- Rubio-Somoza, I; Weigel, D. 2011. MicroRNA networks and developmental plasticity in plants. *Trends in Plant Science* 16(5): 258-264.
- Ruiz; Voinnet; Baulcombe. 1998. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *The Plant cell* 10(6): 937-46.
- Rummel, RD; Arnold, MD; Slosser, JE; Neece, KC; Pinchak, WE. 1995. Cultural factors influencing the abundance of *Aphis gossypii* Glover in Texas high plains cotton. *Southwestern Entomologist* 20(4): 395-406.
- Sadowy, E; Pluta, K; Gronenborn, B; Hulanicka, D. 1998. Infectious transcripts from cloned cDNA of potato leafroll luteovirus. *Acta biochimica Polonica* 45(2): 611-9.
- Sambrook, J; Fritsch, EF; Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Molecular cloning: a laboratory manual. no.Ed. 2.
- Pragas do Algodoeiro. In: Mato Grosso Liderança e Competitividade (1999, s.l.). 1999. Ed. Santos, WJ. s.l.,
- Schmidt, JH; Wells, R. 1986. Recovery of soluble proteins from glanded cotton tissues with amines. *Analytical biochemistry* 154(1): 244-9.
- Schmitz, J; Stussi-Garaud, C; Tacke, E; Prüfer, D; Rohde, W; Rohfritsch, O. 1997. In Situ Localization of the Putative Movement Protein (pr17) from Potato Leafroll Luteovirus (PLRV) in Infected and Transgenic Potato Plants. *Virology* 235(2): 311-322.
- Schott, G; Mari-Ordóñez, A; Himber, C; Alioua, A; Voinnet, O; Dunoyer, P. 2012. Differential effects of viral silencing suppressors on siRNA and miRNA loading support the existence of two distinct cellular pools of ARGONAUTE1. *The EMBO Journal* 31(11): 2553-2565.
- Schulman, BA; Carrano, AC; Jeffrey, PD; Bowen, Z; Kinnucan, ER; Finnin, MS; Elledge, SJ; Harper, JW; Pagano, M; Pavletich, NP. 2000. Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. *Nature* 408(6810): 381-6.
- Senshu, H; Yamaji, Y; Minato, N; Shiraiishi, T; Maejima, K; Hashimoto, M; Miura, C; Neriya, Y; Namba, S. 2011. A dual strategy for the suppression of host antiviral silencing: two distinct suppressors for viral replication and viral movement encoded by potato virus M. *J Virol* 85(19): 10269-10278.
- Shen, W-H; Parmentier, Y; Hellmann, H; Lechner, E; Dong, A; Masson, J; Granier, F; Lepiniec, L; Estelle, M; Genschik, P. 2002. Null Mutation of *AtCUL1* Causes Arrest in Early Embryogenesis in *Arabidopsis*. *Molecular Biology of the Cell* 13(6): 1916-1928.
- Silva, TF; Corrêa, RL; Castilho, Y; Silvie, P; Bélot, J-L; Vaslin, MFS. 2008. Widespread distribution and a new recombinant species of Brazilian virus associated with cotton blue disease. *Virology Journal* 5: 123.
- Silva, TF; Romanel, EAC; Andrade, RRS; Farinelli, L; Østerås, M; Deluen, C; Corrêa, RL; Schrago, CEG; Vaslin, MFS. 2011. Profile of small interfering RNAs from cotton plants infected with the polerovirus Cotton leafroll dwarf virus. *BMC molecular biology* 12(1): 40.
- Smirnova, E; Firth, AE; Miller, WA; Scheidecker, D; Brault, V; Reinbold, C; Rakotondrafara, AM; Chung, BY-W; Ziegler-Graff, V. 2015. Discovery of a Small Non-AUG-Initiated ORF in Poloroviruses and Luteoviruses That Is Required for Long-Distance Movement. *PLoS pathogens* 11(5): e1004868.
- Smith, H; Barker, H. 1999. *The Luteoviridae*. Eds. H Smith; H Barker. Wallingford, CABI Publishing.
- Sokolova, M; Prüfer, D; Tacke, E; Rohde, W. 1997. The potato leafroll virus 17K movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of protein kinase C. *FEBS Letters* 400(2): 201-205.
- Stadler, R; Lauterbach, C; Sauer, N. 2005. Cell-to-cell movement of green fluorescent protein reveals post-phloem transport in the outer integument and identifies symplastic domains in *Arabidopsis* seeds and embryos. *Plant physiology* 139(2): 701-12.
- Stephan, D; Maiss, E. 2006. Biological properties of Beet mild yellowing virus derived from a full-length cDNA clone. *Journal of General Virology* 87(2): 445-449.
- Stevens, M; Viganó, F. 2007. Production of a full-length infectious GFP-tagged cDNA clone of Beet mild yellowing virus for the study of plant-polorovirus interactions. *Virus Genes* 34(2): 215-221.
- Szittyá, G; Silhavy, D; Molnár, A; Havelda, Z; Lovas, A; Lakatos, L; Bánfalvi, Z; Burgyán, J. 2003. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *The EMBO journal* 22(3): 633-40.
- Tacke, E; Schmitz, J; Prüfer, D; Rohde, W. 1993. Mutational analysis of the nucleic acid-binding 17 kDa phosphoprotein of potato leafroll luteovirus identifies an amphipathic alpha-helix as the domain for protein/protein interactions. *Virology* 197(1): 274-282.
- Takimoto, JK; Queiroz-Voltan, RB; De Souza-Dias, JAC; Edvaldo, CIA. 2009. Alterações anatômicas em algodoeiro infectado pelo vírus da doença azul. *Bragantia* 68(1): 109-116.
- Tan, X; Calderon-Villalobos, L; Sharon, M; Zheng, C; Robinson, C V; Estelle, M; Zheng, N. 2007. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 446(7136): 640-5.
- Turgeon, R; Wolf, S. 2009. Phloem Transport: Cellular Pathways and Molecular Trafficking. *Annual Review of Plant Biology* 60(1): 207-221.
- Ueki, S; Citovsky, V. 2011. To Gate, or Not to Gate: Regulatory Mechanisms for Intercellular Protein Transport and Virus Movement in Plants. *Molecular Plant* 4(5): 782-793.
- Várallyay, E; Várlóci, A; Agyi, A; Burgyán, J; Havelda, Z. 2010. Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *The EMBO journal* 29(20): 3507-19.
- Vaucheret, H. 2006. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: Mechanisms and regulations. *Genes and Development* 20(7): 759-771.
- _____. 2008. Plant ARGONAUTES. *Trends in Plant Science* 13(7): 350-358.
- Vogler, H; Akbergenov, R; Shivaprasad, P V.; Dang, V; Fasler, M; Kwon, M-O; Zhanybekova, S; Hohn, T; Heinlein, M. 2007.

- Modification of Small RNAs Associated with Suppression of RNA Silencing by Tobamovirus Replicase Protein. *Journal of Virology* 81(19): 10379-10388.
- Wang, JY; Chay, C; Gildow, FE; Gray, SM. 1995. Readthrough Protein Associated with Virions of Barley Yellow Dwarf Luteovirus and Its Potential Role in Regulating the Efficiency of Aphid Transmission. *Virology* 206(2): 954-962.
- Wang, K Der; Empleo, R; Nguyen, TT V; Moffett, P; Sacco, MA. 2015. Elicitation of hypersensitive responses in *Nicotiana glutinosa* by the suppressor of RNA silencing protein P0 from poleroviruses. *Molecular Plant Pathology* 16(5): 435-448.
- Wang, K; Wang, Z; Li, F; Ye, W; Wang, J; Song, G; Yue, Z; Cong, L; Shang, H; Zhu, S; Zou, C; Li, Q; Yuan, Y; Lu, C; Wei, H; Gou, C; Zheng, Z; Yin, Y; Zhang, X; Liu, K; Wang, B; Song, C; Shi, N; Kohel, RJ; Percy, RG; Yu, JZ; Zhu, Y-X; Wang, J; Yu, S. 2012. The draft genome of a diploid cotton *Gossypium raimondii*. *Nature Genetics* 44(10): 1098-1103.
- van der Wilk, F; Houterman, P; Molthoff, J; Hans, F; Dekker, B; van den Heuvel, J; Huttinga, H; Goldbach, R. 1997. Expression of the potato leafroll virus ORF0 induces viral-disease-like symptoms in transgenic potato plants. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 10(2): 153-9.
- Wroblewski, T; Tomczak, A; Michelmore, R. 2005. Optimization of Agrobacterium-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and Arabidopsis. *Plant Biotechnology Journal* 3(2): 259-273.
- Xia, Z; Cao, R; Sun, K; Zhang, H. 2012. The movement protein of barley yellow dwarf virus-GAV self-interacts and forms homodimers in vitro and in vivo. *Archives of Virology* 157(7): 1233-1239.
- Yoon, JY; Choi, SK; Palukaitis, P; Gray, SM. 2011. Agrobacterium-mediated infection of whole plants by yellow dwarf viruses. *Virus Research* 160(1-2): 428-434.
- Zambryski, P. 1988. Basic Processes Underlying Agrobacterium-Mediated DNA Transfer to Plant Cells. *Annual Review of Genetics* 22(1): 1-30.
- Zhang, C; Wu, Z; Li, Y; Wu, J. 2015. Biogenesis, function, and applications of virus-derived small RNAs in plants. *Frontiers in Microbiology* 6(NOV): 1-12.
- Zhang, T; Hu, Y; Jiang, W; Fang, L; Guan, X; Chen, J; Zhang, J; Saski, CA; Scheffler, BE; Stelly, DM; Hulse-Kemp, AM; Wan, Q; Liu, B; Liu, C; Wang, S; Pan, M; Wang, Y; Wang, D; Ye, W; Chang, L; Zhang, W; Song, Q; Kirkbride, RC; Chen, X; Dennis, E; Llewellyn, DJ; Peterson, DG; Thaxton, P; Jones, DC; Wang, Q; Xu, X; Zhang, H; Wu, H; Zhou, L; Mei, G; Chen, S; Tian, Y; Xiang, D; Li, X; Ding, J; Zuo, Q; Tao, L; Liu, Y; Li, J; Lin, Y; Hui, Y; Cao, Z; Cai, C; Zhu, X; Jiang, Z; Zhou, B; Guo, W; Li, R; Chen, ZJ. 2015. Sequencing of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. acc. TM-1) provides a resource for fiber improvement. *Nature biotechnology* 33(5): 531-537.
- Zhang, X; Yuan, Y-R; Pei, Y; Lin, S-S; Tuschl, T; Patel, DJ; Chua, N-H. 2006. Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes & Development* 20(23): 3255-3268.
- Zhuo, T; Li, Y-Y; Xiang, H-Y; Wu, Z-Y; Wang, X-B; Wang, Y; Zhang, Y-L; Li, D-W; Yu, J-L; Han, C-G. 2014. Amino acid sequence motifs essential for P0-mediated suppression of RNA silencing in an isolate of potato leafroll virus from Inner Mongolia. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 27(6): 515-27.
- Ziegler-Graff, V; Brault, V; Mutterer, JD; Simonis, M-T; Herrbach, E; Guilley, H; Richards, KE; Jonard, G. 1996. The Coat Protein of Beet Western Yellows Luteovirus is Essential for Systemic Infection but the Viral Gene Products P29 and P19 are Dispensable for Systemic Infection and Aphid Transmission. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9(6): 501-510.
- Züst, T; Agrawal, AA. 2016. Mechanisms and evolution of plant resistance to aphids. *Nature Plants* 2(1): 1-9.

ANEXO I. ALINEAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS P4

		H1	H2
CtRLV	MDSPREQQELNPWLLSTHLQGAHVD-VHGLSQSLWYKPHLEDEDEDAEDAALVTHEQW-		
TVDV	---M---EM-----VDHESLALADAHDRFGRSLWSPHGEHGELEED- MEAGTEEAV		
CLR DV	---M---EE-----DDHVGA--TG-VGKISQWLWWSKPLGTHNAEDDEEEVWIGQEDA-		
CLR DV-at	---M---EE-----DDHVGA--TG-VGKISQWLWWSKPLGTHNAEDDEEEVWIGQEDA-		
BMYV	---M---EE-----DDHV GK-HDA-LSALSQWLWWSKPLGQHNAADLDDDEEATTGQEE L-		
BChV	---M---EE-----DDHEGK-HDA-LSAISQWLWWSKPLGHNADLDDDEEVITGQEE L-		
TuYV	---M---EE-----DDHAGK-HDA-LSALSQWLWWSKPLGQHNAADLDDDEEVITGQEE L-		
CpCSV	---M---AE-----GGEIGVLFSG-LGAATQWLWWSKPLGSHSAEDDEEETVDALQEEA-		
CABYV	---M-----QGGEGEESA-LRGATAWLWSTPLGDHRAEDDNEETADALIEEA-		
CYDV-RPV	MAMV---RA-----DADRESLGEGLLQERSQWLWLSLPTAQPGAE-DADDQLVLGEEEL-		
PLRV	MSMVVYNNQ-----ECEGNPFAGALTEFSQWLWWSRPLGNPGAE-DAEEEAIAAQEEL-		
		***	* : : *
		H3	S1-4
		S2	S3
CtRLV	-EDPEAESVARSLC FRRTTSRAAPVESP SAR IYQTLLSAMDYSRHSTNIRKSQTCEYVT		
TVDV	MELEEQQATARLSSSTRTQSRIVPQAQSLSGRLYQRASRFQVEFSKPTMNIRSQWSTYAS		
CLR DV	-FLEDQELQARHLFSQKTVSREV PQDQSRSGRLYQIARHSAMEYSRPTMNIRSQWSTYSS		
CLR DV-at	-FLEDQELQAKHLFSQKTISREV PQDQSRSGRVYQIARHSVMESRPTMNIRSQWSTYSS		
BMYV	-FLPEEQVARHHSFSQKTISREVPAEQSRSGRVYQTARHSLMECSRPTMSIKSQWSTYSS		
BChV	-FLPEEQVARHLFSRKTISREVPAEQSRSGRVYQTAQHS LMECSRPTMSTKSRWSTYSS		
TuYV	-FLPEEQVARHLFSQKTISREVPAEQSRSGRVYQTARHSLMECSRPTMSIKSQWSTYSS		
CpCSV	-QLED-EGLARHLCFRKTTSRVVPQEVSRSGRVYQTAQLSALEYSRPTMNIRSQWSTYSS		
CABYV	-ELEE-EAQAKHLYFQRTISRVPQEVSPSGRLFQRAQHSALYSRPTMNIRSSWSTYSS		
CYDV-RPV	-QDLEEEAVARHSFSQRHHSRATPLEVSPSGRLYQSIHRSRMEYSRPTMNIRSQIVSYSS		
PLRV	-EFPEDEAQRHSLCQRRTTSWATPKEVSPSGRVYQTVRHSRMEYSRPTMIRSQASYSS		
		: : *	* * * : : *
		S4	
CtRLV	SRKPHQPPVARSLMSWTPVNSINFRAQSTNSGSSRMVKPLGALKRMLMGRSGTPLRRTNS		
TVDV	SVNPLPQRAPSLTSWTPTASFLXSNQPSVNSPSPKAGKQRSGLRKLMG-----		
CLR DV	SPRPLQHPPVPSLTKWIHTVNCQPYPPRLTNSESPRMGGSNLRRLSMDRNGMTPPRTNS		
CLR DV-at	SPRPLQHPPVPSLTKWIHTVNCQPYPPRLTNSESPRMGGSNLRRLSLDRNGMTPPRTSS		
BMYV	SPRPLPKIPVPSLTSWHTVNSVPFHQPLTSSGSQNPAGGHLQRLTSTGRGTMLPRTNS		
BChV	SPKPLPKVPVPSLTSWHTVNSTPFPQLSISGSRSPGGGRLQRLTSTGRNGMTPRPTNS		
TuYV	SPKPLPKIPVPSLTSWHTVNSTPFPQLSISGSPGKGRQLQRLTSTERNGTTLRPTNS		
CpCSV	SPRPLPPPQGRSLTSLIPTANPLRLGPTNSINLESPRMDKGLLQRLTESNGTPQTRTSS		
CABYV	SPRPLPPRVPSLMSWTPASLAPSNRPLINLESPRVDVGVPLSRSTGWNGMMQPKTSS		
CYDV-RPV	SARPLPQQPAPSLTSWTPIAKHLHSHQSSISSQSPKLVRGASQRR-----		
PLRV	SARPLPPPVPVPSLMSWTPIAKYHPSSPTSTSSKLRRAAPKLIKRG-----		
		* . *	* * . .
		▼▼	
CtRLV	GSSGREMEVIRR-----		
TVDV	-----		
CLR DV	ESYTKAMVPRR-----		
CLR DV-at	ESYTKAMVPRR-----		
BMYV	GSSTKAMVLR-----		
BChV	GSSTKAMVLR-----		
TuYV	GSSTKAMVLR-----		
CpCSV	GYFIKEMEAPP SRGHSGSPSSAKLRIRNR		
CABYV	RSSIKGMDL PRLRAASEPSSARSRTNR		
CYDV-RPV	-----		
PLRV	-----		

Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas P4. Sobre la secuencia se encuentran indicadas las estructuras secundarias de la proteína predichas. S corresponden a las estructuras de hoja β y H corresponden a las α-hélices, que dependiendo de la publicación tienen tres o cuatro (Mayo y Ziegler-Graff 1996, Xia y col., 2012). Con rombos negros están indicados los residuos de Serina (S) potencialmente fosforilables y con triángulos negros las Argininas del motivo rico en Arginina (R) del extremo carboxilo. Alineamiento realizado con el programa MUSCLE. Los números de acceso de GenBank son: CLR DV, NC_014545.1; CLR DVat, KF359946.1; CABYV, NC_003688.1; TuYV, NC_003743.1; BMYV, NC_003491.1; CYDV-RPV, NC_004751.1; PLRV, NC_001747.1; CpCSV, NC_008249.1; TVDV, NC_010732.1; CtRLV, NC_006265.1; BChV, NC_002766.1.

ANEXO II. ALINEAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS P0^{CLR DV} Y P0^{CLR DVAT}

```

1                               50
CLR DV  MLNLIICRIS SAALIRHASA SVSNNQVDFL FFLTQLPEYL TFCNSPELNP
CLR DVat MLNLIICRV S SAALVRRASP SVKSNQVDFL HFITQLQQYL TFCNSPDLNP

51                               100
CLR DV  FHDGFNESFL LRSLLFLLPF IIRGISSSRF ALPRGIRADF MALSRA TKYM
CLR DVat FHN GFNESFL LRSLLFLLPF LVGGISSSRF ALPRGLRADF MALSRA TKYM

101                              150
CLR DV  PTVTDFKGN Y LVALHLP SRR ATGRATREF R ATRSLVENNR LEFEYLC TRG
CLR DVat PTVTEYKGN Y IVALHLP SCR ATGRATREF R ATRSLVENNW LEFEHLCTR G

151                              200
CLR DV  YEYFKRFAQT LAGEVRECPQ ERWTVRPSCM GLRALAIRLM DLVPGDEPLS
CLR DVat YEYFKRFTRL LAGEVRECPQ ERWTVRPSCV GLRALAIRLM DLVPGDEPLS

201                              250
CLR DV  NRS GHRLSVL VHNL YGDGAS LSFWR IARFP DSSYYHFDDE GGVGLLYQS Q
CLR DVat NRS GHRLSVL VHNL YGDDAS LSFWR IARFP DSSYYHFDDE GGVGLLHQS Q

251          261
CLR DV  IQQLLCEGES S
CLR DVat IQQLLCEGES S

```

Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas P0^{CLR DV} y P0^{CLR DVAT}. Resaltados con gris se encuentran los residuos no conservados. Resaltado en negro y subrayado (entre los residuos 51-100) se encuentra marcado el dominio F-Box y entre los residuos 201-250 se encuentra el dominio carboxilo terminal. Los números de acceso de GenBank son: CLR DV, NC_014545.1; CLR DVat, KF359946.1.

ANEXO IV. ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN CARBOXILO TERMINAL DE LAS PROTEÍNAS P0

CLRDV	211	-----VHNLYGDGASLSFWRIAR	228
CLRDV-at	211	-----VHNLYGDDASLSFWRIAR	228
CpCSV	211	-----NCLHRCYQGALTSDIWELFG	230
CYDV-RPV	211	SSDITRYYNELVVEGVPVAFWDAAG	235
WYDV-GPV	204	---VTRYYNELDLQGVEVDFWYAAG	225
TuYV	205	-----VHCYKIYGEDGFISFWRIAN	224
BMVY	197	-----VHHLFGEARGMDFWRLAN	214
CABYV	199	-----VHRIYGEDGGLDFWRLAN	216
MaBYV	195	---VALHVHRIYGEDGGLDFWRLAN	216
		. : :*	

Alineamientos de la región carboxilo terminal de la proteína P0 de polerovirus. El alineamiento fue realizado con Clustal Ω empleando los aminoácidos contenidos en la región indicada en cada secuencia. Las secuencias de aminoácidos fueron tomadas de las secuencias nucleotídicas de referencia de cada virus. Los números de acceso de GenBank son: CLRDV, NC_014545.1; CLRDVat, KF359946.1; CpCSV, NC_008249.1; CYDV-RPV, NC_004751.1; WYDV-GVP, NC_012931.1; TuYV, NC_003743.1; BMVY, NC_003491.1; CABYV, NC_003688.1; MABYV, NC_010809.1.