



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Efecto de la proteína de cápside de *Tobamovirus* en la
modulación de la inmunidad del huésped: mecanismo de
acción**

Trabajo de Tesis para optar al grado de Doctora de la Universidad de Buenos
Aires, área Ciencias Biológicas

Lic. Andrea Laura Venturuzzi

Director: Dr. Sebastian Asurmendi
Consejero de Estudios: Dr. Esteban Hopp

Instituto de Biotecnología
CICVyA, INTA-Castelar

Buenos Aires, febrero 2019

Fecha de defensa: 21/03/2019

AGRADECIMIENTOS

A mi Director de Tesis, Dr. Sebastian Asurmendi por darme la oportunidad de tener un lugar en su grupo bajo su dirección. Le quiero dar las gracias por sus valiosas discusiones y sugerencias, por compartir sus conocimientos y brindarme su confianza durante todo el camino recorrido.

A las autoridades del Instituto de Biotecnología (INTA) por permitirme llevar a cabo mi trabajo.

Al CONICET y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por la beca y el financiamiento otorgado.

Al Dr. Esteban Hopp por haberme dado la oportunidad de acercarme al INTA y por sus valiosos consejos como tutor.

A mi Comisión de Seguimiento de Tesis de la Facultad de Exactas y Naturales, en especial a la Dra. Ana Distéfano por sus aportes a mi trabajo.

Al grupo del laboratorio, a los compañeros y amigos del Instituto por hacer del lugar de trabajo un lugar en el que uno realmente desea estar, gracias por los gratos momentos compartidos, dentro y fuera del laboratorio.

Le quiero agradecer especialmente a Ceci y a Gabi, quienes fueron muy importantes en esta etapa de mi vida. Gracias por sus valiosas ideas que enriquecieron mi trabajo y por brindarme contención durante todos estos años. También les quiero agradecer a Mel y a Yami por sus aportes y el apoyo durante el desarrollo de la tesis.

A Martin por aconsejarme siempre en mi trabajo a pesar de la distancia.

A mi familia, a Nahue y a Flor por el apoyo incondicional que me han dado.

¡Gracias a todos!

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS:

- *TMV SYSTEMIC MOVEMENT REQUIRES NEGATIVE MODULATION OF THE IMMUNE SYSTEM* (en período de escritura)

Otras publicaciones realizadas durante el período de mi beca doctoral:

- Conti G., Rodriguez, M.C., Venturuzzi, A.L. and Asurmendi, S. *Modulation of host plant immunity by tobamovirus proteins* (Review 2017). *Annals of Botany*.
doi: 10.1093/aob/mcw216.
- Conti G., Zavallo, D., Venturuzzi, A., Rodriguez, M.C., Crespi, M. and Asurmendi, S. *TMV induces RNA decay pathways to modulate gene silencing and disease symptoms*. *Plant J.* (2017) Sep 6. doi: 10.1111/tpj.13323.

RESUMEN

Efecto de la proteína de cápside de *Tobamovirus* en la modulación de la inmunidad del huésped: mecanismo de acción

Los virus fitopatógenos producen alteraciones en el metabolismo y la fisiología de sus hospedantes, que usualmente son la causa de los síntomas de las infecciones. Estos efectos explican, en parte, la reducción del rendimiento de cultivos de importancia agronómica. Los mecanismos subyacentes a estas alteraciones están relacionados con cambios en los patrones de expresión génica, por lo tanto, su comprensión global es importante para proponer estrategias antivirales efectivas o perfeccionar las utilizadas en la actualidad. En trabajos previos el grupo ha demostrado que la proteína de cápside (CP, del inglés) del virus del mosaico de tabaco (TMV, del inglés) modula negativamente la vía de defensa mediada por el ácido salicílico y esta regulación es a través de la estabilización de las proteínas DELLAs. A fin de ampliar el conocimiento de los mecanismos implicados, se ha identificado una red de genes de defensa modulados negativamente por la expresión de la proteína CP. Se detectó, a su vez, un subconjunto de genes corregulados conteniendo motivos de unión a los factores TGAs y WRKYs, inducidos por el factor *Non-Expressor of PR 1* (NPR1). El análisis de los genes de la red mostró que su expresión aumenta tempranamente en infecciones con el virus TMV-cg, pero disminuye en tiempos tardíos. Además se observó que los factores NPR1 y TGA10 estarían implicados en la modulación negativa mediada por la CP. Con el objetivo de estudiar el efecto de la proteína CP en el movimiento sistémico viral se realizaron infecciones con un virus defectivo en CP (TMV Δ CP), incapaz de moverse sistémicamente en plantas de *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana tabacum*. Fue posible observar TMV Δ CP en tejidos distales diferentes al sitio de infección inicial, a través de distintas condiciones ensayadas: silenciamiento de genes de la red, expresión transiente de la CP y estabilización de las proteínas DELLAs.

Estos resultados nos permiten proponer un modelo global de la interacción del virus TMV con la planta. A tiempos tardíos de infección, CP estabilizaría las proteínas DELLA, las cuales a través de la interacción con el factor TGA10 en una vía dependiente de NPR1, impedirían la activación de genes de defensa, conllevando finalmente, a que el virus se mueva sistémicamente. En conclusión, la función de CP de TMV es requerida para el movimiento sistémico del virus y, a su vez, dicho rol es llevado a cabo a través de la modulación negativa del sistema inmune de la planta. Adicionalmente, los resultados observados sugieren que dicho evento estaría dado en el egreso del virus desde el floema hacia el tejido parenquimático de los órganos sistémicos.

Palabras claves: Virus TMV, proteína de cápside, movimiento sistémico, proteínas DELLAs, NPR1, TGA10

ABSTRACT

Effect of *Tobamovirus* capsid protein on the modulation of host immunity: mechanism of action

Viruses dynamically modulate host physiology to successfully replicate in their host, causing physiological disorders responsible for the symptoms, which represent the main limitations in agricultural production. The mechanisms underlying these alterations are related to changes in gene expression patterns, hence understanding how viruses modulate host gene expression, is of vital importance to propose effective antiviral strategies or to perfect those used currently. Our group has previously demonstrated that the capsid protein (CP) of the Tobacco Mosaic Virus (TMV) negatively modulates the defense pathway mediated by salicylic acid (SA), and this modulation is carried out through DELLA proteins stabilization. In order to broaden the knowledge of the involved mechanisms, a network of defense genes negatively modulated by the expression of the CP protein has been identified. In turn, a subset of co-regulated genes containing TGAs and WRKYs factors binding motifs, induced by NPR1 factor (NON-EXPRESSOR OF PR GENES 1) was detected. Analysis of the network genes showed that their expression increase in early TMV-Cg virus infection and decrease in late times. Moreover, it was observed that NPR1 and TGA10 factors would be involved in CP negative modulation. In order to study the CP protein effect on systemic viral movement, infections with a defective CP virus (TMV Δ CP) were carried out. This virus is unable to move systemically in *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana tabacum* plants. TMV Δ CP was able to move to systemic tissues under the different tested conditions: silencing of network genes, CP transient expression and DELLA proteins stabilization.

These results allow us to propose a global model of plant-TMV virus interaction. At late infection times, CP would stabilize DELLA proteins, which, through the interaction with TGA10 factor in a NPR1-dependent pathway, prevent defense genes activation, leading to virus systemically movement. In conclusion, CP is required for TMV systemic movement and, this role is carried out through the negative modulation of the plant immune system. Additionally, these results suggest that the negative modulation would be necessary in the virus discharge from the phloem to the systemic tissues.

Keywords: TMV virus, capsid protein, systemic movement, proteins DELLAs, NPR1, TGA10

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Virus de plantas	1
1.2 Características generales de la interacción planta-virus	3
1.3 Los Tobamovirus	4
1.3.1 El virus del mosaico del tabaco (TMV)	4
1.3.2 Dinámica del proceso de la replicación y movimiento viral de los <i>Tobamovirus</i>	6
1.3.3 Características generales del transporte del virus TMV por el floema	8
1.4 Mecanismos de defensa	10
1.5 El rol de las fitohormonas en los mecanismos de defensa contra patógenos	12
1.5.1 El rol del SA	13
1.5.2 El rol de GA y las proteínas DELLA en los mecanismos de defensa contra patógenos	20
1.5.3 El <i>Crosstalk</i> hormonal en la inmunidad	22
1.6 Los factores de transcripción de la familia WRKY y su rol en defensa	23
1.7 Los factores de transcripción de la familia TGA y su rol en defensa	24
1.8 El rol multifuncional no canónico de las proteínas de los Tobamovirus durante el desarrollo de la infección viral	24
1.8.1 Efectos de la proteína replicasa de TMV	25
1.8.2 Efectos de la proteína de movimiento de TMV	25
1.8.3 Efectos de la proteína de cápside de TMV	26
1.8.4 Dinámica de los mecanismos de modulación de inmunidad mediada por las diferentes proteínas de TMV	28
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	31
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	33
2.1 Material Vegetal empleado	33
2.2 Protocolos generales de Biología Molecular	34
2.3 Ensayos Funcionales para el estudio de Movimiento Sistémico en plantas de <i>N.benthamiana</i> / <i>N.tabacum</i>	36
2.3.1. Silenciamiento génico inducido para la realización de ensayos funcionales en <i>N. benthamiana</i> / <i>tabacum</i>	36
2.3.2 Agroinfiltración de GAI-YFP y M5-YFP y confirmación por Western blot	39
2.3.3 Tratamiento con Paclobutrazol	40
2.3.4 Ensamblado de viriones y cuantificación	40
2.3.5 Procedimiento de infección con TMV	41
2.3.6 Análisis estadísticos de ensayos de movimiento sistémico	41
2.4 Análisis bioinformáticos	42
2.4.1 Empleo del programa ATTED para la generación de redes de coexpresión	42
2.4.2 Empleo de herramientas bio-informáticas para la búsqueda motivos regulatorios en un set de genes-co expresados	42
2.4.3 Empleo de <i>GeneMANIA</i> para la obtención de una red de coexpresión	43
2.4.4 Empleo del sitio Athamap para la búsqueda de motivos asociados a la defensa en secuencias reguladoras	44
CAPÍTULO 3: Resultados I	45

3.1 Red de coexpresión obtenida a partir de genes implicados en defensa cuya expresión disminuye luego de la expresión de CP de TMV	45
3.2 Identificación de motivos presentes en las regiones regulatorias sobrerrepresentados en genes coexpresados	47
3.3 Identificación de un grupo de genes coexpresados altamente interconectados que contienen motivos asociados a la defensa en sus secuencias reguladoras	53
3.4 Rol de NPR1 y TGA en la modulación de la expresión durante la infección viral	57
3.5 Rol de las enzimas de síntesis de GA en la modulación de la expresión durante la infección viral	60
CAPÍTULO 4: Resultados II	62
4.1 Evaluación del efecto que ejerce la CP en el sistema inmune y sus consecuencias en el movimiento sistémico del virus	62
4.2 Establecimiento de condiciones de trabajo para las construcciones virales.....	63
4.3 La expresión de la CP de TMV complementa en <i>cis</i> y <i>trans</i> el movimiento sistémico del virus TMV defectivo de la CP.....	68
4.4 Rol de la estabilización de las proteínas DELLAs en el movimiento sistémico del virus TMV	71
4.5 Evaluación del fenotipo desarrollado por el silenciamiento de genes de defensa.....	78
4.5.1 Estrategia basada en la técnica de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS)	78
4.5.2 Estrategia basada en la técnica de silenciamiento génico inducido por horquillas de silenciamiento.....	80
4.5.3 Rol de NPR1 y TGA10 en el movimiento sistémico del virus TMV	81
4.5.4 Rol del SA y del gen EDS1 en el movimiento sistémico de TMV	86
4.5.5 Rol del RAR1 en el movimiento sistémico de TMV	89
4.5.6 Rol de CN11 y ERF6 en el movimiento sistémico de TMV	90
4.5.7 Rol de WRKY3 en el movimiento sistémico de TMV	93
4.6 La expresión de la CP de CLRV no es capaz de complementar en trans el movimiento sistémico del virus TMV defectivo de la CP	94
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN	96
CONCLUSIONES	109
BIBLIOGRAFÍA	110
ANEXO	132
Anexo A. Puesta a punto y estandarización del protocolo de RT-qPCR: información mínima requerida para la publicación de experimentos de RTqPCR (MIQE)	132
Anexo B. Lista de genes coexpresados obtenida por medio del <i>GeneMania</i> que presentan en sus regiones promotoras el motivo de unión a los factores de transcripción TGA o/y WRKY. Los sitios fueron predichos con el programa <i>AthMap</i>	134
Anexo C. Ensayos realizados para evaluar el movimiento sistémico del virus TMVΔCP-GFP frente a las distintas condiciones experimentales.	137

ABREVIATURAS

ABA: ácido abscísico

AUX: auxina

ADN: ácido deoxirribonucleico.

ADNc: ácido desoxirribonucleico copia.

ARN: ácido ribonucleico.

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

CLRVD: virus de la hoja enrollada del algodón (del inglés *Cotton leafroll dwarf virus*)

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

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

CP: proteína de cápside viral del virus TMV

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

CTV: virus de la tristeza de los cítricos (del inglés, *Citrus tristeza closterovirus*)

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

dpi.: días post inoculación

ES: error standart

ETI: inmunidad desencadenada por efector (del inglés, *Effector Triggered Immunity*)

ET: etileno

ETS: susceptibilidad desencadenada por un efector (del inglés, *Effector Triggered Susceptibility*)

GA: ácido giberélico (del inglés, *gibberellic acid*)

GAI : *insensible a giberélica* (del inglés, *Gibberellin-insensitive*)

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

GUS: proteína M-glucuronidasa codificada por el gen reportero uidA

GID1: receptor de GA (del inglés, *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1*)

HLB: enfermedad del enverdecimiento de los cítricos o Huanglongbing

HR: respuesta hipersensible (del inglés, *hypersensitive response*)

JA: ácido jasmónico (del inglés, *jasmonic acid*)

kDa: kilo Dalton.

mARN: ARN mensajero

miARN o miR: micro RNA (microRNA).

MOF: methoxyfenozide

MP: proteína de movimiento viral

NI: plantas no inoculadas

nm: nanómetros

NPR1: *Non-expressor of PRI*

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

ORMV: *Oilseed rape mosaic virus*.

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

pb: pares de bases.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PLRV: *Potato leaf rolled virus*

PM: peso molecular.

PPV: *Plum Pox virus*

PR: proteínas relacionadas a la patogénesis (del inglés, *pathogen-related proteins*)

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

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

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

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

RDR: RNA polimerasa celular dependientes de ácido ribonucleico.

RDV: virus del enanismo del arroz (del inglés, Rice Dwarf Virus)

REP: proteína de replicasa del virus

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

RT-qPCR : PCR cuantitativa en tiempo real

SA: ácido salicílico (del inglés, salicylic acid)

SAR: Resistencia sistémica adquirida (del inglés, *systemic acquired resistance*)

SMV: *Soybean Mosaic Virus*

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

ssARN: ARN de cadena simple (del inglés, single strand).

TMV: virus del mosaico del tabaco (del inglés, *Tobacco Mosaic Virus*)

TMV-Cg: Crucifer infecting Tobacco Mosaic Virus

ToMV: virus del mosaico del tomate (del inglés, *Tomato Mosaic Tobamovirus*)

viARNs: siARNs de origen viral.

μM: micromolar

WT: plantas salvajes (del inglés, *wild type*)

YFP: proteína amarilla fluorescente (del inglés, *Yellow Fluorescent Protein*)

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Virus de plantas

Las plantas están continuamente expuestas a un amplio espectro de patógenos, lo que incluye, virus, bacterias, hongos, oomycetes y nematodos. Los virus son la segunda causa en importancia agronómica después de las infecciones fúngicas, ya que son patógenos que producen grandes pérdidas en la producción de la mayoría de los cultivos. En los últimos años, se ha observado un aumento de la incidencia y severidad total de las enfermedades inducidas por estos organismos. Esta situación se relaciona con una intensificación de las prácticas agrícolas, con el cambio climático (con un impacto directo en los organismos vectores) y con un incremento del comercio mundial de plantas y productos vegetales (Hull, 2002).

En nuestro país, los virus afectan a diversos cultivos de interés agronómico, entre los cuales se encuentran la papa, la soja, el algodón y los cítricos. Los virus que mayormente atacan a los cultivares de papa son: el virus del enrollamiento de la hoja (PLRV, del inglés) y el virus Y de la papa (PVY, del inglés) (Barrios Barón et al., 2017; Hooker, 1981). Ambos se caracterizan por los fuertes síntomas que producen en la planta. La combinación de este último con el virus X de la papa (PVX, del inglés) produce el mosaico rugoso de la papa, la cual causa un síntoma severo que origina la deformación de las hojas con necrosis en las nervaduras y, como consecuencia de la sintomatología descrita, se genera una reducción drástica del rendimiento del cultivo (Aranda & Maule, 1998), (Figura 1.1 A). Estos virus pueden ser propagados por medio de tubérculos-semilla infectados, mediante el uso de herramientas contaminadas o por vectores, como insectos, nematodos y hongos. El virus del mosaico de la soja (SMV, del inglés) es un virus transmitido por áfidos y por semilla. Sus síntomas son variables y se pueden presentar en forma de mosaico (suave a marcado), acortamiento de entrenudos y menor producción o deformación de semillas (Figura 1.1 D). En caso de infecciones tempranas, se ha detectado hasta un 33 % de disminuciones variables en el rendimiento según cultivares en el país. En cuanto al cultivo de algodón, una de las enfermedades que resulta de importancia económica, por su prevalencia y daños ocasionados, es la enfermedad azul producida por el virus de la hoja enrollada del algodón (CLRDV, del inglés) (Bonacic Kresic et al., 2006). En este caso, la severidad de los síntomas dependerá tanto de la susceptibilidad del cultivar de algodón como del estado fenológico de la planta al momento de la infección. Los síntomas característicos son el enrollamiento de las hojas hacia su cara inferior, el enanismo

debido al acortamiento de los entrenudos y los órganos florales y fructíferos que se ven reducidos en número y tamaño, pudiendo presentar esterilidad total (Cauquil, 1977) (Figura 1.1 B). El CLRDV es transmitido únicamente por el pulgón del algodónero *Aphis gossypii* y no es posible su transmisión mecánica (Cauquil, 1977). El virus de la tristeza de los cítricos (CTV, del inglés) es otro de los virus que afecta a casi todas las especies del género *Citrus*, entre ellas, el limón, un cultivo de gran importancia económica para nuestro país. Los síntomas inducidos por el CTV son diversos, entre los que se encuentran árboles asintomáticos portadores del virus y otros con diversas sintomatologías (Rocha-Peña et al., 1998), (Figura 1.1 C). Aquellos que provocan mayor impacto económico son el declinamiento rápido y la muerte de los naranjos y la acanaladura en la madera de los naranjos y limoneros ácidos. Si bien no existe una estrategia de control aplicable para todas las variedades, en líneas generales, se recomienda el empleo de material de propagación certificado y el uso de pies tolerantes o resistentes al CTV.

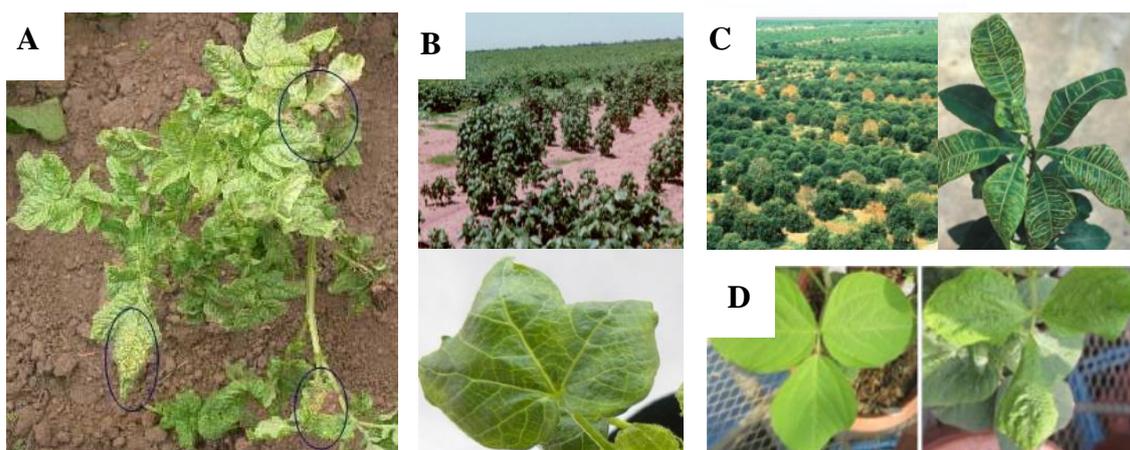


Figura 1.1: Síntomas de distintas enfermedades virales que afectan a las plantas. A) Síntomas de PVX y PVY. Los síntomas de necrosis se encuentran marcados con círculos. Se observa reducción del tamaño de las hojas y de la planta. Imagen tomada del Manual Interactivo de la papa –INIA B) Panel superior: campo de algodón con alta incidencia de plantas enfermas con el virus del CLRDV; panel inferior: hoja con síntomas de clorosis en las nervaduras. Imágenes tomadas de la tesis de (Agrofoglio, 2017). C) Panel izquierdo: campo de cítricos con árboles infectados por CTV. Se observa su declinamiento; panel derecho: hoja con taponamientos en las nervaduras. Imágenes tomadas de (Dawson et al., 2015). D) Enfermedad SMV en plantas de soja. Panel izquierdo: planta sana; panel derecho: planta tratada con SMV. Imágenes tomadas de (L. Zhou et al., 2014)

Las prácticas de manejo para estos fitopatógenos están asociadas, por lo general, a medidas preventivas, tales como el uso de semillas u órganos vegetativos certificados libres de virus, la eliminación de los posibles reservorios del virus en la vegetación silvestre circundante y la modificación de prácticas de siembra y cosecha. En aquellos casos donde está descrita la presencia de un vector de transmisión, su exclusión es

sumamente importante. Alternativamente, y debido a que las fuentes de resistencia natural son escasas, ha sido de gran importancia la búsqueda de nuevas estrategias sustentables para el manejo de estas enfermedades (Prins et al., 2007). El uso de la resistencia o tolerancia genética, introducida en las variedades de los cultivos, es la principal estrategia de control de virosis en cuanto a su eficacia y es un aspecto que ha recibido gran atención de fitopatólogos y mejoradores. Para ello, es fundamental el conocimiento tanto de los mecanismos que regulan las interacciones planta-virus, así como también, de las proteínas, tanto del hospedante como del virus, involucradas en el metabolismo celular para la multiplicación y el movimiento (Mandadi & Scholthof, 2013).

1.2 Características generales de la interacción planta-virus

Los virus son parásitos obligados, por lo tanto, dependen de sus hospedadores para completar su ciclo de vida en la planta, es decir, replicación, movimiento de célula a célula, transporte a larga distancia y propagación a otras plantas. Para ello, se requiere que se establezcan múltiples interacciones compatibles entre proteínas virales y factores celulares del hospedante. La planta reacciona ante estos invasores desarrollando diversas estrategias para restringir o, incluso, evitar completamente la infección de estos patógenos. Por su parte, los virus contrarrestan estos mecanismos de defensa de diferentes maneras. El resultado de esta dinámica conduce a una resistencia completa de la planta si el virus no puede superar las defensas o a una infección sistémica, que eventualmente terminará con la muerte del hospedante, si las contra-defensas virales son lo suficientemente eficientes como para evitar la respuesta inmune de la planta (Hipper et al., 2013). Entonces, no todas las interacciones planta-virus conllevan al desarrollo de enfermedad en las plantas (Gergerich & Dolja, 2006) de modo que los virus poseen un rango limitado de hospedantes (Gergerich & Dolja, 2006; Scholthof et al., 2011). Existen interacciones denominadas incompatibles, en donde la infección no llega a desarrollarse, por ejemplo, por una rápida activación de los genes de defensa, lo que conlleva a una resistencia local y adquirida y produce, a menudo, la muerte celular programada en un sitio cercano al sitio de infección, efecto denominado reacción de hipersensibilidad (HR, en inglés) (Jones & Dangl, 2006). En otros casos, el genotipo del hospedante no posee los factores requeridos para la reproducción del virus y su dispersión y, por ende, la planta resulta inmune a la infección viral. Por el contrario, las interacciones de tipo compatible se producen en ausencia de una respuesta capaz de evitar la dispersión sistémica de los virus. Es importante destacar que existe una amplia gama de situaciones intermedias entre la

inmunidad de la planta y la muerte, lo que resalta la complejidad de estas interacciones.

1.3 Los Tobamovirus

En esta tesis se utilizaron virus pertenecientes al género *Tobamovirus* de la familia *Virgaviridae*, cuyo orden es no asignado (ICTV, del inglés International Committee on Virus Taxonomy, 2011. Recuperado de <http://ictvonline.org>). El miembro tipo de este género es el virus del mosaico del tabaco (TMV, del inglés). Los *Tobamovirus* son capaces de infectar a la mayoría de las Solanáceas (tomate, papa, tabaco, etc.) y, en particular, la variante virus del mosaico del tabaco-Crucífera (TMV-cg, del inglés) es capaz de infectar a la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Yamanaka et al., 1998).

1.3.1 El virus del mosaico del tabaco (TMV)

La interacción entre TMV y el hospedante tabaco ha sido un modelo clásico para el estudio de la respuesta de defensa de plantas frente a virus. La infección en plantas de *Nicotiana tabacum* con TMV produce un mosaico característico en la hojas y un menor crecimiento de las plantas (Figura 1.2 A). En el caso de infecciones producidas en *Nicotiana benthamiana*, los síntomas se presentan como un enrollado de hoja, clorosis, menor crecimiento de las plantas y, en casos más severos, se observa *damping-off* y muerte de la planta (Figura 1.2 B). Por su parte, las plantas de *Arabidopsis thaliana* infectadas con el virus TMV-Cg no muestran claramente el síntoma típico de mosaico, pero sí evidencian un menor desarrollo del tamaño de la roseta (Figura 1.2 C).

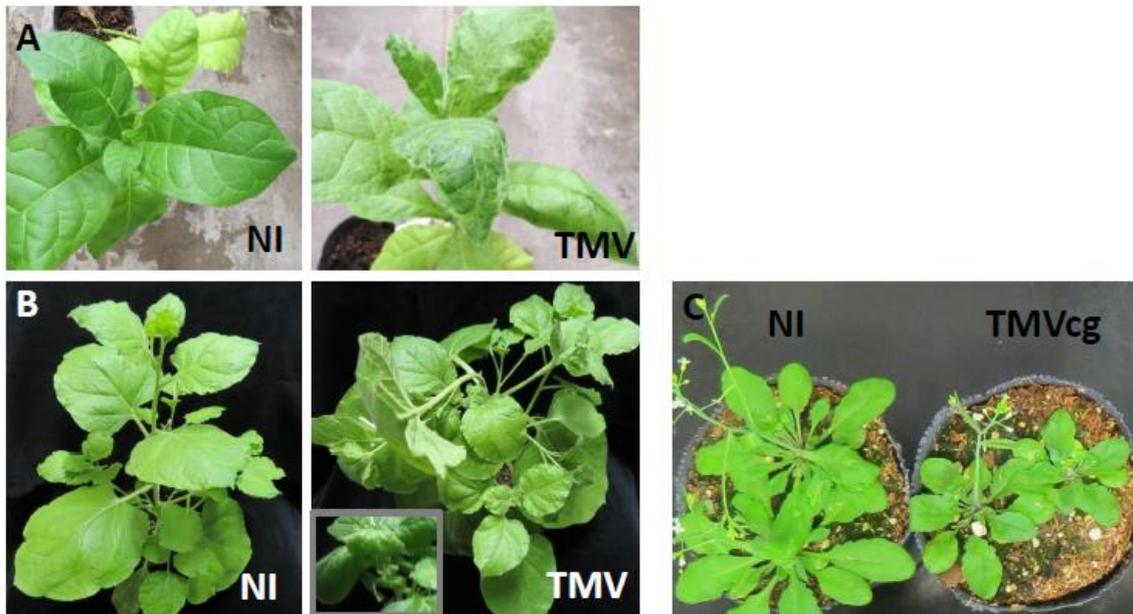


Figura 1.2: A) Síntomas de la enfermedad del mosaico del tabaco en *Nicotiana tabacum*. NI corresponde a plantas de tabaco no inoculadas y TMV refiere a las plantas infectadas que desarrollan los síntomas de la infección. B) Síntomas de la enfermedad del mosaico del tabaco en *Nicotiana benthamiana*. NI corresponde a plantas de tabaco no inoculadas y TMV refiere a las plantas infectadas que desarrollan los síntomas de la infección (notar que se ilustran dos tipos de síntomas el enrollado de hoja y *damping-off*). C) Síntomas producidos por el virus TMV-Cg en *Arabidopsis thaliana*. NI corresponde a plantas no inoculadas y TMV-Cg refiere a las plantas infectadas que desarrollan los síntomas de la infección.

Los *Tobamovirus* son virus con genoma de ARN de cadena simple (ssRNA, del inglés) positiva y no fragmentados. Es decir que su genoma está conformado por una única hebra de ARN.

El genoma del TMV posee 6395 nucleótidos y codifica para un total de cuatro proteínas: dos de ellas (126 kDa y 183 kDa) forman la replicasa viral (REP), y las otras dos, la proteína de movimiento (MP) (30 kDa) y la de cápside (CP) (17,5 kDa) (Figura 1.3.C). Las proteínas de 126 y 183 kDa son traducidas a partir del ARN genómico. Se conocen dos ARNs subgenómicos, a partir de los cuales se traducen por un lado la MP y por otro la CP (Dawson, 1992; Klug, 1999; Regenmortel et al., 2000). Los viriones constituyen partículas rígidas, alargadas, de 300 nm x 12 nm de diámetro (Figura 1.3.B). El virión posee una organización altamente ordenada y se ha descrito en tres estados estructurales diferentes: como discos apilados sin ARN (cristalografía de rayos X), como una forma helicoidal con ARN (difracción de fibra de rayos X) y, más recientemente, a partir de la técnica de microscopía del Cryo-electrón (Cryo-EM, del inglés), como una nueva forma helicoidal con ARN (Asurmendi et al., 2007; Clare & Orlova, 2010), (Figura 1.3.A). Los *Tobamovirus* se transmiten fácilmente por inoculación mecánica y no se conocen vectores.

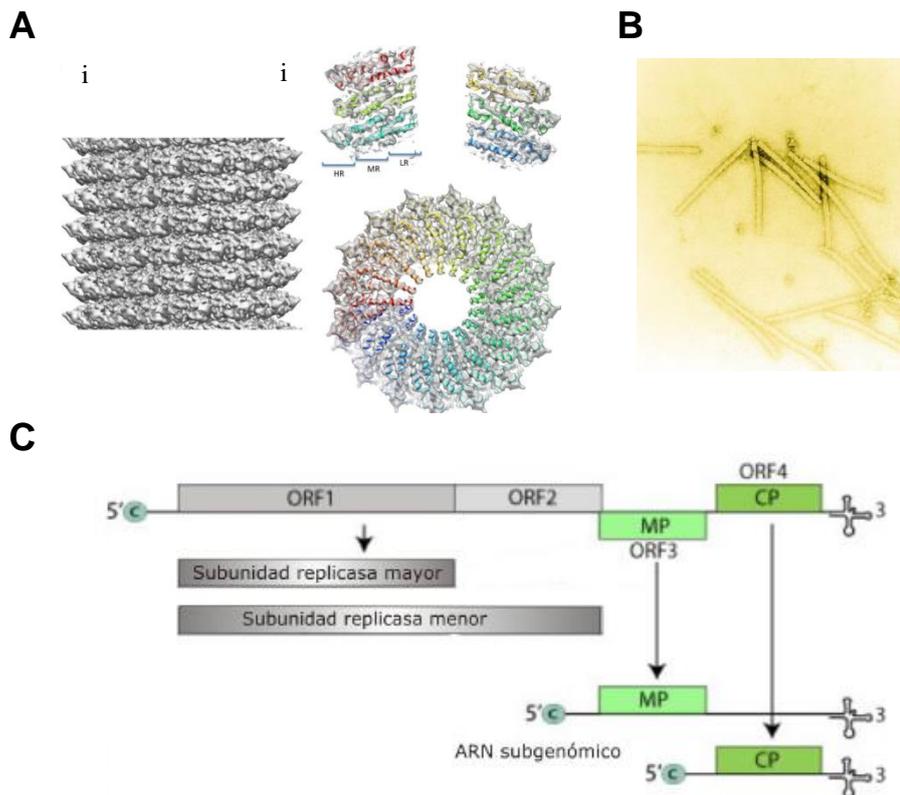


Figura 1.3 (A) Reconstrucción helicoidal de TMV mostrada desde el lado (i), como una sección axial central (ii), y en sección transversal. Imagen obtenida a partir de microscopía del Cryo-electrón (Cryo-EM) (Clare & Orlova, 2010). (B) Viriones de TMV observados al microscopio electrónico. (C) Esquema de la estructura del genoma del TMV. Se muestran los ORFs que codifican para las subunidades mayor y menor de la replicasa y los ARN subgenómicos que codifican para la MP y CP. Viriones de TMV observados al microscopio electrónico. (C) Esquema de la estructura del genoma del TMV. Se muestran los ORFs que codifican para las subunidades mayor y menor de la replicasa y los ARN subgenómicos que codifican para la MP y CP. Recuperado de <http://viralzone.expasy.org/>.

1.3.2 Dinámica del proceso de la replicación y movimiento viral de los *Tobamovirus*

El ciclo viral comienza con la entrada del virus en la célula vegetal y el posterior desensamblado del virión en el citoplasma. Como se mencionó anteriormente, a partir del ARN genómico se traducen las proteínas que componen la REP que se encarga de sintetizar la hebra complementaria (negativa) del genoma viral. Esta última sirve como molde para la transcripción de los ARNs sub-genómicos (Figura 1.4 A). Su posterior traducción entonces genera en primer lugar a la MP y luego a la CP. El virus puede trasladarse desde la célula de ingreso a la célula contigua; este proceso ocurre a través de los plasmodesmos y requiere la interacción de la proteína MP con ARN virales (ARNv) y factores del hospedante para modular dicho transporte (Figura 1.4 B), (Beachy & Heinlein, 2000; Heinlein, 2015). El virus se propaga por las células

adyacentes hasta alcanzar el sistema vascular y generar lo que se conoce como infección sistémica (Figura 1.4 C). Este proceso suele demorar entre 5 y 7 días en el hospedante *N. tabacum* o *N. benthamiana* infectado con el virus TMV. La proteína CP posee un rol en la estabilidad del ARN genómico y es necesaria para la formación de partículas virales que permitirán la transmisión del virus de una planta a otra. Además, es un componente requerido para el movimiento de larga distancia a través del floema, permitiéndole al virus llegar a los tejidos sistémicos (Bol, 2008; Callaway et al., 2001; Culver, 2002; Makarov & Kalinina, 2016).

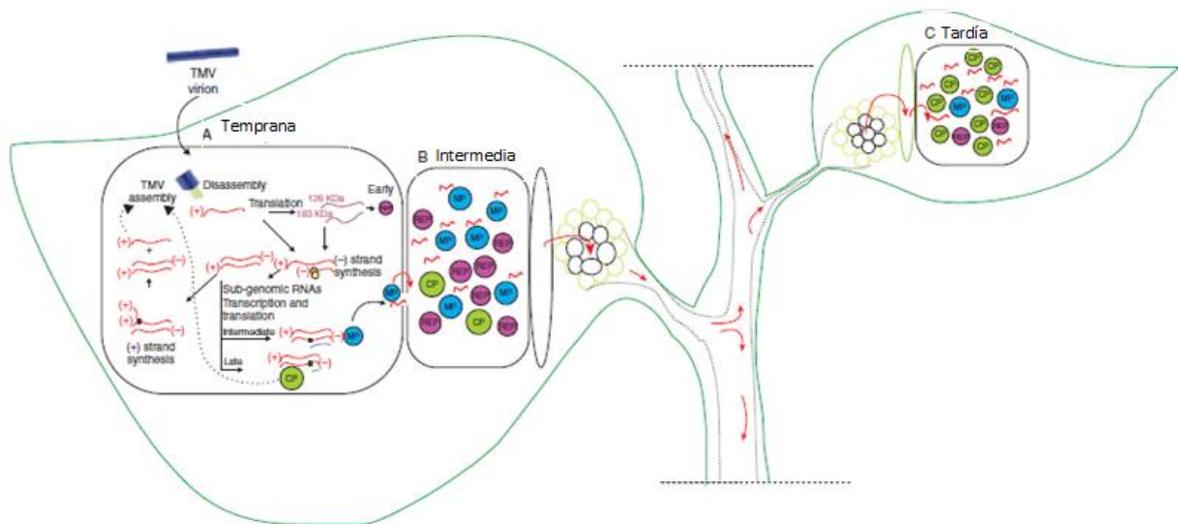


Figura 1.4. Representación espacio-temporal de los eventos asociados con la replicación y el movimiento de TMV. (A) La etapa temprana de la infección está determinada por la entrada de una partícula viral en el simplasto de una sola célula, el desensamblaje de los viriones y la traducción de las subunidades de 126 y 183 kDa de la replicasa. Después, las cadenas negativas y los ARN subgenómicos se sintetizan para producir primero MP y luego CP. La acumulación de ARN virales positivos y de CP permite el ensamblaje de nuevas partículas virales. (B) Las etapas intermedias de la infección están determinadas por la propagación local de los ARN virales entre las células adyacentes. La MP está implicada en facilitar el transporte debido a su capacidad de interactuar con los plasmodesmos y unirse al ARN. (C) Las últimas etapas de la infección se inician cuando el virus llega a partes distantes de las plantas a través de los tejidos vasculares, y la infección se vuelve sistémica. El movimiento de virus sistémico es facilitado por CP por un mecanismo aún no comprendido. En esta etapa, las partículas virales recién ensambladas pueden invadir otras plantas por transmisión directa. Replicasa (REP), proteína de movimiento (MP), proteína de cápside (CP) (Conti et al., 2017).

Si se considera la replicación de los *Tobamovirus* un proceso espacio-temporal, se puede observar que en el hospedante aparecen respuestas tempranas o inmediatas en una fase inicial, luego hay una etapa intermedia y, finalmente, respuestas tardías (Maule et al., 2002). Durante las últimas etapas, se pueden visualizar los síntomas correspondientes a la enfermedad (Figura 1.2).

El primer evento de infección de TMV ocurre cuando el virus entra al simplasto después que se haya producido un daño mecánico de la pared celular y de la membrana plasmática. Luego de tres minutos de dicho ingreso, se comienza a desencapsidar el virión a partir de desprendimientos de la CP y liberación del extremo

del ARN genómico. Inmediatamente, se traduce el 5'ORF del genoma viral para formar la REP, que inicia justamente la replicación del mismo (Shaw, 1999). Teniendo en cuenta que la replicación de los ARNv produce ARN doble cadena (dsRNAs, del inglés), la inducción del silenciamiento es la primera respuesta de defensa en activarse. Adicionalmente a su rol durante la replicación de ARNv, la REP es el supresor del silenciamiento de este virus, proporcionando así, la primera ronda de contra-defensa hacia el hospedante. La replicación viral tiene lugar en la proximidad de las membranas del retículo endoplásmico (ER), en las llamadas "fábricas de replicación viral" de las cuales la MP es un componente fundamental (Asurmendi et al., 2004; Beachy & Heinlein, 2000). Esta última dirige el ARNv para su paso a través de los plasmodesmos (Peña & Heinlein, 2012), convirtiéndose en el siguiente componente viral requerido para iniciar la etapa intermedia de la replicación viral dinámica. Esta proteína se encuentra predominantemente en el frente principal de la infección, controlando el límite de exclusión de los plasmodesmos (Oparka et al., 1997). En las últimas etapas de la infección, la CP se vuelve la proteína más abundante y es el último componente viral que se producirá durante el avance de la infección. Cuando el virus alcanza la propagación local de los tejidos vasculares, la CP es necesaria para el movimiento sistémico a través del floema para invadir las partes distales del huésped, pero el mecanismo aún no se encuentra dilucidado (Callaway et al., 2001; G. Conti et al., 2017; Hilf & Dawson, 1993). Las células que completan el "ciclo" de la infección no mueren, sino que acumulan enormes cantidades de viriones y de proteína CP mientras que la infección se propaga a los tejidos adyacentes. Finalmente, el resultado del avance del virus a los tejidos sistémicos es la aparición de síntomas. Estos representan una acumulación de alteraciones fisiológicas y estructurales subcelulares asociadas con el crecimiento defectuoso y el desarrollo anormal de toda la planta (G. Conti et al., 2017).

1.3.3 Características generales del transporte del virus TMV por el floema

El transporte a larga distancia, también llamado movimiento sistémico, es un paso común compartido por todos los virus que utilizan el flujo del floema para invadir los tejidos de las plantas (Carrington et al., 1996; Maule & Palukaitis, 1991). Para lograr una infección sistémica, los virus deben moverse desde el punto de entrada inicial hacia las células vecinas, y luego, a larga distancia hacia otras hojas y órganos (Tilsner et al., 2014). Durante el transporte de larga distancia se produce la translocación del virus desde las células del mesófilo hacia los elementos cribosos, pasando por las células del parénquima vascular y las células acompañantes. Los elementos cribosos están conectados a las células acompañantes por medio de

plasmodesmos especializados denominados poro de unidades plasmodesmáticas (Hipper et al., 2013). Estos poros poseen un tamaño de exclusión mayor que el de los plasmodesmos, lo que permite que el ingreso de las macromoléculas hacia los elementos cribosos ocurra por simple difusión. Sin embargo, se especula que las partículas virales no atravesarían estos poros por simple difusión, sino de manera regulada (Hipper et al., 2013). Se ha demostrado que existen dos formas de transporte a larga distancia: los viriones, en donde el genoma viral se encuentra protegido por la proteína CP y por otro lado, los complejos de ribonucleoproteína (RNP) en los que el genoma viral está asociado con proteínas (Hipper et al., 2013). En este último caso, el genoma viral puede estar protegido por proteínas virales o del hospedante o también asociado a membranas lipídicas (Wang, 2015).

El movimiento a través del floema y la acumulación viral en los tejidos sistémicos ocurre con un patrón específico. El floema abaxial/externo y el floema adaxial/interno pueden actuar separada e individualmente en el transporte del virus desde los tejidos fuente hacia los sumideros (Figura 1.5). En general, se observa que la entrada del virus en el tejido vascular es a través del tejido abaxial, mientras que la salida es a partir del adaxial (Cheng et al., 2000). Si bien se ha observado que tanto las venas mayores como las menores son puntos por donde el virus TMV puede propagarse, se postula que en el movimiento sistémico están involucradas principalmente las venas menores y no las mayores, debido a su dominancia tanto numérica como en área (N. H. Cheng et al., 2000). Existe además un pequeño transporte desde el floema externo al interno en las venas mayores de las hojas fuente y su pecíolo durante la infección sistémica (Figura 1.5 c). Mientras que en la porción del tallo que se encuentra por debajo de la hoja inoculada se puede visualizar la acumulación viral en el floema externo, por encima de esta hoja la acumulación en el tallo es en el floema interno (Figura 1.5 d y e). A medida que el virus TMV ingresa en las hojas sumidero, se encuentra limitado respecto a su capacidad de infectar dependiendo la etapa de desarrollo de la hoja. En una hoja en desarrollo solo las células asociadas con las venas mayores (clase I, II y III) inicialmente poseen acumulación viral (Figura 1.5 g). Esta característica también fue observada en infecciones con PVX. Dentro del tejido sumidero, el virus establece la infección en células asociadas con el floema interno del pecíolo o el floema adaxial de las venas de clase I y II (Figura 1.5 f). Por lo tanto, el patrón de acumulación viral observado en la porción del tallo por encima a la hoja infectada continúa en el pecíolo y en la hoja.

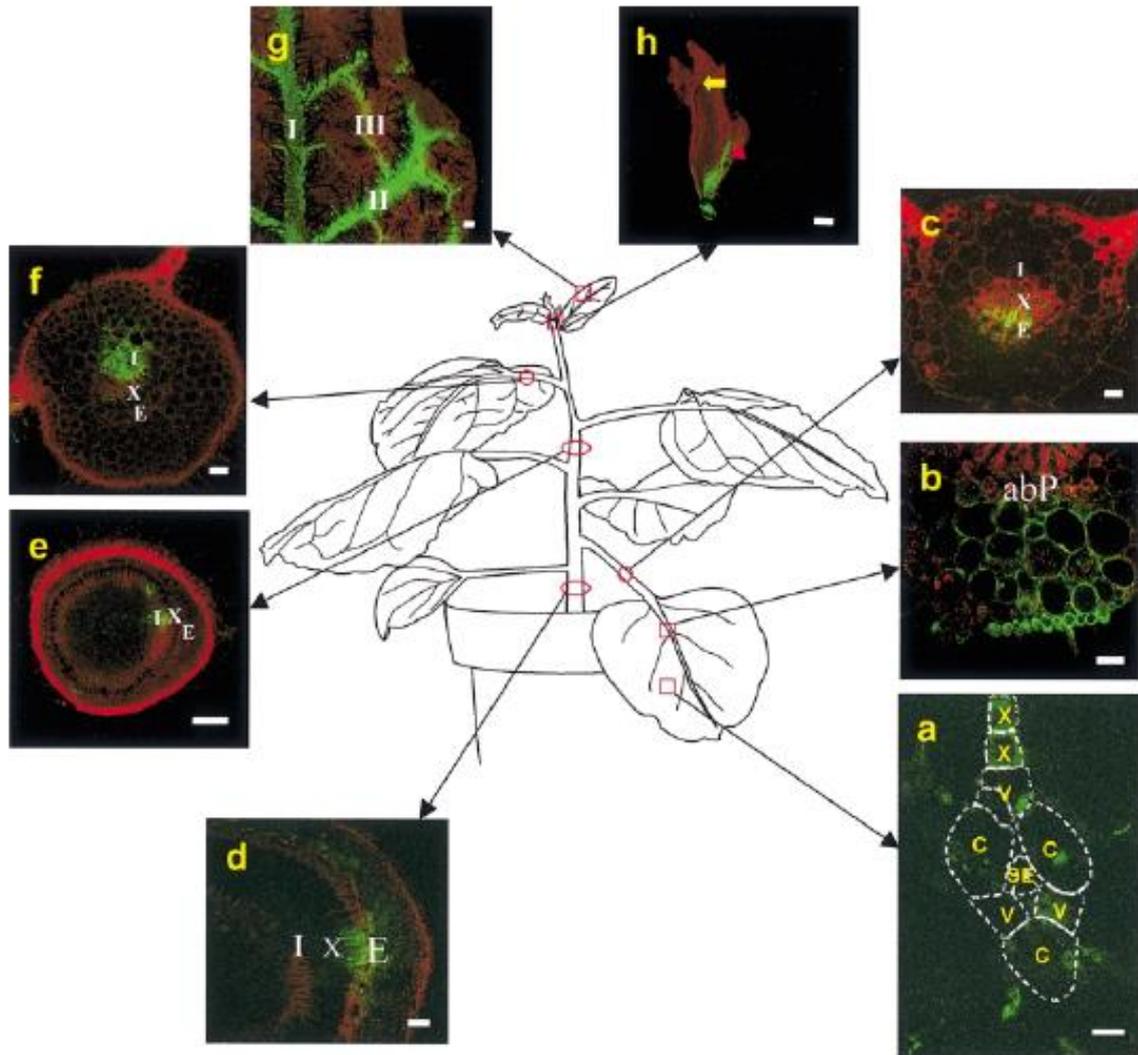


Figura 1.5 Rutas vasculares de invasión y acumulación de TMV que expresa GFP en tejido sistémico de *N. benthamiana*. (a) Virus en una vena menor de una hoja inoculada (3 d.p.i.). Barra = 10 μ m. (b) El virus invade el floema abaxial por las venas (2,5 d.p.i.). Barra = 200 μ m. (c) Acumulación de virus en el floema externo del peciolo de la hoja inoculada (6 d.p.i.). Barra = 200 μ m. (d) Acumulación de virus en el floema externo del tallo por debajo de la hoja inoculada (7 d.p.i.). Barra = 500 μ m. (e) Acumulación de virus en el floema interno sobre la hoja inoculada (7 d.p.i.). Barra = 300 μ m. (f) Acumulación de virus floema interno del peciolo de la hoja infectada sistémicamente (10 d.p.i.). Barra = 200 μ m. (g) Acumulación de virus en las venas principales (nervadura clase I, II y III) de una hoja sumidero infectada sistémicamente (10 d.p.i.). Barra = 200 μ m. (h) Acumulación de virus debajo del meristema de un haz vascular (15 d.p.i.). La punta de flecha roja indica el haz vascular debajo del tejido de meristema (flecha amarilla) que acumula virus (representado por fluorescencia verde). Barra = 500 μ m. abP, floema abaxial del inglés *abaxial phloem*; C célula acompañante; E floema externo; I, floema interno; SE, elementos cribosos del inglés *sieve element*; V células vasculares parenquimáticas; X, vasos del xilema. Tomado de (N. H. Cheng et al., 2000).

1.4 Mecanismos de defensa

Las plantas están expuestas a diversos patógenos, a ectoparásitos como insectos, entre otras plagas (Agrios, 2005). Para impedir el ingreso de los distintos microorganismos, la línea frontal de defensa que poseen las plantas, incluye estructuras tales como la cera cuticular, que proporcionan una armadura a la hoja, y la

pared celular, que actúa como una capa secundaria de protección para cada célula individual dentro de la planta (Szabo & Bushnell, 2001; Underwood, 2012). Si los invasores penetran estas estructuras primarias, el siguiente nivel de resistencia consiste en la protección mediante la activación de la resistencia basal y la resistencia sistémica adquirida (SAR, del inglés), en otras palabras se dispara el sistema inmune (Fu & Dong, 2013; Henry et al., 2013; Muthamilarasan & Prasad, 2013).

Las células vegetales son capaces de reconocer, a través de receptores transmembrana, estructuras típicas de los patógenos como la flagelina, la quitina, las lipoproteínas y los lipopolisacáridos (Göhre & Robatzek, 2008), comúnmente denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés) (Hou et al., 2009; Jones & Dangl, 2006; Zhang & Zhou, 2010). Los PAMPs activan proteínas receptoras denominadas PRRs (receptores de reconocimiento de patrón, del inglés) quienes a su vez inducen diversos eventos de señalización que resultan en la activación de resistencia basal (PTI, inmunidad inducida por PAMPs, del inglés) (Boller & He, 2009; Nomura et al., 2005; Zipfel, 2009). Estos eventos suelen ser representados en un modelo denominado “zig-zag” (Figura 1.6). En algunos casos, los patógenos producen moléculas efectoras o elicitores específicos que son transportados al interior de las células del hospedante y suprimen la PTI, promoviendo la virulencia o susceptibilidad inducida por efectores (ETS, del inglés). Las plantas a su vez, poseen una segunda capa de defensa mediada por receptores citoplasmáticos que son capaces de detectar estas moléculas foráneas y, en respuesta, disparar la expresión de proteínas relacionadas a la patogénesis (PRs, del inglés) (Edreva, 2005). Esta segunda barrera de inmunidad se denomina ETI (inmunidad inducida por efectores, del inglés) (Chisholm et al., 2006; Wu et al., 2014). En general, la ETI es más intensa que la PTI, usualmente la ETI está asociada con la muerte celular rápida, mientras que las respuestas PTI son más leves. Tras la infección primaria por patógenos, las plantas no solo activan ambas respuestas en el sitio de infección local, sino que también activan sistémicamente la resistencia de amplio espectro contra la infección secundaria, SAR (Durrant & Dong, 2004). Durante esta última respuesta, se inducen genes asociados que codifican genes PR, involucrados en traducción de señales y transporte, e implicados en la maquinaria de secreción. En paralelo, durante la SAR se reprime la expresión de genes involucrados en respuesta al ácido jasmónico (JA, del inglés) y al etileno (Et, del inglés), como así también genes asociados a remodelación de la pared celular (Gruner et al., 2013).

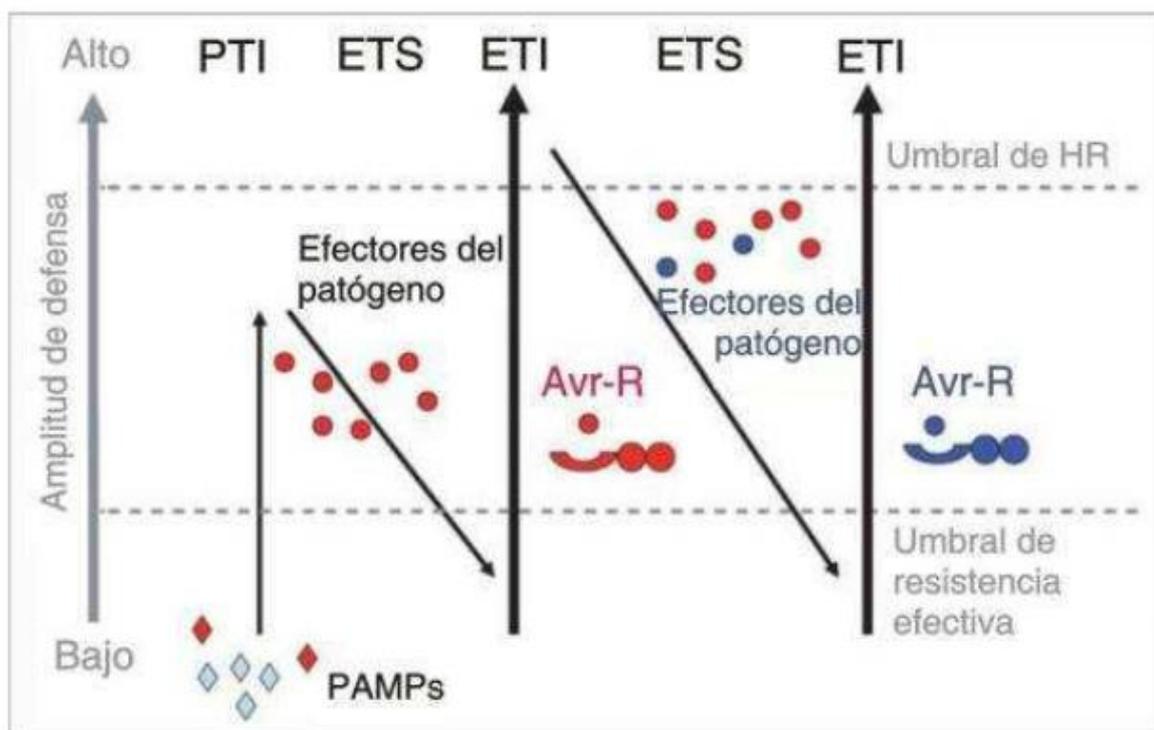


Figura 1.6. Esquema en zig-zag, representativo de la amplitud de defensa, donde la resistencia/susceptibilidad es proporcional a $[PTI - ETS + ETI]$. En la primera etapa, la planta detecta la presencia de PAMPs y activa PTI. A su vez, en la segunda etapa, el patógeno genera efectores que interfieren con PTI, dando lugar a ETS. Luego, los efectores son reconocidos activando ETI, una versión amplificada de PTI que generalmente supera el umbral de respuesta hipersensible (HR). Aquellos patógenos que adquirieron nuevos efectores son capaces de suprimir ETI nuevamente y las plantas que contengan nuevas proteínas capaces de reconocerlos serán seleccionadas, provocando nuevamente ETI. Adaptado de (Jones & Dangl, 2006).

1.5 El rol de las fitohormonas en los mecanismos de defensa contra patógenos

Las hormonas son moléculas pequeñas de señalización producidas por las plantas que les permiten regular diferentes procesos fisiológicos y adaptarse a diferentes estreses, tanto abióticos como bióticos. Varias hormonas son conocidas por sus funciones en el ajuste de las respuestas de las plantas al estrés biótico, como el ácido salicílico (SA, del inglés), el JA y el Et. Se ha encontrado recientemente que otras hormonas, en su mayoría conocidos originalmente por su rol en el crecimiento y desarrollo, desempeñan un papel importante en las interacciones planta-patógeno. Entre estas fitohormonas se puede citar a las giberelinas (GA, del inglés), las auxinas (Aux, del inglés), los brassinoesteroides (BR, del inglés), las citoquininas (CK, del inglés) y el ácido abscísico (ABA, del inglés) (Alazem & Lin, 2015; Denancé et al., 2013; Pieterse et al., 2012; Santner et al., 2009; Shigenaga et al., 2017).

Las hormonas tienen interrelaciones antagónicas o sinérgicas, a través de las cuales ciertas de ellas pueden prevalecer sobre otras en circunstancias específicas. Por ejemplo, la inducción de la vía de señalización de SA puede reprimir tanto la vía de JA / Et a través de *Non-expressor of PR1 GENE* (NPR1, del inglés), como la de ABA a través de NPR1 o los genes regulados por este factor maestro (Bari & Jones, 2009; Koornneef et al., 2008; Maekawa et al., 2012; Spoel, 2003). A la inversa, la inducción de la vía JA / Et reprime la expresión de ciertos genes de la señalización de SA a través de las proteínas MAPK4 y JIN2 (Kachroo & Kachroo, 2007; Koornneef et al., 2008). Varias respuestas al estrés abiótico, como las de la sequía o el frío, están mediadas principalmente por ABA, que antagoniza fuertemente a muchas vías hormonales, incluida la vía del SA (Soosaar et al., 2005) la del Et (Cheng et al., 2009; Ghassemian et al., 2000) y las vías Et / JA (Broekaert et al., 2006). Sin embargo, ABA parece regular positivamente la biosíntesis y señalización de JA durante la infección necrotrófica (Adie et al., 2007) o el cierre del estoma (Hossain et al., 2011; Munemasa et al., 2007). Finalmente, ABA, CKs y Et tienen efectos antagónicos sobre las GAs durante varios procesos de crecimiento y desarrollo, mientras que las Auxs interactúan positivamente con las GAs (Greenboim-Wainberg et al., 2005; Jasinski et al., 2005; Weiss & Ori, 2007).

En el caso de los virus, su propagación en una planta suele estar restringida por la activación de la maquinaria del silenciamiento y/o la vía de señalización SA. Sin embargo, es importante aclarar, tal como se mencionó anteriormente, que existe participación de otras vías, las cuales funcionan, en muchos casos, antagónicamente (Alazem & Lin, 2015). Por ejemplo, ABA puede suprimir la inducción de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés) y la transducción de señalización SA o JA, evitando así las defensas controladas por estas dos vías (Asselbergh et al., 2007; Ton et al., 2009).

1.5.1 El rol del SA

El SA es una hormona esencial en la inmunidad vegetal que se acumula tanto en las hojas infectadas como en hojas distales frente al ataque por patógenos (D'Maris Amick Dempsey, Shah, & Klessig, 1999; Metraux et al., 1990). Existen numerosos reportes que muestran elevados niveles de SA durante la ETI (Palmer et al., 2017; Garcion et al., 2008; Iwai et al., 2007; Nobuta et al., 2007;). De hecho, esta fitohormona es necesaria y suficiente para activar la defensa de la planta contra los patógenos biotróficos y semi-biotróficos. Por ejemplo, se demostró que en mutantes que carecen de acumulación de SA, la planta tiene limitada capacidad para soportar la infección por

patógenos (Fu & Dong, 2013). Además, la aplicación exógena de SA o uno de sus análogos activos es suficiente para regular la inmunidad (Lu, 2009).

También se ha observado que durante las infecciones virales incompatibles, los niveles de SA se incrementan fuertemente en plantas de pepino infectadas con el virus necrótico del tabaco (Metraux et al., 1990). El incremento de los niveles de esta hormona genera, a su vez, el incremento de la expresión de genes que codifican para proteínas PR (van Loon et al., 1987). Además, a partir del incremento de la acumulación de SA es posible el desencadenamiento de una respuesta hipersensible (HR, del inglés). Por ejemplo, el reconocimiento específico del efector viral 25K1 de una cepa avirulenta de PVX, por la proteína de resistencia (Nb) de *S. tuberosum*, induce deposición de calosa en el sitio de entrada del patógeno en una vía dependiente de SA (Marano et al., 2002; Sánchez et al., 2010).

El rol del SA también ha sido caracterizado en interacciones virales de tipo compatible. Por ejemplo, el tratamiento con esta hormona, tanto en plantas de *Nicotiana glutinosa*, como en *Arabidopsis*, atrasa el movimiento sistémico del virus del mosaico del pepino (CMV, del inglés) (Ji & Ding, 2001). Por otro lado, ensayos realizados con el virus PPV (incapaz de infectar de manera sistémica al tabaco), mostraron que este patógeno puede moverse a los tejidos sistémicos en plantas transgénicas de tabaco que expresan una enzima bacteriana involucrada en la degradación de SA (Alamillo, Monger, et al., 2006). Finalmente, experimentos llevados a cabo con plantas transgénicas que expresan proteínas virales individuales han mostrado que algunas de éstas son capaces de modular negativamente la vía mediada por SA (Love et al., 2012; Wang et al., 2009a)

Esto permitiría contrarrestar la defensa mediada por esta hormona (Huang et al., 2005). Además de funcionar en SAR, este factor de crecimiento es capaz, por ejemplo, de interferir con los mecanismos de comunicación entre bacterias o *quorum sensing* (Joshi et al., 2016); demostrando la diversidad de funciones en las cuales se encuentra involucrado.

1.5.1.1 Biosíntesis y transporte de SA

La biosíntesis de SA puede realizarse a través de dos vías enzimáticas diferentes: la vía de L-fenilalanina y la vía del isocorismato sintasa (ICS, del inglés) (Wildermuth et al., 2011). En plantas de *Arabidopsis*, esta última vía genera la mayor parte del SA durante las infecciones ocasionadas por patógenos (Vlot et al., 2009). Existe una serie de genes descritos, que pertenecen a la vía ICS: *EDS1*, *PAD4*, *NDR1* y *SID1*. La mayoría de estas proteínas, a diferencia de *SID2*, carecen de motivos enzimáticos, por lo que, no están directamente involucradas en la biosíntesis, pero sí en la acumulación

de dicha hormona (Figura 1.7), (Feys et al., 2005; Lu, 2009). EDS1 y PAD4 estimulan la producción de SA a través de la regulación positiva de ICS1, mientras que su expresión también puede ser inducida por SA, lo que crea un circuito de retroalimentación positiva tanto a nivel local como sistémico. Además, ambas proteínas son cruciales para el desarrollo de SAR (Gruner et al., 2013). El complejo de proteínas EDS1 y PAD4 suprime la función del factor de transcripción MYC2, regulador maestro de la señalización del JA, de manera tal de reforzar la defensa de la planta mediada por SA (Cui et al., 2017). Adicionalmente, la sobreexpresión de *EDS1* y *PAD4* activa la expresión de genes dependientes e independientes de SA, contribuyendo a la inmunidad basal de la planta (Cui et al., 2017) El gen *NDR1* ha sido reportado como un factor involucrado en la acumulación de SA. De hecho, la interrupción de su expresión provoca una reducción del contenido de esta hormona en plantas infectadas por patógenos (Shapiro & Zhang, 2001).

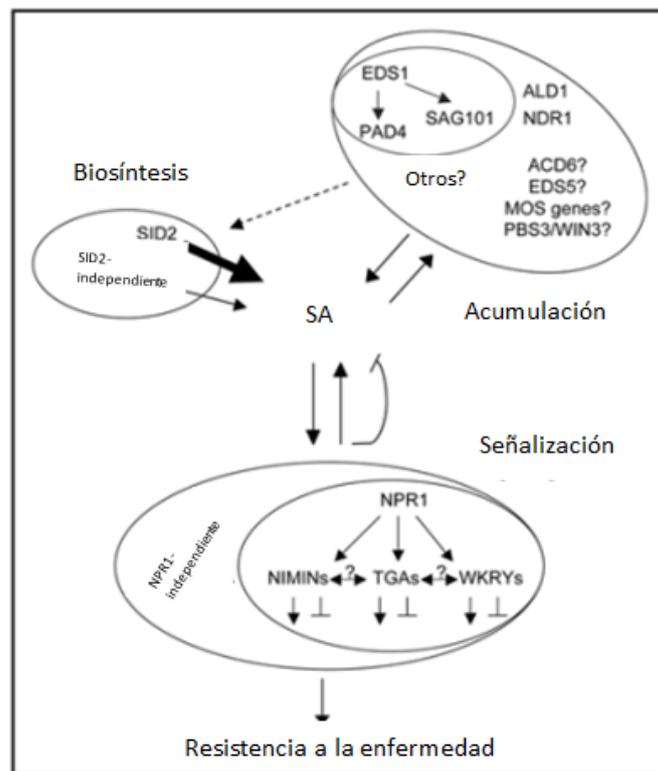


Figura 1.7 Modelo de la vía de SA. Las redes se agrupan en tres sectores interconectados: biosíntesis, acumulación y señalización de SA. Para la biosíntesis de SA, *SID2* contribuye a la mayor parte de la producción de SA, mientras que las vías independientes de *SID2* desempeñan un papel menor, como se indica por el grosor de las flechas. Para la acumulación de SA, existen múltiples vías reguladoras independientes. *PAD4* y *SAG101* interactúan físicamente con *EDS1*. *NDR1* y *ALD1*, entre otros, actúan independientemente de *EDS1*. Para la señalización de SA, existen vías independientes y dependientes de *NPR1*. El nodo *NPR1* incluye proteínas *NIMIN* y factores de transcripción, como *TGA* y *WRKY*. Tomado de (Lu, 2009)

1.5.1.2 Señalización de SA en la defensa de la planta

El gen *NPR1* nombrado anteriormente es un regulador maestro que modula una de las posibles vías que desencadena el SA (Figura 1.7). De hecho, más del 98 % de la expresión de genes de defensa en respuesta al SA dependen de *NPR1* (Blanco et al., 2009; Wang et al., 2006).

Además de los genes ampliamente descritos, *NPR1* también regula positivamente la expresión de importantes genes PTI, entre los cuales se encuentran los de síntesis de calosa, marcadores PTI y genes que funcionan en la vía del silenciamiento de ARN (Dong et al., 2008; Pieterse & Van Loon, 2004; Yeh et al., 2017)

Es importante destacar que el SA controla la reubicación de la proteína *NPR1* desde el citosol hasta el núcleo a través de cambios en los estados redox (Mou et al., 2003). *NPR1* permanece en el citoplasma formando oligómeros hasta que tras la infección o el tratamiento con SA, estos enlaces se rompen y liberan monómeros de *NPR1* para que se trasladen al núcleo, donde allí son capaces de inducir la expresión de genes relacionados con la defensa (Figura 1.8) (Wu et al., 2012). Dado que *NPR1* carece de dominio de unión a ADN, actúa a través de la interacción con distintos factores de transcripción, tales como los TGAs y WRKYs (Figura 1.6), (Johnson et al., 2003; Lu, 2009; Niggeweg et al., 2000; Wang et al., 2006a; Zhang et al., 1999; Zhou et al., 2000).

Además de provocar la translocación de *NPR1* al núcleo, el SA es capaz de unirse a dicha proteína. Es decir que *NPR1* funciona adicionalmente como un receptor de esta hormona (Ding et al., 2018; Wu et al., 2012). En contraste con este factor, sus análogos, *NPR3* y *NPR4*, funcionan como reguladores negativos de la defensa de la planta. Ambos también poseen el rol de ser receptores de SA (Fu et al., 2012), y se encuentran implicados en la degradación de las JAZ vía este factor de crecimiento (Liu et al., 2016). Si bien se han descrito un gran número de proteínas que con diferentes afinidades son capaces de unirse al SA (Dempsey & Klessig, 2017), existe controversia acerca de cómo es percibida esta hormona en respuestas de defensa (Y. Ding et al., 2018).

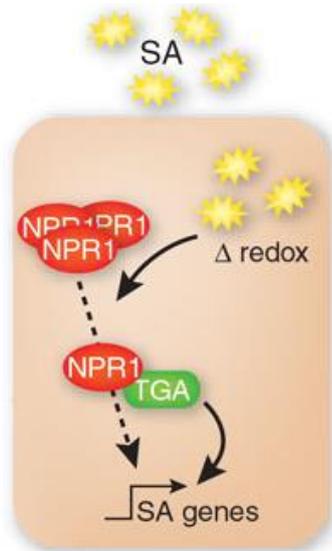


Figura 1.8. Representación simplificada de la vía del SA. Un aumento de SA produce cambios en el potencial redox celular, lo que conlleva a la forma monomérica activa de NPR1. El NPR1 monomérico se traslada al núcleo donde funciona como un coactivador transcripcional de los genes sensibles a SA vía factores de transcripción, tales como los de la familia TGA. Tomado de (Pieterse et al., 2009).

1.5.1.3 Estrategias utilizadas por patógenos para contrarrestar la defensa mediante SA

La defensa mediada por SA es una barrera inmune muy poderosa, pero hay varias maneras en que patógenos específicos han logrado vulnerar este robusto mecanismo de defensa. Las tácticas de interrupción de SAR que han evolucionado en diversos patógenos pueden clasificarse en tres estrategias principales: (1) reducir directamente la acumulación de SA al convertir esta hormona en derivados inactivos, (2) interrumpir la biosíntesis de SA al apuntar a vías específicas, e (3) interferir con la señalización de la vía del SA. La amplia gama de estrategias evolucionadas en patógenos destaca la importancia de la interrupción de la defensa mediada por esta hormona para lograr una infección efectiva (Figura 1.9), (Qi et al., 2018).

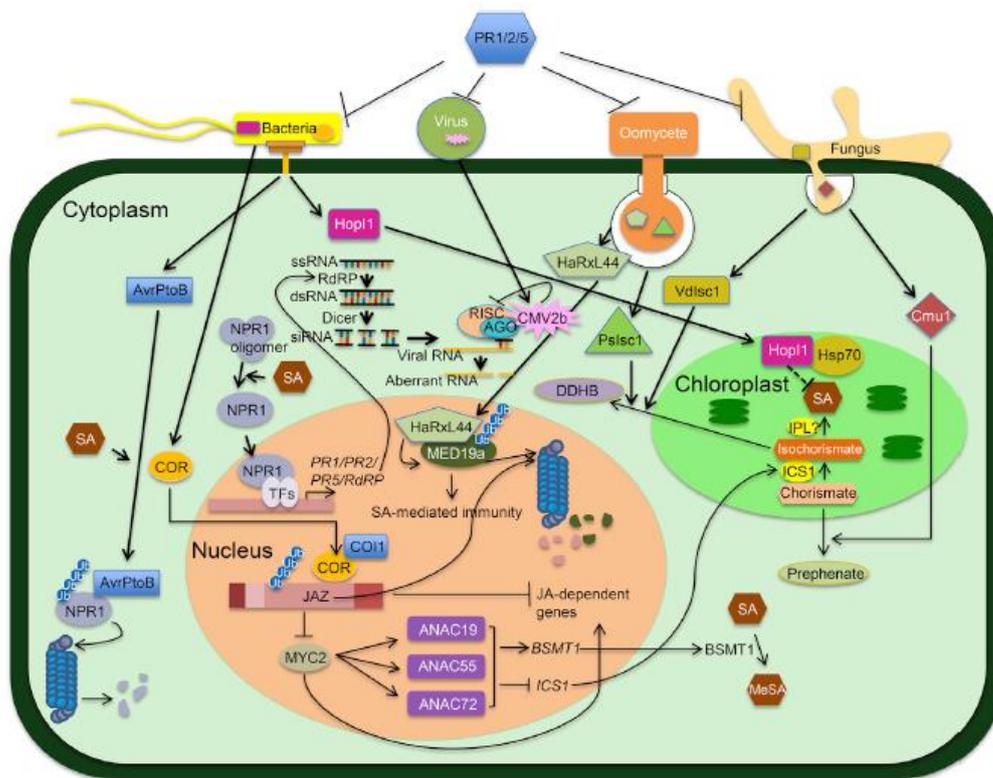


Figura 1.9. Interrupción de la biosíntesis, acumulación y señalización del ácido salicílico (SA) por diversos patógenos: bacterias, virus, oomicetes y hongos. Las flechas continuas indican activación y las que finalizan con segmento muestran las inhibiciones. Tomado de (Qi et al., 2018).

Interrupción de la biosíntesis de SA

Como se mencionó anteriormente, el isocorismato funciona como un intermediario necesario en la biosíntesis de SA. Varios patógenos fúngicos y oomicetes han desarrollado la capacidad de segregar ISC en células hospedadoras; estas ISC convierten el isocorismato en 2,3 dihidro-2,3-dihidroxibenzoato, disminuyendo así la acumulación de SA. Por ejemplo, el efector Pslsc1 secretado por *Phytophthora sojae* y el efector VDLSC1 generado por *Verticillium dahlia* muestran similitudes con las enzimas ISC (Figura 1.9), (Liu et al., 2014).

Reducción de la acumulación de SA

Se ha encontrado que varios patógenos de las plantas producen una SA hidroxilasa. Dicha enzima degrada el SA a catecol, compuesto que no es capaz de activar la defensa de la planta. Por ejemplo, el hongo biotrófico *Ustilago maydis* lleva tres genes putativos de SA hidroxilasa, que son inducidos durante la infección (Rabe et al., 2013). El Huanglongbing (HLB), también conocido como enfermedad del enverdecimiento de los cítricos, causa gran devastación de los cultivos de cítricos. La bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, causante de esta enfermedad, puede suprimir la defensa de la

planta empleando una salicilato hidroxilasa activa, lo que detiene la acumulación de SA permitiéndole así, superar la defensa del hospedante (Jinyun Li et al., 2017).

Interferencia con la señalización SA

Además de reducir la acumulación de SA e inhibir la biosíntesis de SA, los patógenos pueden liberar toxinas y efectores, e interferir con la señalización de SA para suprimir la respuesta dependiente de esta fitohormona. Una alternativa es la reprogramación transcripcional de los genes de respuesta al SA a través de la vía del JA. Por ejemplo, la bacteria *Pseudomonas syringae* produce una toxina llamada COR que simula la función del JA de manera tal que interrumpe la vía del SA (Zheng et al., 2012). Este rol lo produce adhiriéndose al complejo COI1/JAZ, que luego desencadena la ubiquitinación de JAZ y su posterior degradación, estimulando así a los genes dependientes del JA y, en consecuencia, reprimiendo la expresión de los genes dependientes del SA (Wasternack & Hause, 2013).

Además, se ha encontrado que el SA aumenta la resistencia antiviral mediada por silenciamiento de ARN en plantas de *Arabidopsis* y tabaco (Alamillo et al., 2006).

Los virus han desarrollado estrategias para inhibir este mecanismo. Por ejemplo, los *Potyvirus* codifican un supresor de silenciamiento de ARN, denominado HcPro. En las líneas transgénicas que sobreexpresan HcPro, tanto la defensa mediada por el SA como los niveles de ARNsi producido por PPV se reducen, favoreciendo la infección (Alamillo et al., 2006). Además de esta función, se ha visto que el HcPro del virus del mosaico del nabo (TuMV, del inglés) es capaz de producir la reprogramación de la expresión génica dependiente del SA a través de la interferencia con un regulador positivo de dicha vía. Es decir, actúa como regulador negativo de la anhidrasa carbónica cloroplástica (AC, del inglés). Esta proteína es esencial para restringir la acumulación y la propagación del virus, ya que es capaz de activar la vía del SA (Poque et al., 2018).

Como el regulador principal de la defensa de las plantas mediada por el SA es NPR1, es muy probable que este sea un objetivo de los efectores de patógenos. Se ha descrito que AvrPtoB, un efector bacteriano, es capaz de interactuar con NPR1 en presencia de SA (H. Chen et al., 2017). Este evento resulta en la degradación mediada por ubiquitinación de NPR1 vía proteosoma mediante la actividad de una E3 ligasa que posee el efector. Como consecuencia de la degradación de NPR1, muchos genes regulados por este se ven afectados durante la infección con *P. syringae*. Por lo tanto, AvrPtoB interrumpe la señalización del SA dependiente de NPR1, favoreciendo así la patogenicidad bacteriana (Figura 1.9).

Recientemente, se ha demostrado que el efector HopD1 tipo III de *P. syringae* es capaz de inducir la degradación del factor de transcripción NTL9, mientras que el factor HopBB1 de la misma bacteria lo hace con TCP14 (Block et al., 2014; Yeh et al., 2017). Las proteínas TCP8, TCP14 y TCP15 interactúan con NPR1 para regular la expresión de genes de defensa de la planta (Pajerowska-Mukhtar, Emerine, & Mukhtar, 2013; Li et al., 2018). Por lo tanto, los patógenos pueden interferir también con los factores de transcripción que se encuentran río abajo en la regulación de NPR1 e interferir así con la señalización de la vía del SA (Qi et al., 2018).

1.5.2 El rol de GA y las proteínas DELLA en los mecanismos de defensa contra patógenos

Las GAs son una clase de hormonas diterpenoides tetracíclicas que juegan un papel esencial en la regulación de muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas. Las GAs son esenciales para muchos procesos, como, por ejemplo: la germinación de las semillas, la elongación del tallo, la expansión de las hojas, el desarrollo de los tricomas, la maduración del polen y la inducción de la floración (Achard et al., 2009; Olszewski et al., 2002). Un regulador clave de la vía de señalización de las GA son las proteínas nucleares DELLAs, también denominadas represoras del crecimiento (Dill, Jung, & Sun, 2001; Peng et al., 1997; Silverstone et al., 1998). Las GAs promueven la interacción de su receptor GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (GID1) con las proteínas DELLAs. La unión de las GA con GID1 promueve la interacción entre este último y el dominio N-terminal de las DELLAs (Willige et al., 2007) Este evento aumenta la afinidad de las DELLAs con una E3 ligasa que promueve su ubiquitinización y subsecuente degradación mediante el proteosoma 26s (Griffiths et al., 2006; Murase et al., 2008; Sasaki et al., 2003; Willige et al., 2007). Con las DELLAs degradadas, los PIF (y otros factores de transcripción) quedan liberados de la represión y así las GAs promueven libremente el crecimiento y otras respuestas a GA (Achard et al., 2007; McGinnis et al., 2003).

Varias especies de plantas poseen un único gen DELLA, como *slender rice1* (*SLR1*) en arroz (Ikeda et al., 2001) o *PROCERA* en tomate (Bassel, Mullen, & Bewley, 2008; Jasinski et al., 2008; Martí et al., 2007). Sin embargo, en otras plantas, como las brasicáceas, las DELLAs han sufrido duplicaciones genómicas. Por ejemplo, el genoma de *Arabidopsis* codifica para cinco proteínas pertenecientes a esta familia: GA-INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF GA1-3 (RGA), RGA-LIKE1 (RGL1), RGL2, y RGL3 y todas muestran un dominio N-terminal DELLA así como un dominio C-terminal GRAS conservado (Peng et al., 1997; Silverstone et al., 1998).

Tanto la hormona GA como sus proteínas reguladoras han sido involucradas en las respuestas frente a diversos estreses, tanto bióticos como abióticos. Respecto a estos últimos, por ejemplo, se ha visto que las DELLAs están involucradas en la tolerancia al bajo potasio, más precisamente en *Arabidopsis* se ha observado que estas proteínas se estabilizan en condiciones de deficiencia de este metal, contribuyendo a modular flujos direccionales del mismo (Oliferuk et al., 2017). Con respecto a los estreses bióticos, ensayos realizados empleando una planta transgénica que expresa RGA mostraron que esta proteína en presencia de flagelina era menos sensible a la degradación mediada por GA (Navarro et al., 2008). Además, se observó que plantas de *Arabidopsis* cuádruples mutantes de DELLA mostraban una mayor resistencia frente al patógeno biotrófico *Pseudomonas syringae* y una mayor susceptibilidad frente al patógeno necrotrófico *Alternaria brassicola*. Por otro lado, estos autores observaron que el gen marcador de SA, el gen *PR1*, se inducía más tempranamente en las plantas cuádruples mutantes de DELLAs infectadas con *Pseudomonas* que en plantas salvajes infectadas con este mismo patógeno. Por el contrario, al infectar plantas cuádruples mutantes con *A. brassicola* se producía un atraso en la inducción del gen marcador de JA, el gen *PDF1.2*, respecto del tiempo de inducción observado en plantas salvajes infectadas con este patógeno. Estos experimentos llevaron a concluir que las DELLAs potencian la vía del JA y atenúan la vía del SA (Figura 1.10). A su vez, otro estudio mostró que las DELLAs regulan positivamente la expresión de genes involucrados en la detoxificación de ROS, reduciendo sus niveles (Achard et al., 2008). Se ha reportado que ROS puede potenciar la señalización mediada por SA, por lo que la modulación negativa de la vía SA mediada por las DELLAs podría ser explicada en base al efecto de estas proteínas sobre los niveles de ROS (Grant & Jones, 2009). Finalmente, en nuestro laboratorio, se ha reportado que la CgCP es capaz de alterar la estabilidad de las proteínas DELLAs como un mecanismo para modular negativamente las respuestas de defensa antivirales (Rodríguez et al., 2014).

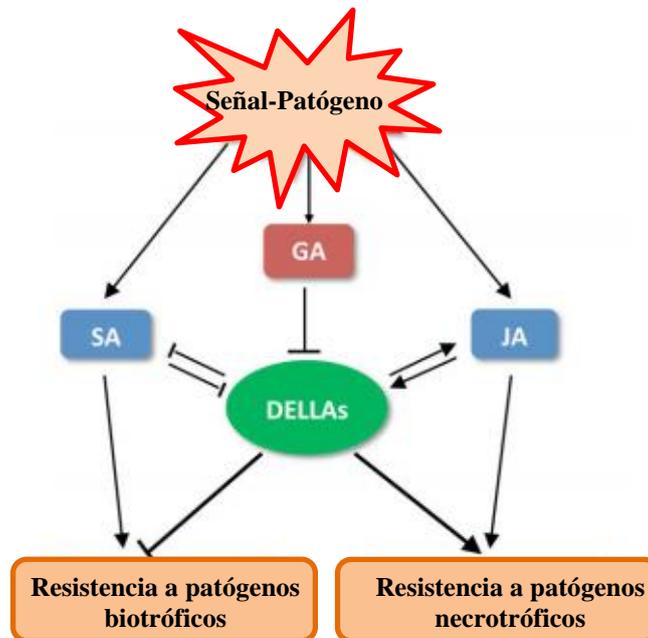


Figura 1.10: Interacciones propuestas entre las proteínas DELLAs y distintas vías hormonales en *Arabidopsis*. Las DELLAs modulan positivamente la vía del ácido jasmónico y negativamente la vía del SA. Las flechas continuas indican activación y las que finalizan con segmento muestran las inhibiciones. Tomado de (De Vleeschauwer et al., 2016).

1.5.3 El Crosstalk hormonal en la inmunidad

Como se mencionó anteriormente, las hormonas vegetales regulan las respuestas fisiológicas en las plantas, incluidas las respuestas frente a patógenos y a microbios beneficiosos. Estas funciones son llevadas a cabo a partir de lo que se conoce como interconexiones o *crosstalk* hormonal. Si bien no se han podido dilucidar todos los mecanismos mediante los cuales operan, se han descrito múltiples ejemplos de sus funciones en la inmunidad. Además de la relación antagónica SA-JA, existen otras interacciones, antagónicas o sinérgicas, entre las fitohormonas que contribuyen a la inmunidad (Figura 1.11). Por ejemplo, altos niveles de CKs potencian la vía del SA (Choi et al., 2010; Shigenaga et al., 2017). Por otro lado, se ha reportado que las vías antagónicas del SA y ABA regulan positivamente un subconjunto de genes involucrados en mecanismos de resistencia antiviral, tales como la deposición de calosa (Alazem & Lin, 2017). Una característica muy común en el *crosstalk* hormonal es que se comparten proteínas de señalización (Shigenaga et al., 2017). Por ejemplo, se observó que las DELLAs interactúan con una de las proteínas represoras de la señalización del JA, la proteína JAZ1. Por medio de esta interacción, las DELLAs secuestran a JAZ1, favoreciendo la expresión de genes de respuesta a JA (Hou et al., 2009). En ausencia de GA, las DELLAs pueden competir activamente por el factor de transcripción regulado por JA, MYC2, permitiendo así la interferencia entre las vías de

de silenciar al factor de transcripción WRKY4, mostraron mayores niveles de acumulación del virus TMV que las plantas control transformadas con el vector vacío (Ren et al., 2010). Otro trabajo realizado en *A. thaliana* mostró que plantas mutantes del factor de transcripción WRKY8 acumulaban mayores niveles de virus que las plantas salvajes (Chi et al., 2013). En este mismo estudio, se observó que el virus TMV-Cg regulaba negativamente la expresión de WRKY8 a medida que la infección progresaba. En conclusión, diversos trabajos muestran que los factores de transcripción pertenecientes a la familia WRKY tienen un rol en la modulación de las defensas antivirales.

1.7 Los factores de transcripción de la familia TGA y su rol en defensa

En *A. thaliana*, los factores de transcripción TGA representan un subgrupo de los factores de transcripción bZIP. El nombre de la familia se deriva de la capacidad de unirse a motivos "TGACG" (Katagiri et al., 1989; Lam et al., 1989). Estas proteínas reguladoras están asociadas tanto con la inmunidad como con el desarrollo y se agrupan en diferentes categorías: clado I (TGA1 y 4), clado II (TGA2, 5 y 6), clado III (TGA3 y 7), clado IV (TGA9 y 10) y clado V (Perianthia y TGA8) (Gatz, 2013). En el tabaco, la familia de factores TGA abarca seis miembros: TGA1a (Katagiri et al., 1989), PG13 (Fromm et al., 1991), TGA2.1 y TGA2.2 (Niggeweg et al., 2000), TGA8 y TGA10 (Schiermeyer et al., 2003). Todos los factores TGA de *N. tabacum* muestran similitudes de secuencia con los factores TGA de *Arabidopsis*, pero especialmente el TGA2.2 del tabaco muestra una gran similitud con el TGA2 de *Arabidopsis* (Zhang et al., 2003). Se ha observado que el Clado II es capaz de interactuar con NPR1 (Kim & Delaney, 2002; Pajerowska-Mukhtar et al., 2013; Zhang et al., 1999; Zhou et al., 2000). Por otro lado, para el Clado I también ha sido reportada su participación en la inmunidad (Shearer et al., 2012; Wang & Fobert, 2013). Adicionalmente, el Clado III posee un rol en la relación entre el SA y las citoquininas (Choi et al., 2010). En contraste con estos últimos, los clados IV y V han sido vinculados a la regulación del desarrollo. El clado V actúa como represor de la formación de pétalos (Li et al., 2009), mientras que el clado IV es esencial en el desarrollo de anteras normales (Murmu et al., 2010). Sin embargo, un trabajo reciente ha demostrado que las TGA del clado IV pueden ser inducidas por ROS y que TGA10 es requerida para la activación de varios genes en respuesta a flagelina22 (Noshi et al., 2016).

1.8 El rol multifuncional no canónico de las proteínas de los Tobamovirus durante el desarrollo de la infección viral

Como consecuencia de la limitación en el número de genes que poseen los virus, sus proteínas virales participan en varios procesos durante el ciclo viral, generando un contexto propicio para la infección (Conti et al., 2017). A continuación, se desarrollaran los posibles roles no canónicos que poseen las proteínas de los *Tobamovirus* durante la infección.

1.8.1 Efectos de la proteína replicasa de TMV

Como se mencionó anteriormente, la REP del TMV ha sido identificada como el supresor del silenciamiento. En particular, esta función está dada por proteger las transcripciones virales de las enzimas de la vía de silenciamiento (Ding et al., 2004; Kurihara et al., 2007). Además de este rol muy bien caracterizado, hay reportes que demuestran que la REP puede ser reconocida por factores del hospedante, lo que conlleva a la activación de defensas de la planta. La evidencia más estudiada es la interacción del dominio helicasa, p50, con el gen "N" del tabaco, que desencadena la muerte celular programada del hospedante, lo que resulta en una interacción incompatible (Caplan et al., 2008) En contraste, durante infecciones compatibles, la expresión transgénica de la subunidad 126 kDa en *N. tabacum* produce un aumento en la susceptibilidad a varios virus (Liu et al., 2009). Adicionalmente, la REP de TMV interactúa e interfiere con la actividad del factor de transcripción ATAF2, el cual posee dominio NAC. Además, se ha observado que al sobreexpresar este factor, la acumulación de TMV disminuye (Wang et al., 2009a). Por otro lado, también se ha visto que la REP es capaz de interactuar con el regulador Aux / IAA (ácido indolacético, del inglés) y, de esa manera, colabora con la carga viral al floema (Collum et al., 2016; Padmanabhan et al., 2008). Teniendo en cuenta todos estos datos, se podría sugerir que la proteína REP de TMV es un determinante de patogenicidad que incrementa la susceptibilidad de las plantas a las infecciones virales modulando las defensas del hospedante en una variedad diversificada de estrategias. (Figura 1.12)

1.8.2 Efectos de la proteína de movimiento de TMV

Como se mencionó previamente, la proteína MP es requerida para el movimiento de célula a célula, al permitir que el virus se traslade en células adyacentes. Por otro lado, existen otros aspectos de los efectos de MP, como la modulación de la defensa que conlleva, por ejemplo, a cambios en la fisiología del hospedante. En un trabajo previo de nuestro grupo, se ha demostrado que la expresión transgénica de la MP de TMV en *N. tabacum* produce una respuesta similar al estrés. Este fenotipo está caracterizado

por acumulación de ROS, reducción del ascorbato total, expresión de genes detoxificadores de ROS, aumento de los niveles de SA e inducción de genes que responden al SA. Estos resultados sugieren que MP podría ser visto como un inductor de la defensa, en un proceso mediado por SA y ROS (Conti et al., 2012). La expresión transgénica de MP en *N. tabacum* desencadena una respuesta particular contra la infección por TMV (inoculación con vRNAs genómicos desnudos). En una fase inicial, se observa susceptibilidad aumentada, con una rápida diseminación sistémica del virus y síntomas visibles. A pesar de ello, en una etapa más tardía, se obtiene reducción tanto de la acumulación viral como de la producción de síntomas en los tejidos en crecimiento (Conti et al., 2012). La explicación está vinculada con que inicialmente el movimiento de ARNv entre células adyacentes fue facilitado por la expresión de MP (Guenoune-Gelbart et al., 2008; Niehl & Heinlein, 2011), y esa fue la razón por la cual el virus logró una infección sistémica más rápida que la infección en plantas no transgénicas. También, alternativamente, podría argumentarse que el aumento de la expresión de β 1-3 glucanasas (PR-2) en líneas que expresan MP podría facilitar el movimiento del virus debido a la degradación de calosa en los plasmodesmos (Baebler et al., 2011). En las últimas etapas, las líneas que expresan la MP tienen un aumento del transporte de vsRNAs y también se produce la activación de la defensa inducida por ROS y SA. Ambos impactos de MP en las defensas del huésped dan lugar a la activación de una fuerte respuesta inmune y silenciamiento del ARN antiviral (Link & Sonnewald, 2016). En conclusión, la proteína MP de *Tobamovirus* puede interactuar con numerosos componentes del hospedante, produciendo un amplio espectro de efectos fisiológicos. Los efectos combinados resultan, por un lado, en la inducción de la susceptibilidad del hospedante en etapas tempranas, y por el otro, de la defensa desencadenada en las últimas etapas de la infección. (Figura 1.12)

1.8.3 Efectos de la proteína de cápside de TMV

La proteína de cápside (CP) no sólo posee un rol estructural en la encapsidación de los ácidos nucleicos, sino que también interviene en la dispersión del virus (Callaway et al., 2001). Por ejemplo, durante el transporte de larga distancia, el genoma viral suele asociarse a la CP para formar viriones, en realidad, forma complejos ribonucleoproteícos, en los cuales el genoma viral se asocia a proteínas virales y del hospedante. En la mayoría de los virus, la CP juega un rol en el movimiento viral sistémico y en el movimiento célula a célula (Carrington et al., 1996). En particular, en los *Tobamovirus* esta proteína es requerida para el movimiento a larga distancia pero no así para el movimiento entre células (Dawson, 1992; Dawson and Grantham, 1988).

Dado que la mayoría de los *Tobamovirus* viajan a lo largo del floema como ribonucleoproteínas (Callaway et al., 2001), se propuso que la CP actuara en el movimiento de larga distancia por medio de su rol en la formación de estos. Sin embargo, trabajos posteriores mostraron que el ensamblado de los viriones no era un requisito necesario para el movimiento sistémico de los *Tobamovirus*. Esto fue demostrado por medio de ensayos realizados con una quimera del virus TMV al cual se le reemplazó la secuencia codificante de la CP por una secuencia perteneciente al ORF 3 de un *Umbravirus* (Taliensky et al., 2003). Estos últimos se diferencian de la mayoría de los virus en que no codifican para una CP convencional, en cambio, poseen una proteína codificada que protege al ARN y permite el movimiento a larga distancia por medio de la formación de ribonucleoproteínas. Al reemplazar la secuencia que codifica para la CP del virus TMV por el ORF3 de un *Umbravirus*, se observó la formación de partículas filamentosas de ribonucleoproteínas, aunque estas partículas carecían de la uniformidad de los viriones. Interesantemente, estas ribonucleoproteínas fueron halladas principalmente en las células del floema, lo que demuestra que la formación del virión típico no es estrictamente necesaria para el movimiento a larga distancia de los *Tobamovirus* (Taliensky et al., 2003). Otra evidencia relacionada con el rol funcional de la CP fue observada en un trabajo publicado por Bendahmane et al (2007). En este estudio, los autores describieron ciertos virus mutantes en la proteína CP que eran capaces de armar la partícula viral, pero no podían moverse sistémicamente.

Adicionalmente, se ha demostrado que existen dominios de CP diferentes a los involucrados en el ensamblaje viral, que pueden desempeñar un papel en el movimiento a larga distancia (Xu et al., 2018). Esto sugiere que la CP viral puede participar en otros procesos, tales como: la entrada y salida del floema o en la modulación de las respuestas de las defensas del hospedante. De hecho, se ha sugerido que la CP de TMV podría estar reprimiendo respuestas de defensa y, de esta manera, podría ayudar en el movimiento sistémico (Callaway et al., 2001). En nuestro laboratorio, también han sido implicadas las CPs de *Tobamovirus* en la modulación negativa de la expresión génica sensible al SA. La expresión transgénica constitutiva de una versión mutada de la CP de TMV (CPT42W) en *N. tabacum* y también la expresión inducible de la CgCP de TMV en *A. thaliana* (Conti et al., 2012; Rodriguez et al., 2014) producen una disminución en la expresión de un conjunto de genes sensibles a SA. En el caso de *N. tabacum*, se observaron menores valores de expresión para los genes *PR1* y *RDR1*, y en *Arabidopsis*, *WRKY70*, *AOX1A* y *RDR1*. Es importante mencionar que en ninguno de estos casos se alteran los niveles de SA. También se observa que, en plántulas y plantas adultas de *Arabidopsis*, la expresión

de CgCP produce una alteración durante las primeras etapas de desarrollo, conllevando a una reducción en el crecimiento. Estos datos fortalecen la idea de que la CP de *Tobamovirus* podría tener un papel no canónico como modulador negativo de la defensa de la planta alterando genes regulados por SA (Makarov & Kalinina, 2016). Como se mencionó previamente, las proteínas DELLA son centrales en la interconexión de las diferentes hormonas. Además, se ha caracterizado la capacidad de las proteínas virales en alterar este *crosstalk* (García & Pallás, 2015). Rodríguez et al (2014) ha observado que, en mutantes de *Arabidopsis* donde cuatro de los cinco genes *DELLA* están ausentes, aumentan los niveles de SA y existe una fuerte inducción de genes dependientes de esta hormona ante la infección con *P. syringae*. Además, estas plantas mutantes poseen menor acumulación viral. Por otro lado, la presencia de CgCP es capaz de retrasar la degradación de una de las cinco proteínas DELLA, RGA. Estos hallazgos sugieren que la estabilización de las proteínas DELLA durante la infección viral puede estar aumentando la susceptibilidad de las plantas a virus (Rodríguez et al., 2014).

1.8.4 Dinámica de los mecanismos de modulación de inmunidad mediada por las diferentes proteínas de TMV

Como se ha visto a lo largo de esta introducción, las proteínas de TMV poseen diferentes funcionalidades en la modulación de la inmunidad del hospedante durante la progresión de la infección. En la Figura 1.12, se esquematiza una visión integradora de la interacción planta-virus basada en el modelo zigzag de (Jones & Dangl, 2006; Zvereva & Pooggin, 2012).

En una etapa temprana, el virus ingresa y se desencapsida. Seguidamente, se inicia la replicación, donde interviene la REP. Este primer paso desencadena una respuesta del hospedante: silenciamiento de ARN. Los dsRNA intermedios producidos durante los procesos de replicación son reconocidos por la maquinaria de silenciamiento y desencadenan la producción de ARN pequeños derivados de virus (vsiRNAs, del inglés) que dirigen al complejo de silenciamiento hacia el genoma viral. En este contexto, el dsRNA actúa como un PAMP y desencadena la activación del silenciamiento como una respuesta antiviral PTI. En el caso de TMV, la primera ronda de contra-defensa viral involucra la proteína REP, que antagoniza el silenciamiento por la actividad de supresor del silenciamiento e induce una contra-respuesta viral de ETS (susceptibilidad activada por el efector). La REP mantiene el sistema en equilibrio, permitiendo que el virus continúe con el proceso de infección incluso con la inmunidad de silenciamiento activa.

La MP es la segunda proteína que se acumula en las células infectadas y se requiere para el movimiento de célula a célula. Esta actividad marca la siguiente etapa de la infección, la etapa intermedia en la que el virus inicia la propagación localizada. La acumulación de MP tiene un efecto sobre la virulencia al estimular las respuestas de defensa del huésped en el frente principal de la infección. MP induce la sobreacumulación de SA y ROS, aumenta los niveles de expresión de genes de respuesta a SA y regula negativamente los genes de detoxificación. Además, la MP facilita el movimiento de los ARNs virales a través de los plasmodesmos, de manera tal que también posee un rol en el silenciamiento antiviral.

Después del movimiento de célula a célula para llegar a las nervaduras principales y entrar en los tejidos vasculares, se inicia un proceso de propagación sistémica del virus. El movimiento del virus en el floema requiere la participación de la CP (Callaway et al., 2001; Hilf & Dawson, 1993). La acumulación de esta proteína viral alcanza sus niveles más altos en las últimas etapas de la infección, convirtiéndose en el componente viral más abundante traducido en los tejidos del hospedante. Aquí, toda la maquinaria de la defensa antiviral está activa en todo el huésped. Por lo tanto, el virus requiere una nueva estrategia para contrarrestar la defensa y continuar así con la infección. El rol multifuncional de esta proteína está asociado con la modulación negativa de las defensas del hospedante que actúa como un potenciador de la virulencia.

En el trabajo de Rodríguez et al (2014), se observa un aumento de la expresión de genes dependientes de SA en etapas tempranas e intermedias de la infección con TMV; mientras que en las tardías se visualiza una disminución de estos. Teniendo en cuenta todo lo antedicho para las proteínas de TMV, el modelo proporcionado por la Figura 1.9 propone que las proporciones de los componentes virales influyen en el equilibrio entre las diferentes fuerzas (respuestas de defensa y contradefensa). La activación de los mecanismos de defensa mencionados anteriormente es necesaria para que el hospedante responda a la infección. Según estos autores, la activación de tales respuestas de defensa puede, sin embargo, resultar en efectos secundarios no deseados perjudiciales para los procesos normales de desarrollo y/o el crecimiento de la planta. Dichos efectos secundarios, que pueden ser la causa central del desarrollo de los síntomas de la enfermedad, pueden originarse a través de procesos diferentes como la interferencia en la señalización de una hormona, redirección de la expresión génica del crecimiento a las respuestas de defensa y/o por efectos de procesos indirectos, como el doble uso de la maquinaria del silenciamiento de ARN y vías de miARN (Conti et al., 2017).

Teniendo en cuenta estos hallazgos de nuestro grupo y las evidencias presentes en la bibliografía, se puede formular una hipótesis en donde la regulación negativa de las defensas antivirales mediada por CP estaría facilitando el movimiento del virus a tejidos sistémicos (Figura 1.12)

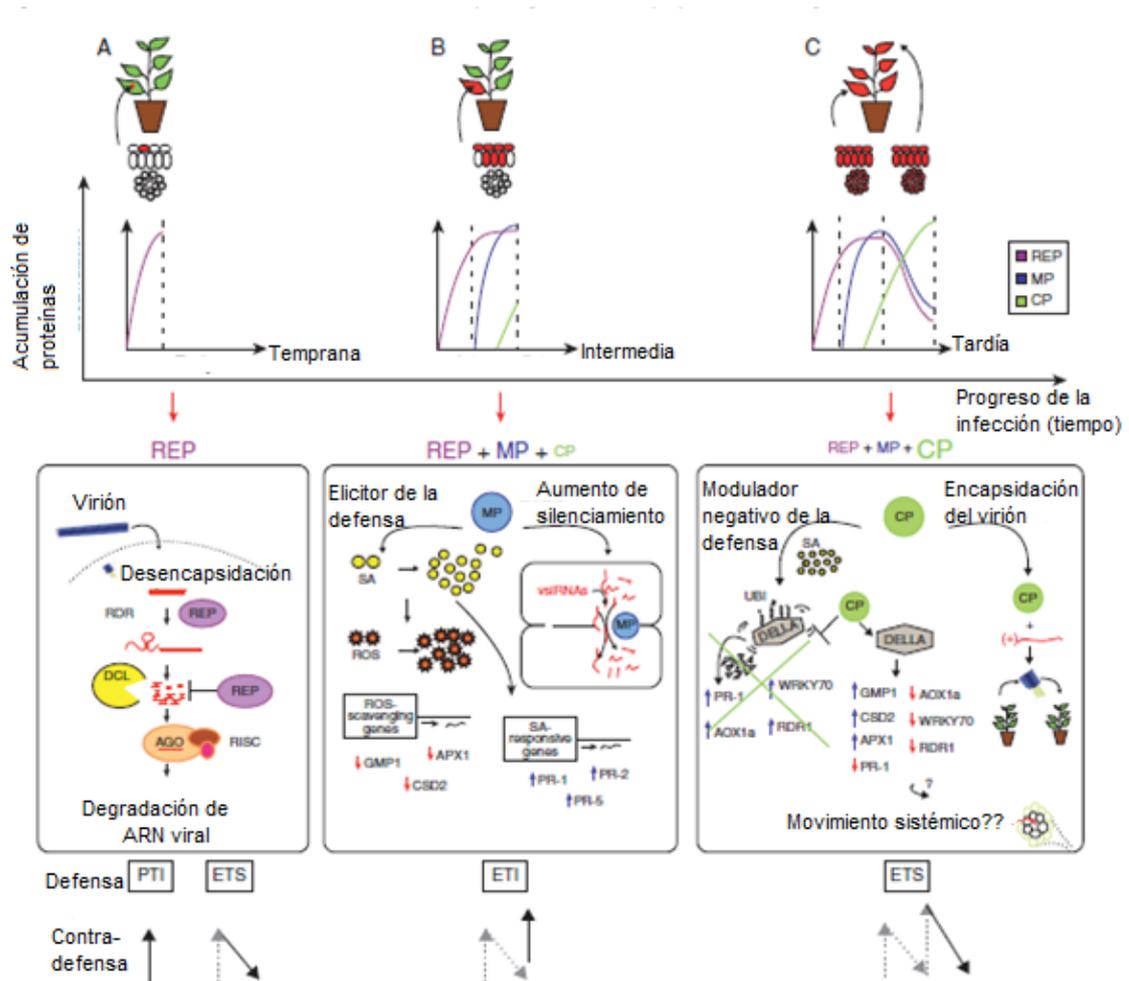


Figura 1.12: Esquema de la dinámica de los mecanismos de modulación de inmunidad mediada por las diferentes proteínas de TMV. (A) En las primeras etapas de una sola célula de la infección, la eliminación del ARN viral (PAMP viral) desencadena la activación del silenciamiento de ARN como primera barrera de defensa antiviral (PTI antiviral). La replicasa es la primera proteína viral a traducir y presenta actividad de supresión del silenciamiento (ETS viral). En la parte inferior de este panel, se muestra el modelo representativo en zig-zag. En etapas intermedias de la infección, la MP inicia la acumulación viral y permite que el virus invada las células adyacentes facilitando el paso a través de plasmodesmos. La MP es detectada por el hospedante y activa las defensas inmunes, lo que desencadena una respuesta antiviral ETI. Actúa como un elicitador de defensa mediado por la inducción de ROS y permitiendo la acumulación de SA, inducción de genes que responden a esta hormona y regulación de los genes detoxificadores de ROS. También actúa como un potenciador del silenciamiento de ARN, mediando la facilitación del transporte de ARN pequeños derivados de virus (vsiRNAs, del inglés) a través de los plasmodesmos. En la parte inferior de la figura, se muestra el modelo representativo en zig-zag. (C) Durante las últimas etapas de la infección, la CP se convierte en la proteína viral más abundante acumulada en las células infectadas. La CP participa en el movimiento sistémico, permite el ensamblaje de nuevas partículas virales y está implicado en la modulación negativa de la inmunidad del hospedante, dando lugar a una nueva ronda de ETS viral. Cp suprime las respuestas de defensa mediadas por SA, es decir regula negativamente la defensa a través de la estabilización de las proteínas DELLA. En la parte inferior de la figura, se muestra el modelo representativo en zig-zag. Replicasa (REP), proteína de movimiento (MP), proteína de cápside (CP). Tomado de Conti et al (2017).

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo General

El objetivo general del trabajo es comprender el rol específico de la proteína de cápside de TMV en la infección viral más allá de su rol estructural en el virión. Por lo tanto, esta tesis tiene como foco entender con un mayor grado de integración los mecanismos de defensa (inmunidad) y contradefensa (acción viral) que tienen un rol en la interacción planta virus, su desenlace y la producción de sintomatología asociada.

Los objetivos específicos propuestos son:

1) Identificar la red génica interviniente en la modulación del sistema inmune mediado por la expresión de la CP de TMV.

-Empleo de herramientas bioinformáticas y de información disponible en bases de datos para ampliar y profundizar el estudio del efecto de la CgCP sobre la modulación del sistema inmune del hospedante *A. thaliana*.

-Identificación de regiones promotoras con el fin de establecer sitios de reconocimiento de factores de transcripción que permitan establecer los mecanismos de corregulación.

2) Identificar el mecanismo de acción por el cual la CP de TMV modula el sistema inmune.

-Selección y validación de genes candidatos a partir de la red obtenida en el objetivo 1.

-Caracterización funcional y estudio del rol que juegan estos genes en la modulación del sistema inmune utilizando plantas *knockout* de *Arabidopsis thaliana*.

3) Evaluar si la acción de la CP de TMV en el sistema inmune del hospedante es requerida para el movimiento sistémico del virus en el transcurso de la infección.

Diseño y obtención de clones infectivos de TMV fusionados a genes reporteros (GFP), tanto de virus completos como defectivos de la CP (incapaces de moverse sistémicamente), como herramienta para visualizar el avance de la infección en los hospedantes *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana tabacum*.

-Análisis del rol de la estabilización de las proteínas DELLAs mediada por CP en la propagación del TMV hacia tejidos sistémicos.

-Establecimiento de estrategias experimentales que permitan la evaluación del movimiento sistémico de clones infectivos de TMV, luego de reducir los niveles de

expresión de los genes candidatos seleccionados (mediante el uso de la técnica de VIGS, ARNs de doble cadena, etc), con el fin de estudiar su vinculación con el movimiento a larga distancia del virus.

Sobre la base de los resultados obtenidos previamente en el laboratorio se han planteado las **hipótesis** que se describen a continuación:

Hipótesis 1: *La proteína CP produce cambios en la regulación de la defensa del huésped que modulan la infectividad contribuyendo a la generación de síntomas.*

Hipótesis 2: *La modulación negativa del sistema inmune mediada por la proteína CP es requerida para el movimiento sistémico del virus TMV.*

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material Vegetal empleado

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas son del ecotipo Columbia (Col-0). Se utilizó una línea mutante del gen *NPR1* (AT1G64280), denominada *npr1 1-3* (número de identificación del Arabidopsis Information Resource, TAIR: CS3802), la cual fue gentilmente cedida por el Dr. Gustavo Gudesblat (IBBEA-UBA). También se utilizó la línea mutante del gen *TGA10* (AT5G06839), (cuyo número de identificación es SALKSEQ_124227.0). Se confirmó homocigosis para esta línea en nuestro laboratorio. Además, se empleó una línea de *Arabidopsis* transgénica, que expresa la proteína de capsido (CP) del virus TMVCg bajo un promotor inducible, denominada CP#72 (Koo et al., 2004).

Para los ensayos de estudio del movimiento viral, se utilizaron plantas salvajes de la especie *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana tabacum* (Cultivar Xanthi nn (Sx)). También, se emplearon plantas transgénicas de *N. benthamiana* y *N. tabacum* denominadas NahG. El gen nahg fue aislado de la bacteria *Pseudomonas putida*, que codifica para una enzima llamada salicilato hidroxilasa, la cual metaboliza al ácido salicílico (SA, del inglés) para convertirlo en catecol, evitando así su acumulación (Delaney et al., 1994; Gaffney et al., 1993). Adicionalmente, para la cuantificación de partículas virales se emplearon *N. tabacum* (cultivar Samsun NN). El gen n fue descrito en *N. glutinosa* y, posteriormente, utilizando técnicas de mejoramiento genético convencionales, fue transferido a *N. tabacum*.

Para los ensayos realizados en *A. thaliana*, las plantas fueron crecidas en una cámara Percival en condiciones controladas, bajo un fotoperiodo de día largo: 16 horas (hs) de luz, 8 hs de oscuridad y una temperatura de 23/21°C día/noche respectivamente. Para los ensayos realizados en *Nicotiana*, las plantas fueron crecidas en invernaderos con temperaturas controladas dentro de un rango de 20 a 26 °C con ciclos de 16 hs de luz suplementada y 8 hs de oscuridad.

2.2 Protocolos generales de Biología Molecular

Las técnicas utilizadas para el desarrollo de esta tesis: extracción de DNA plasmídico, digestión con enzimas de restricción, obtención y transformación de células *Escherichia coli* o *Agrobacterium tumefaciens* química y electrocompetentes, respectivamente, electroforesis de DNA en geles de agarosa y de PCR se realizaron según protocolos clásicos (Green y Sambrook, 2012). También se hizo uso de la tecnología de Clonado por sistema Gateway®. La purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa se realizó con el kit QIAEX II Gel Extraction (Qiagen®) y las purificaciones de ADN plasmídico de alta calidad para secuenciación se realizaron con columnas del kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen®) según lo indicado en el manual de uso. La secuenciación de todas las construcciones obtenidas fue realizada por el método de Sanger mediante electroforesis capilar en el servicio de secuenciación del Instituto de Biotecnología del INTA Castelar.

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

Para la extracción de ARN en muestras de *Arabidopsis* se recolectó el tejido de la roseta por encima de la hoja número tres, la cual fue infectada. Para las muestras de *N. benthamiana* y *N. tabacum* se recolectaron 12 discos de hoja de aproximadamente 0,5 cm, y se extrajo el ARN total. En ambos casos, las muestras fueron procesadas en nitrógeno líquido utilizando *Trizol Reagent* (Invitrogen®), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ARN se cuantificó por espectrofotometría mediante Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies) y posteriormente fue tratado con la enzima DNasa I (Invitrogen®). El ADNc (ADN copia) se sintetizó con la enzima retrotranscriptasa MMLV (Invitrogen®) y oligonucleótidos al azar siguiendo las indicaciones del fabricante (Invitrogen®). Los detalles experimentales de la confección del ADNc se listan en el Anexo A.

2.2.2 Diseño de oligonucleótidos

Para evaluar la expresión de distintos genes se utilizó qPCR y para ello se diseñaron oligonucleótidos específicos mediante el Sitio Primer3 (versión 0.4.0). La lista de oligonucleótidos utilizados para la amplificación se detalla a continuación en la Tabla 2.1.

Gen	Muestra	Secuencia
AtERF6	<i>Arabidopsis</i>	pFw: TCGAATCCTCCTCGCGTACTG pRv: TTCGGTGGTGCATCTTCAACG
AtCNI1	<i>Arabidopsis</i>	pFw: CCATGGCTGTTGTGCTTGTAG pRv: GCGTTCGTCACTCTCCTCT
At1g05575	<i>Arabidopsis</i>	pFw: ATTTTTGCTCTGATTCAAGGG pRv: TCCTGCGGATACTGATGGA
AtXLG2	<i>Arabidopsis</i>	pFw: GCACCGTTCTTCACCACAC pRv: CATTCACTACTTCTCTCCCGT
AtMKS1	<i>Arabidopsis</i>	pFw: ATCTGTGGTCCTCGTCCTTC pRv: CGTAGATAACCACCGGCTCT
AtPCRK1	<i>Arabidopsis</i>	pFw: GAAAAGCGATGTGTGGGGTT pRv: GGTACTTCCCTTCCAGCCTT
AtPAP2c	<i>Arabidopsis</i>	pFw: GAAGACGGACCAAGCGATTC pRv TAGCGCCACCATGAGAAAGA
AtUBQ5	<i>Arabidopsis</i>	pFw: CGGACCAGCAGCGATTGATT pRv: ACGGAGGACGAGATGAAGCG
CP (tmv-cg)	<i>Arabidopsis</i>	pFw: TGTCGCAATCGTATCAAAC pRv: CTGTATCTGGAAACCGCTG
NtTGA10	<i>Nicotiana</i>	pFw: TGGGATTTGAGAGAGCTTTTG pRv: TGATGCTGACCTCCAAATGA
NbWRKY8	<i>Nicotiana</i>	Fw: GCTAGGGGCAGTGGCATAAA Rv: GGAGACTGTTGCGGCCTTAT
CNI1-like	<i>Nicotiana</i>	pFw: CTCAATCCACCTTTGGCAAT pRv: ATAACCGCTGCATCAAGTCC
ERF6-like	<i>Nicotiana</i>	pFw: GAAGCGGCTAGAGCTTACGA pRv: CTCAACCACCGTCACTTCT
ACTINA	<i>Nicotiana</i>	pFw: ACGCCAGTGGCCGTACAACA pRv ATCGCGGACAATTTCCCGTTC

Tabla 2.1: Secuencias de oligonucleótidos utilizados para las reacciones de qPCR. Además se incluye la columna “muestra” que indica si el tejido analizado proviene de *Arabidopsis* o *Nicotiana*.

2.2.3 RT-qPCR, obtención y análisis de datos de expresión génica

Las condiciones experimentales para la confección de las qPCR se establecieron a partir de las normas internacionales MIQE (Bustin, 2010). Los datos y controles requeridos por esta norma se detallan en el Anexo A. Para obtener el valor de expresión diferencial de un gen específico en una línea transgénica con respecto al control, se deben normalizar los datos utilizando un gen de referencia como control interno. Para la selección de los mismos, se utilizaron trabajos previos del laboratorio donde se establecieron genes de referencia en los diferentes sistemas utilizados. Para el caso de *Arabidopsis*, el gen de referencia fue UBQ5 (AT3G62250) (Tesis Rodriguez,

2015); mientras que para los ensayos de *Nicotiana* se utilizó *ACTINA* (SGN-U431117) (Tesis Conti, 2013). Los análisis de expresión relativa fueron analizados mediante el software *fgStatistics* (Di Rienzo, J; Casanoves, F.; Gonzalez, L.; Tablada, E.; Díaz M.; Robledo, C.; Balzarini, 2001)(Di Rienzo J. A, 2009) que utiliza el algoritmo desarrollado por Pfaffl (Pfaffl, 2001) para obtener los valores de expresión relativa. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos niveles de expresión cuyos p-valores fueron menores a 0,05 (indicados con *).

2.3 Ensayos Funcionales para el estudio de Movimiento Sistémico en plantas de *N.benthamiana*/*N.tabacum*

2.3.1. Silenciamiento génico inducido para la realización de ensayos funcionales en *N. benthamiana*/*tabacum*

2.3.1.1 Construcción de vectores para Silenciamiento Génico Inducido por Virus (VIGS)

Para la amplificación de un fragmento de ADNc de *NbNPR1* en *N. benthamiana*, se utilizaron oligonucleótidos descritos en el trabajo de Liu et al. (2002).

Las secuencias utilizadas fueron: 5'- GAAAGAGCCTAAAATTGTAGTGTC -3' y 5'CTATTTCTAAAAGGGAGCTTATT -3'. Se obtuvo un fragmento de ADNc de 753 pares de bases (pb) que fue clonado en un vector pCR8/GW/TOPO (Invitrogen®) y posteriormente verificado mediante secuenciación Sanger. El fragmento de NPR1 fue introducido en un vector pTRV2-GW (Liu et al., 2002), mediante una reacción de recombinación LR (*LR Clonase Enzyme Mix* de Invitrogen®). Plásmidos conteniendo el fragmento *NbNPR1* (pTRV2-Nbnpr1) fueron electroporados en la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* y cultivados en medio selectivo Luria-Bertani (LB) con diferentes antibióticos: rifampicina (100 µg/mL), gentamicina (50 mg/L) y kanamicina (50 mg/L). Para obtener el constructo control se utilizaron oligonucleótidos que permitieran aislar una región del gen *uidA* de la -glucuronidasa (GUS): 5'- GATAGCGCGTGACAAAAACC-3' y 5'- GGGATCCAGGCCTTTGTTTGCCTCCCTGCTG-3' que fue clonado y verificado por secuenciación Sanger de la misma manera que los anteriores.

2.3.1.2 Construcción de vectores para horquillas de silenciamiento (hp)

Los amplicones de *NbNPR1* y *gus* obtenidos en el punto 2.3.1.1 fueron clonados en el vector pB7GWIWG2(II).

Para la amplificación de los genes *NbRAR1* y *NbEDS1* se utilizaron oligonucleótidos descritos en el trabajo de (Liu et al., 2002):

NbRAR1:

5'-AGGAAAGCACACAACAGAAAAACC-3'

5'-GTGCCATCCTTTGGTGCATGGAGG-3'

NbEDS1:

5'-GAGTATCAGACCAAGTGTGATATCCG-3'

5'-GCTGAGGTGGGAGTGTTTTCCACC-3'

Se obtuvieron dos fragmentos de 468 pb y 548 pb, respectivamente.

Para *TGA10*, se tomó la secuencia descrita como ortóloga del gen de *Arabidopsis* en *N.tabacum* (Schiermeyer et al., 2003), y en el caso de *WRKY33* se obtuvo su ortólogo caracterizado, *NbWRKY8*, a partir del trabajo publicado por Ishihama et al (2011). Para el caso de *CNI1* y *ERF6* se utilizó la herramienta “*Basic Local Alignment Search Tool*” (BLAST) que posee el sitio *Sol Genomics Network*. Se verificó la búsqueda a través del sitio *Orthodb* (Kriventseva et al., 2015, 2019; Waterhouse et al., 2013). Se obtuvieron las secuencias de *N.benthamiana CNI1-like* y *ERF6-like*, respectivamente.

Las secuencias seleccionadas fueron analizadas mediante la herramienta VIGS del sitio *Sol Genomics Network* para elegir la zona a utilizar como disparador de silenciamiento ((Fernandez-Pozo et al., 2015). El algoritmo que utiliza esta sección simula “*in silico*” los procesos de silenciamiento génico inducidos por los virus, que ocurren en una célula. Se obtiene así una secuencia de un tamaño definido por el usuario y los posibles alineamientos con genes de la misma familia. La herramienta selecciona el mejor fragmento (por medio de una puntuación) tal que sea lo más exclusiva y específica del gen a silenciar (para así reducir el impacto en los “*off-targets*”). Seguidamente, se procedió a diseñar los oligonucleótidos mediante el Sitio *Primer3* (versión 0.4.0), cuyas secuencias se encuentran detalladas en la Tabla 2.2.

Los productos de amplificación obtenidos fueron clonados en el vector pCR8/GW/TOPO y luego de ser secuenciados, se subclonaron en el vector binario pB7GWIWG2 (II). Las construcciones fueron introducidas en la cepa GV3101 de *A. tumefaciens* por electroporación y cultivadas en medio selectivo LB con rifampicina (100 µg/mL), gentamicina (50 mg/L) y spectomicina (50 mg/L).

Gen	Oligonucleótidos diseñados	Tamaño del amplicón (pb)
<i>NtTGA10</i>	Fw: AAGACAGTGCTGGCGCTTAT Rv: CTCGCTTAGCAGCTTTTGGT	315
<i>NbWRKY8</i>	Fw: TCGACGACGAAGAAGAACCA Rv: CCCCTAGCTGCTGGAACATC	325
<i>CNI1-like</i>	Fw: GGACTTGATGCAGCGGTTAT Rv: TTGAAGCTCAGTCCCCAGTT	320
<i>ERF6-like</i>	Fw: CACCTTCCACCCCTTTGC Rv: TTGCAGCAAAGTCATCCATC	318

Tabla 2.2: Se especifican las secuencias de oligonucleótidos diseñadas para inducir el silenciamiento de los genes correspondientes. La búsqueda de la secuencia se realizó a través del sitio Sol Genomics Network y para la confección de los oligonucleótidos se utilizó Primer3 (versión 0.4.0).

2.3.1.3 Agroinfiltración y confirmación del silenciamiento

Para los ensayos de VIGS, se cultivaron en medio LB selectivo *Agrobacterium* GV3101 transformadas con plásmidos pTRV1, pTRV2-gus (controles) y pTRV2-NPR11 durante 24 hs a 28°C. Para las horquillas de silenciamiento, se cultivaron en medio selectivo las *Agrobacterium* GV3101 transformadas con los plásmidos *hp-NbNPR1*, *hp-GUS*, *hp-NtTGA10*, *hp-NbWRKY8*, *hp-NbEDS1*, *hp-NbRAR1*, *hp-ERF6-like* o *hp-CNI1-like*. Las células fueron centrifugadas y los sedimentos bacterianos se resuspendieron en una solución de MES (10 mM MgCl₂ y 10 mM MES) con 200 mM de acetosiringona, y una OD600 de 1. La suspensión fue mantenida a temperatura ambiente durante 3/4 hs. Posteriormente, solo en el caso de la técnica VIGS, se mezclaron alícuotas equivalentes de GV3101-pTRV1 y pTRV2 con las distintas construcciones (*GUS* o *NPR1*). En el caso de las horquillas, dado que solo es un plásmido por tratamiento, se realizó la infiltración con cada uno de los cultivos de *Agrobacterias* previamente transformados con los diferentes constructos.

Como siguiente paso, se agroinfiltraron plantas de 4 o 5 hojas de *Nicotiana benthamiana* o *N. tabacum* como fue previamente descrito por Liu et al. (2002). Se colectaron muestras de tejido foliar 7 días posteriores luego de transcurrida la agroinfiltración. Las infiltraciones se realizaron con una jeringa sin aguja mediante la aplicación de una presión contra la parte abaxial de la hoja. En estos experimentos se usaron hojas jóvenes que estuvieran ampliamente expandidas (tercera a quinta hoja). Las muestras se congelaron a -80°C y se confirmó el silenciamiento de los distintos genes correspondientes a cada tratamiento mediante qPCR utilizando oligonucleótidos específicos, que amplifican una región del gen no contenida en el fragmento utilizado para la inducción del silenciamiento (ver sección 2.2.2).

2.3.2 Agroinfiltración de GAI-YFP y M5-YFP y confirmación por Western blot

Para este experimento se emplearon hojas de *N. benthamiana* y *N. tabacum* las cuales fueron agroinfiltradas con diferentes tratamientos: GAIYFP/ M5YFP/GV3101. A los 3 días luego de la agroinfiltración, las hojas fueron infectadas con los viriones y se evaluó el movimiento sistémico. El protocolo de infiltración fue detallado en el punto 2.3.1.3. Algunas plantas no fueron infectadas para poder extraer tejido y realizar el punto 2.3.2.1.

2.3.2.1 Extracción de proteínas para Western Blot

Las plántulas congeladas fueron maceradas con émbolos en microtubos que contenían 50 µl de buffer de extracción (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 10% glycerol, 0.1%; NP-40, 1 mM; *phenylmethylsulfonylfluoride* (PMSF) y se le agregó un cocktail inhibidor de proteasas (Roche, Basel, Suiza) (Leone et al., 2014)

2.3.2.2 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

La concentración de proteínas de cada muestra se calculó por el método de Bradford. Se agregaron 1µl de muestra en 799 µl de agua. A cada microtubo se le adicionaron 200 µl de reactivo Bradford. Se incubaron los tubos en oscuridad y se usó albúmina de suero bovino para realizar las curvas de calibración. Las lecturas de absorbancia se hicieron a 595 nm usando un espectrofotómetro (Bradford, 1976).

2.3.2.3 Análisis de proteínas por Western Blot

Para evaluar la presencia de las proteínas DELLAs agroinfiltradas (GAI-YFP y M5-YFP, empleamos un anticuerpo monoclonal dirigido contra GFP (IgG de conejo anti-GFP). Los extractos proteicos fueron resueltos en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%. Se armaron geles desnaturizantes (0,1% SDS) de 12% en celdas Bio-Rad 220. Las muestras a ser analizadas se prepararon agregándoles los volúmenes correspondientes de buffer de siembra 5X (0,625 M Tris/HCl pH 6,8; 2% SDS; 0,5% β mercaptoetanol; 10% de glicerol; 0,5% azul de bromofenol) y calentándolas por 5 min a 100°C. Como buffer de corrida se usó Tris-Glicina- SDS 1x. Al finalizar la corrida, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de PVDF (ThermoScientific, Rockford, USA). La transferencia se hizo en una cuba de inmersión (Bio-Rad, CA, USA) utilizando un buffer de Tris-glicina 1x, etanol 20% durante 1 h a 90 volts. Una vez transferidas, las membranas fueron teñidas

con una solución de Rojo Ponceau (650mM rojo Ponceau, 1% ácido acético) para confirmar la correcta transferencia de las proteínas.

Como paso siguiente, las membranas se incubaron durante 1 h con solución de bloqueo (leche descremada 5% en buffer TBS-Tween) y luego con el anticuerpo primario anti GFP diluido 1:1000 durante toda la noche a 4°C. Posteriormente las membranas se lavaron 3 veces con TBS-Tween 15 minutos c/ u y se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario anti conejo conjugado con fosfatasa alcalina (AP) diluido 1:5000 y se repitieron los tres lavados. El anticuerpo secundario se diluyó en leche descremada 1%.

Para el revelado se utilizó los sustratos NBT (Nitroblue tetrazolium, Sigma-Aldrich) y BCIP (5 bromo-4 cloro-3 indoil fosfato, Sigma-Aldrich), siguiendo las especificaciones del fabricante en oscuridad hasta la aparición de bandas.

2.3.3 Tratamiento con Paclobutrazol

Se rociaron hojas de *N. benthamiana* y *N. tabacum* con 5 ml de Paclobutrazol (PAC) (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI, USA) 50µM por planta. Como control se utilizó agua. A las 72 hs pos tratamiento, se realizó una nueva aplicación, previa a la infección con el virus TMVΔCP-GFP y se evaluó el movimiento sistémico.

2.3.4 Ensamblado de viriones y cuantificación

Para poder obtener viriones a partir de construcciones infecciosas mediante Agroinfiltración, se infiltraron hojas de *N. benthamiana* (ver 2.3.1.3) y luego de 5 días post infección (d.p.i) se tomaron muestras del mismo tejido agroinfiltrado. En el caso de TMVΔCP-GFP, fue necesario coagroinfiltrar una solución de bacterias transformadas previamente con dicha construcción y una con agrobacterias que contenían un clon infecciosos del virus PVX PVXΔCP-CP_{TMVU1} que expresaba en forma heteróloga la CP de TMV. De esta forma fue posible la producción de viriones con el genoma de TMVΔCP-GFP. Seguido de ello, se molió el tejido con una solución NaHPO₄ 20 mM a pH 7 y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir la degradación de productos no deseados (ARN de PVX residual o viriones TMVΔCP-GFP mal ensamblados). Para observar la viabilidad del inóculo y poder cuantificar se tituló el virus en plantas marcadores *N. tabacum* NN. Se infectaron hojas expandidas de con 20µ de distintas diluciones seriadas, y se eligió como dilución de trabajo aquella que generaba aproximadamente 100 lesiones locales por hoja.

2.3.5 Procedimiento de infección con TMV

Para inocular plantas de *tabaco* o de *N. benthamiana*, se frotó delicadamente una hoja expandida con carborundum y 20 μ l de una solución de NaHPO_4 20 mM a pH 7, conteniendo viriones de TMV o TMV Δ CP, según cada caso.

Para el caso de inoculación de *Arabidopsis* el procedimiento fue similar, solo que en este caso se seleccionó la tercer hoja de plantas con 8 hojas verdaderas (20 días de edad aproximadamente) y se roció a esta hoja con carborundum. Posteriormente, se agregó 5 μ l de una solución conteniendo el virus TMV-Cg diluido en una solución de 20 mM NaHPO_4 (pH 7) y se procedió a la abrasión suave de la superficie de la hoja.

En ambos casos, en las plantas mock-inoculadas (no infectadas) la abrasión se realizó en presencia de buffer. Todas las infecciones fueron realizadas luego del mediodía. Las muestras de tejido sistémico (excluyendo la hoja inoculada) fueron tomadas a días post infección. Las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y guardadas a -80°C hasta la extracción de ARN.

2.3.6 Análisis estadísticos de ensayos de movimiento sistémico

El análisis estadístico de los ensayos de movimiento se realizó utilizando modelos lineales mixtos generalizados (GLMM). Se empleó el software estadístico libre R (R Core Team R-core@r-project.org) y el paquete lme4, que permite ajustar modelos lineales mixtos generalizados (Bates et al., 2015).

Se evaluó la probabilidad de existencia del movimiento viral como el número de plantas que presentan movimiento sistémico (presencia del gen reportero GFP en tejidos distintos a la hoja donde se realizó la infección local) sobre el número total de plantas por tratamiento. Dado que la distribución de probabilidades de esta variable se ajusta a una distribución de tipo binomial, conteo sobre un número definido de experimentos, el análisis se realizó utilizando modelos lineales mixtos generalizados, indicando la familia de distribución “Binomial” y empleando la función de enlace “logit” para vincular la esperanza de la variable respuesta al predictor lineal. Este modelo permite además contar con experimentos desbalanceados, es decir, que no tienen los mismos tratamientos en todos los ensayos. Para definir el número de casos totales por experimento, se empleó como covariable el número total de plantas en la misma al momento de la evaluación. A fin de evaluar la existencia de interacción tratamiento x ambiente, se incorporó el factor de efecto aleatorio de interacción tratamiento por ambiente a los diseños experimentales.

Los modelos selectos para cada variable fueron ajustados a la totalidad de los datos relevados a través de los distintos ensayos evaluados, con el factor tratamiento como

efecto fijo para obtener las medias fenotípicas ajustadas de cada tratamiento. Estas medias fueron implementadas en los análisis multivariados de los distintos ensayos.

Para todas las variables estudiadas, las comparaciones múltiples entre medias se hicieron aplicando la prueba de comparaciones múltiples DGC (Di Rienzo et al.,2001), utilizando distintos niveles de significación: 0,1, 0,05 y 0,001.

2.4 Análisis bioinformáticos

2.4.1 Empleo del programa ATTED para la generación de redes de coexpresión

El programa ATTED fue empleado para realizar un análisis bio-informático de los genes coexpresados. Este programa emplea el coeficiente “Mutual Rank” (MR) como medida de coexpresión entre dos genes. El MR es calculado a partir de la media geométrica de los valores del coeficiente de “PCC Rank” (rango del coeficiente de coexpresión). Además, para cada gen de interés ATTED presenta los 300 genes más cercanamente coexpresados e informa el valor de MR.

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

Para la búsqueda de motivos sobre-representados en el set de promotores, se siguió una aproximación sesgada (Timothy L. Bailey, 2008). Esta aproximación se basa en el ensamblado de un pequeño set de secuencias y en la búsqueda de motivos sobre-representados en dichas secuencias respecto de un set de secuencias control (“*background model*”). Los pasos básicos del análisis de promotores son: el ensamblado de las secuencias, la limpieza de las secuencias, la búsqueda de motivos y la evaluación de los mismos.

Para el ensamblado de las secuencias se procedió a seleccionar un conjunto de genes cuya expresión estaba alterada por efecto de la expresión de CgCP y ampliar dicho set por medio del programa ATTED, el cual permite encontrar genes que tienden a coexpresarse con los genes de interés. Este análisis presupone que los genes cuya expresión es alterada por la proteína de cápside, y los genes que coexpresan con este set de genes, comparten elementos regulatorios comunes en sus promotores y que dichos elementos se encuentran sobre-representados, con respecto a secuencias tomadas al azar. Luego de seleccionar los genes, se procedió a extraer 1000 pb correspondientes a la región promotora de los mismos. Para la extracción de las regiones promotoras, se empleó el programa RSA Tools (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>), el cual permite obtener en un archivo FASTA la lista de las regiones de interés de un gran número de organismos, entre ellos *A.thaliana*. El siguiente paso consistió en

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

Una vez depuradas las secuencias, se procedió a la búsqueda de motivos por medio del empleo de distintos algoritmos; para ello se emplearon los programas Weeder, MEME y BioProspector (Bailey et al., 2009). Uno de los parámetros más importantes a definir en la búsqueda de motivos, es la longitud de los mismos. Por medio del programa Weeder se buscaron motivos con longitudes de 6, 8, 10 y 12 pb, con MEME se buscaron motivos de 10, 12 y 14 pb y con BioProspector se buscaron motivos de 8, 10, 12 y 14 pb. Por medio de este análisis se obtuvieron 75 motivos, de los cuales 17 están sobrerrepresentados ($p < 0.05$). Para eliminar motivos redundantes, se agruparon los motivos similares y se obtuvieron 9 motivos no redundantes por medio del programa STAMP. Este programa también permitió analizar la función de los motivos encontrados comparando la similitud de los mismos con otros disponibles en bases de datos (Mahony & Benos, 2007). De estos 9 motivos, 7 poseen similitud con motivos previamente descritos. Finalmente con el programa FIMO se procedió a analizar la presencia de estos motivos en las secuencias promotoras que habían sido usadas para la búsqueda de los motivos. De este modo, se puede conocer la presencia y la ubicación de los motivos en las secuencias promotoras.

2.4.3 Empleo de *GeneMANIA* para la obtención de una red de coexpresión

GeneMANIA es uno de los "plugin" o paquetes disponibles del programa *Cytoscape* el cual permite generar redes de asociación y predecir funciones de genes para ensayos funcionales (Montejo et al., 2010). *GeneMANIA* fue utilizado para obtener una red de asociación a partir de una lista inicial de genes: *CBP60G*, *WRKY70*, *WRKY33*, *WRKY25* y *MPK3*. Se seleccionaron como parámetros a considerar para la obtención de la red, información de coexpresión, interacción proteína-proteína, interacciones físicas y rutas de señalización y colocalización.

Estos datos están disponibles para genes y proteínas de siete organismos diferentes, de los cuales se seleccionó *A. thaliana* (Zuberi et al., 2013). Se seleccionó un máximo de 120 genes para la generación de la red permitiendo ser visualizada de manera clara.

2.4.4 Empleo del sitio Athamap para la búsqueda de motivos asociados a la defensa en secuencias reguladoras

Para poder realizar la búsqueda de los motivos que son reconocidos por estos factores en las regiones promotoras de los 120 genes obtenidos mencionados en el punto 2.4.3, se utilizó el programa la *AthaMap*, el cual proporciona un mapa de la gran mayoría de factores de transcripción reportados en el genoma de *A. thaliana* (Hehl et al., 2016). Los datos en *AthaMap* se basan en publicaciones disponibles como matrices resultantes de alineamientos o sitios unión proteína-ADN determinados experimentalmente. Adicionalmente, con el advenimiento de las matrices de microarreglos de unión a proteínas, este programa posee la capacidad de detectar hasta 29 familias diferentes de factores de transcripción. Para el análisis, se utilizó la función “análisis de genes” que permite la identificación de sitios comunes de unión a factores de transcripción en un conjunto de genes introducidos por el usuario. Se obtuvo entonces un listado de los 120 genes con una columna que indicaba la presencia o ausencia de predicción de sitios de unión a factores de transcripción, entre los cuales se encontraban *TGA* y *WRKY*.

A partir de esta información, se coloreó la red obtenida en el punto 2.4.3, de forma tal de poder visualizar fácilmente los genes que contenían sitios de unión para *TGA* y/o *WRKY*.

CAPÍTULO 3: Resultados I

3.1 Red de coexpresión obtenida a partir de genes implicados en defensa cuya expresión disminuye luego de la expresión de CP de TMV

En trabajos previos del laboratorio, se realizó un análisis del impacto global de la proteína de cápside del virus TMVcg (CgCp) sobre el transcriptoma de *A. thaliana* mediante un microarreglo a partir de plantas que expresan la CgCP bajo un promotor inducible, comparando inducción vs no inducción. Los resultados indicaron que la CPCg altera la expresión de genes que están implicados en una amplia variedad de procesos (Tesis Rodríguez 2015; Rodríguez et al., 2014). Con la idea de profundizar el estudio del mecanismo involucrado, se construyó una red de coexpresión génica utilizando la base de datos ATTED-II (Obayashi et al., 2009) a partir de un set seleccionado de genes (Rodríguez et al., 2014). Las redes obtenidas por dicho programa están compuestas por nodos, que representan los genes y por líneas que unen a dichos nodos, que son los coeficientes o rangos de coexpresión. Esta última forma de graficar los datos permite identificar visualmente, dentro de la red, módulos de genes altamente conectados asociados a un dado proceso biológico. Se seleccionaron como nodos centrales a *CBP60g*, *WRKY70*, *WRKY33*, *WRKY25*, *MPK3*, *AT1G72920*, *RDR1* y *AOX1a*, en base tanto a los datos de análisis del microarreglo como a resultados de expresión génica obtenidos previamente (Rodríguez et al., 2014) (Figura 3.1). La utilización del programa ATTED-II permitió la identificación de genes implicados en vías de defensa cuya expresión tiene una alta probabilidad de estar alterada en las plantas que expresan la CgCP (Aoki et al., 2007; Rodriguez, 2015; Usadel et al., 2009). Dado que estos genes se encontraban agrupados en la misma red de coexpresión, para entender su posible regulación común, se consideró estudiar los motivos regulatorios sobre-representados en sus regiones promotoras.

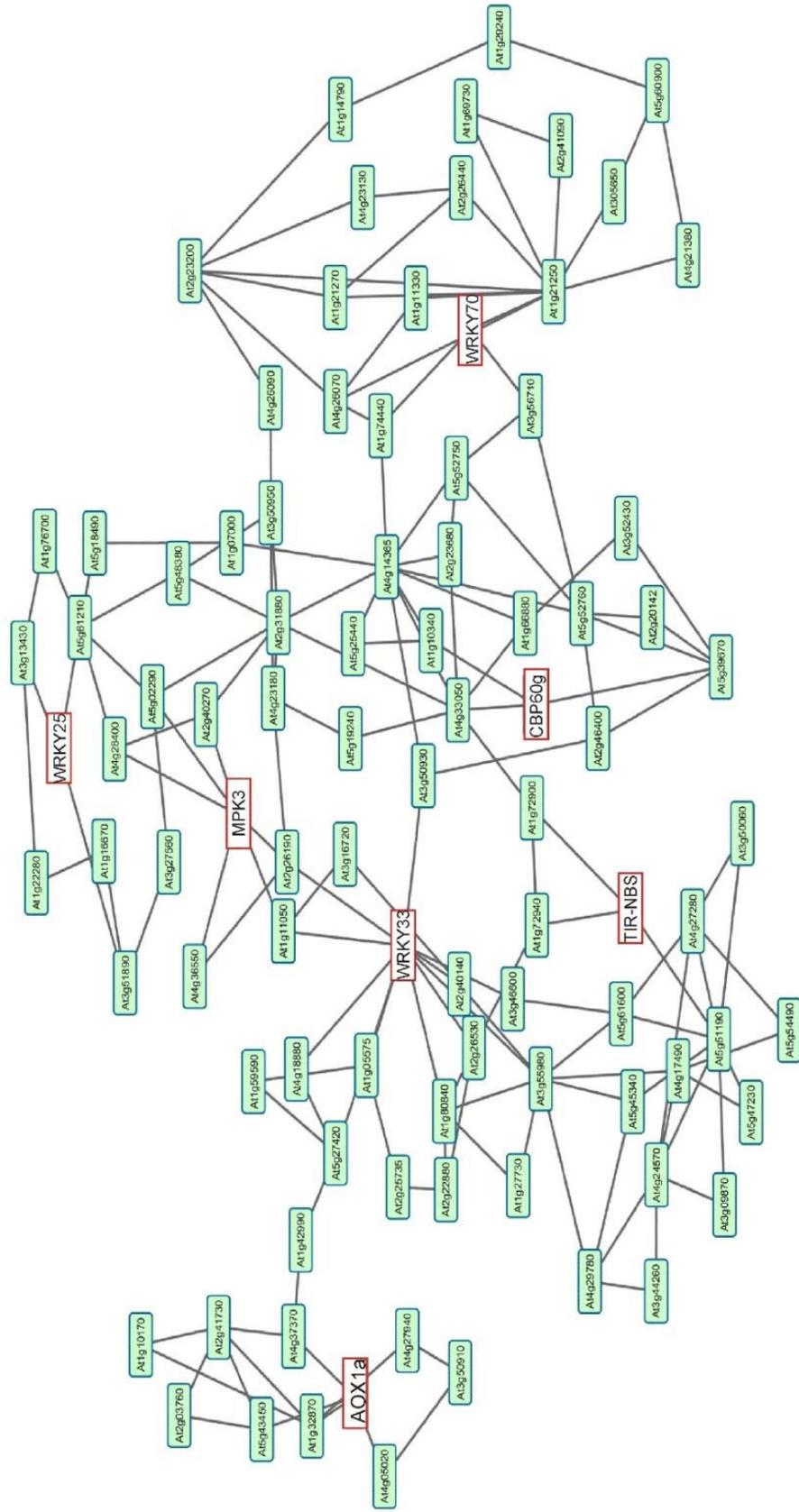


Figura 3.1. Red de coexpresión obtenida por medio del programa ATTED-II. En rojo se indican los genes CBP60g, WRKY70, WRKY33, WRKY25, MIPK3, AT1g72920, y AOX1a a partir de los cuales se obtuvo la red. (Tesis Rodríguez 2015)

3.2 Identificación de motivos presentes en las regiones regulatorias sobrerrepresentados en genes coexpresados

Con el fin de identificar los motivos presentes en las regiones regulatorias en *cis*, que a su vez podrían estar implicados en la regulación de los genes de defensa alterados por el CgCP, se analizaron las regiones promotoras de los 94 genes coexpresados. Por medio de este estudio se obtuvieron 75 motivos, de los cuales 17 estaban sobrerrepresentados ($p < 0.05$). Para eliminar motivos redundantes, se agruparon los motivos similares y así se obtuvieron 9 motivos no redundantes por medio del programa STAMP. Éste también permitió analizar la función de los motivos encontrados comparando la similitud de los mismos con otros disponibles en bases de datos (Mahony & Benos, 2007). A continuación, se estudió la similitud de los elementos reguladores en *cis* antedichos y los reportados anteriormente en distintas bases de datos públicas: AGRIS (Yilmaz et al., 2011); AthaMap (Bulow et al., 2009) y PLACE (Higo et al., 1999). De estos 9 motivos, 7 poseen similitud con otros previamente descritos. La metodología seguida para la búsqueda de motivos se detalla en la sección de Materiales y métodos.

Curiosamente, algunas de las secuencias reguladoras que fueron identificadas como sobrerrepresentadas tienen similitud con elementos asociados a vías de señalización hormonal. Particularmente, uno de los motivos identificados es similar al elemento TL1ATSAR, el cual está presente en la región promotora de genes regulados por NPR1, un factor clave en la vía de señalización de la hormona SA (Wang et al., 2005). Por otro lado, también se encontró presente W-BOXATNPR1-*like*, motivo descrito en la región promotora del gen *NPR1* y además, reconocido por factores de transcripción pertenecientes a la familia WRKY (Yu et al., 2001). Entre los restantes motivos que están presentes en las secuencias promotoras de los genes coexpresados, se encuentran un elemento de respuesta a sacarosa (SURE1STPAT21-*like*), uno de respuesta a azúcares (SBOXATRBCS-*like*), uno de respuesta a auxinas (CCTCGTGTCTCGMGH3) y un motivo presente en el promotor del gen que codifica para PHYA (PE3PASPHYA3-*like*) (Tabla 3.1). Si bien tanto la vía de señalización mediada por auxinas, como la señalización mediada por azúcares han sido asociadas a respuestas de defensa (Moghaddam & Van den Ende, 2013; Kazan & Manners, 2009), sus roles no están aun completamente caracterizados.

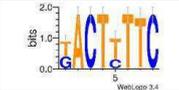
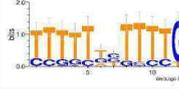
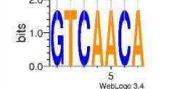
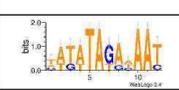
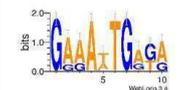
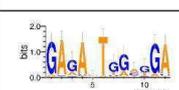
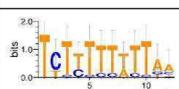
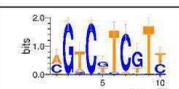
Número de veces que el motivo esta presente en el set de secuencias	Motivo encontrado dentro del set de secuencias	Secuencia consenso en bases de datos	Denominación del motivo en bases de datos	Descripción *
53		GACTTCTTCTT	TL1ATSAR	Motivo sobre - representado en 13 genes respondedores de NPR1
40		ACATTCA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

Tabla 3.1: Análisis de enriquecimiento de motivos con un valor de $p \leq 0.01$. Se identificaron 9 motivos, ocho de los cuales están caracterizados previamente. a) Número de apariciones de motivos en el conjunto de 98 secuencias. B) Descripción del motivo en la base de datos ProFITS. Recuperado de: <http://bioinfo.cau.edu.cn>

Para estudiar la participación del motivo de similitud TL1ATSAR en la red de coexpresión, se propuso realizar un ensayo de promotor sintético (Hellens et al., 2005) con construcciones que llevan repeticiones del motivo TL1ATSAR-like en tándem y separadas por una secuencia (denominada *spacer*) (Figura 3.2 A). Este elemento corresponde a una secuencia consenso entre los 53 genes en los que fue caracterizado (Tabla 3.1). Adicionalmente, dichas construcciones se insertaron en un vector binario GATEWAY (pGWB4). Este plásmido carece de promotor y posee un sitio para clonar la región deseada río arriba del gen reportero *GFP*, el cual permite visualizar si el promotor en estudio se induce frente a las diferentes condiciones. Con estos vectores se transformaron *Agrobacterias* para la realización de los ensayos funcionales. Se agroinfiltraron plantas *N. benthamiana* 72 hs. después de haber sido

infectadas con TMV y se observó, a los 3 y 5 días luego de la infiltración, con luz UV, la expresión o no de GFP en las hojas (Figura 3.2 B)

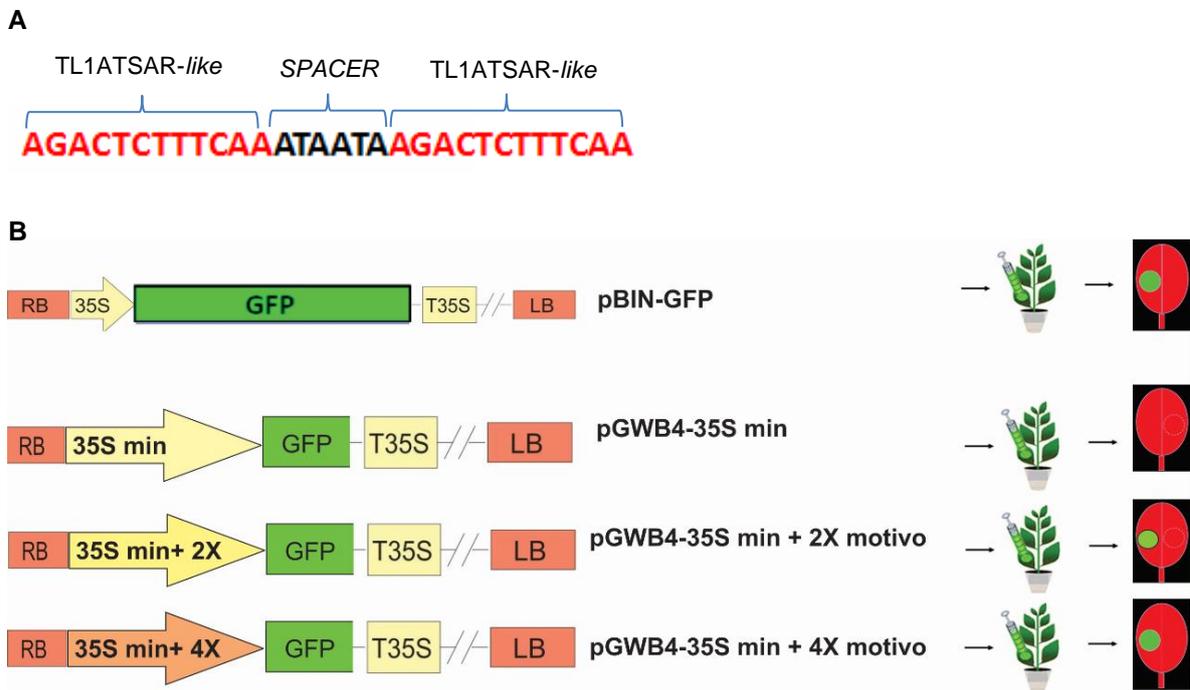


Figura 3.2: Esquema de los constructos que llevan dos o cuatro repeticiones del motivo similar a TL1ATSAR. A) Secuencia 2X TL1ATSAR-like, separadas por el SPACER. B) Detalle del diseño de los constructos: región reguladora compuesta por una región promotora de 35S mínima fusionada con los motivos seleccionados. Esta región reguladora se encuentra ubicada aguas arriba de un gen reportero (secuencia GFP).

Al aplicar esta estrategia, se observó que las plantas agroinfiltradas con la construcción que contiene repeticiones del motivo TL1ATSAR-like acumulan la proteína GFP a 5 d.p.i mientras que las plantas control (ya sea las tratadas con buffer de infección como las que solo poseen el 35S min, sin repeticiones del motivo) no exhiben niveles detectables de dicha proteína (Figura 3.3 A). Estos resultados fueron confirmados por RT-PCR donde se puede observar amplificación de GFP solo en los casos de presencia del motivo (Figura 3.3 B). Estos hallazgos sugerían que el motivo similar a TL1ATSAR parecía responder a la infección viral con TMV-Cg.

Posteriormente, a modo de exploración del rol de otros factores de modulación de la red, se prosiguió a estudiar la respuesta frente a infecciones con TMV en dos motivos adicionales: SURE1STPAT21-like, WBOXATNPR1-like. Además, se utilizó como control la secuencia spacer con el fin de descartar una posible activación del promotor y expresión de GFP derivada de su presencia. Observamos que, en los ensayos de agroinfiltración transitoria en hojas de *N. benthamiana*, ambos motivos y el spacer parecen no inducir la expresión de GFP durante la infección con TMV. (Figura 3.4 A).

El ensayo de RT-PCR para detectar la expresión de GFP en las hojas agroinfiltradas que se muestra en la Figura 3.4A confirma los resultados, es decir, no se observa amplificación de GFP para los promotores sintéticos WBOXATNPR1-like y SURE1STPAT21-like ni el control *spacer* (Figura 3.4B).

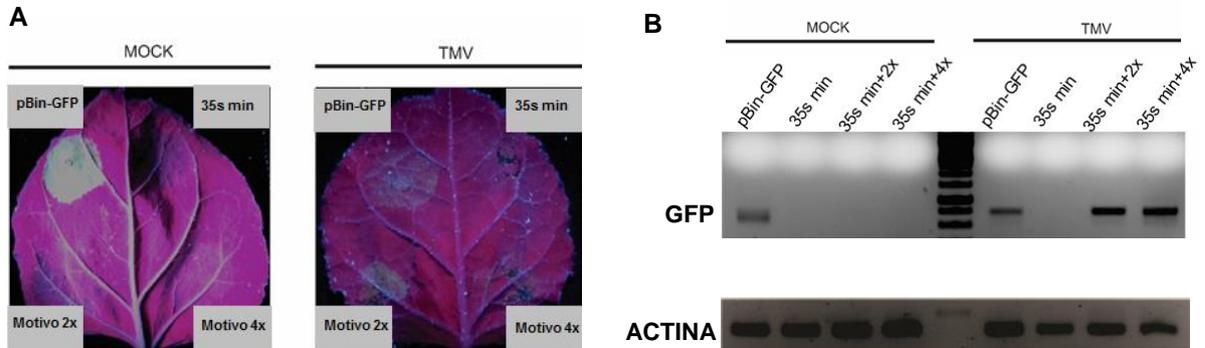


Figura 3.3: Ensayo de promotor sintético para estudiar el motivo similar a TL1ATSAR A) Ensayo transitorio por agroinfiltración de hojas de *Nicotiana benthamiana*, de los siguientes tratamientos: pBinGFP (control positivo), 35S min (35s mínimo), motivo 2x (35S min. más el motivo repetido dos veces en tándem) y motivo 4x (35S min. más el motivo repetido cuatro veces en tándem). El panel izquierdo corresponde a una hoja no infectada (Mock). El panel derecho corresponde a una hoja infectada (TMV). B) Ensayo de RT-PCR para detectar la expresión de GFP en las hojas agroinfiltradas. A partir de tejido extraído de A, se realizó RT-PCR de los distintos tratamientos. El panel izquierdo corresponde a los tratamientos agroinfiltrados en una hoja no infectada (Mock), mientras que el panel derecho corresponde a una hoja infectada (TMV)

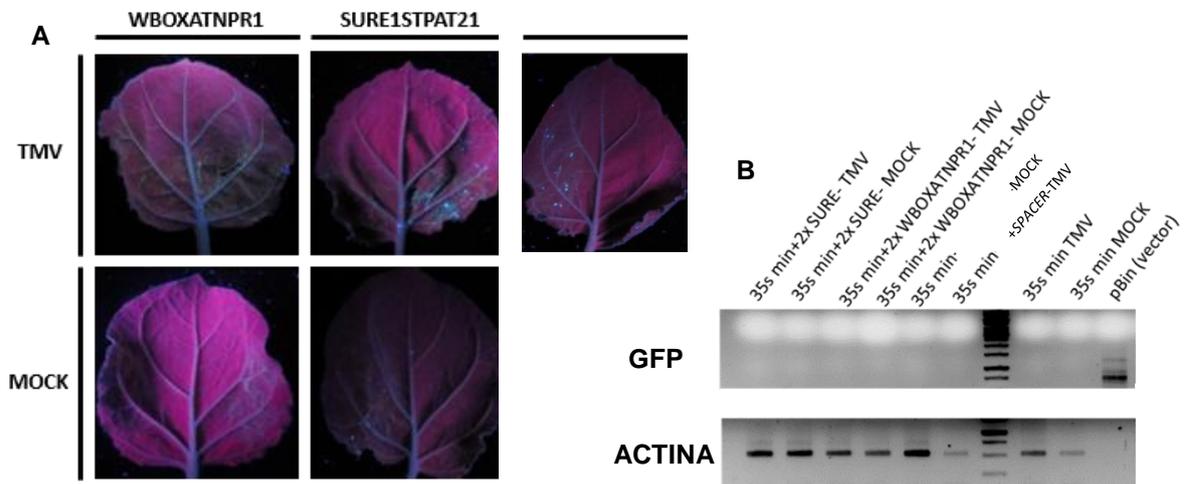


Figura 3.4: Ensayo de promotor sintético para estudiar los motivos tipo W-BOX y SURE. El SPACER entre las dos secuencias repetidas en tándem de ambos motivos se usó como control. A) Ensayo transitorio por agroinfiltración de hojas de *Nicotiana benthamiana*. Los tratamientos fueron 35S min+ 2X WBOXATNPR1-like (WBOXATNPR1), 35S min+ 2X SURE1STPAT21-like (SURE1STPAT21), y 35S + SPACER (SPACER). En el panel superior se observan hojas infectadas (TMV), mientras que en el inferior hojas sin infectar (MOCK) B) Ensayo de RT-PCR para detectar la expresión de GFP en las hojas agroinfiltradas en hojas infectas y sin infectar (Mock). Los tratamientos corresponden a 35S min; 35S min+ SPACER; 35S min+ 2X WBOXATNPR1-like; 35S min+ 2X SURE1STPAT21-like. Como control positivo se utilizó una muestra agroinfiltrada con el vector pBinGFP.

Sobre la base de estos hallazgos, se obtuvieron plantas de *Arabidopsis* transgénicas que expresan el sistema promotor sintético 35S min+ 2X TL1ATSAR-like. Se seleccionó la construcción portadora del motivo 2X debido a que los resultados preliminares observados en la expresión transitoria demostraron niveles similares de expresión de GFP entre 2X y 4X. La inducción del gen reportero se analizó en infecciones con TMV-Cg, a distintos días pos infección (5, 7 y 10 d.p.i), en tres líneas independientes de *Arabidopsis* transgénicas para las construcciones 35S:GFP y 35S + 2X TL1ATSAR-like:GFP. Como control negativo se utilizaron plantas inoculadas con buffer de infección (no infectadas). No fue posible observar inducción de GFP en ninguna de las tres líneas independientes analizadas tanto para el 35S mínimo como para las del motivo TL1ATSAR-like. A modo de ilustración en la Figura 3.5 se muestra un ensayo realizado con una de las líneas independientes examinadas a 7 y 10 dpi (Figura 3.5 A y B). Como se puede observar no se observaron diferencias entre ambos tratamientos luego de la infección. Para verificar los resultados de la visualización con UV, se utilizó una técnica mucho más sensible como la RT-qPCR, con el fin de detectar niveles muy bajos de GFP. No fue posible la detección en ninguno de los casos (datos no mostrados).

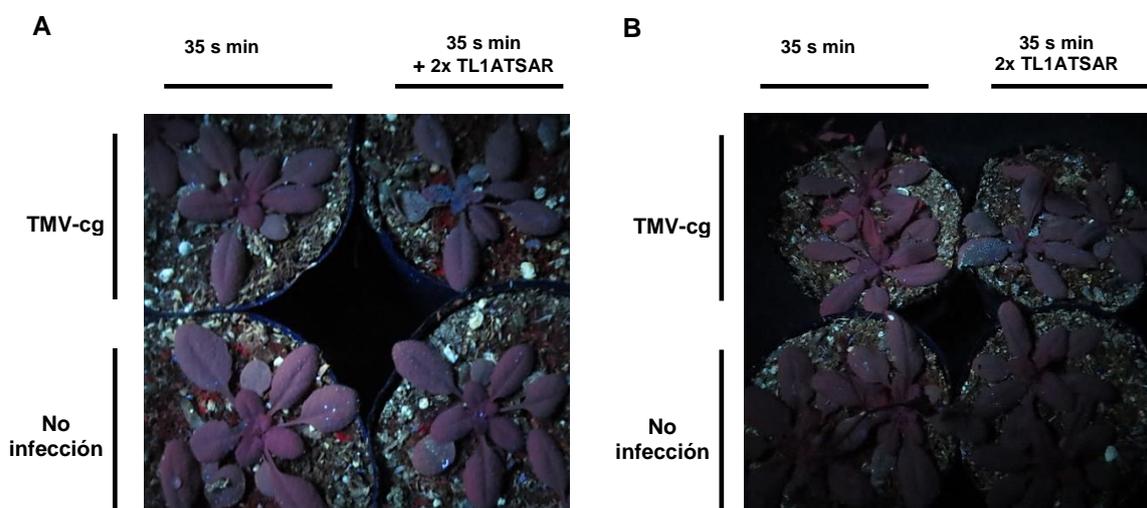


Figura 3.5: Ensayo de promotor sintético para estudiar el motivo TL1ATSAR. Se muestran solo una línea de las cuatro que fueron analizadas para cada tratamiento. Se infectaron con TMV-Cg tanto la línea que expresa solo el 35S mínimo (35S min), así como también la que presenta las dos repeticiones del motivo TL1ATSAR. Como control negativo se utilizaron plantas mock (inoculadas con buffer de infección). A) 7 d.p.i B) 10 d.p.i

El permanente avance y actualización de herramientas bioinformáticas ha permitido mejorar los análisis de redes de coexpresión agregándole nuevas características y parámetros, como en la aplicación *GeneMANIA* (Franz et al., 2018; Warde-Farley et al., 2010). Esta herramienta permite encontrar, partiendo de una lista de genes propuestos, genes funcionalmente similares utilizando una gran cantidad de datos

genómicos y proteómicos. Es decir, este programa permitió obtener una nueva red de coexpresión de genes enriquecida con información acerca de interacciones proteína-proteína y físicas, rutas de señalización y colocalización, etc. Por otro lado, la herramienta *GeneMANIA* permite establecer una jerarquización entre los genes componentes de la red en base a su relación con los genes propuestos y de este modo permite plantear nuevas hipótesis acerca de las interacciones entre los integrantes de dicha red con una base más completa y orientada.

El gen *MPK3* codifica para una MAPK activada durante las infecciones producidas por patógenos (Li et al., 2012). Mientras que *WRKY33* y *WRKY25* codifican para dos factores de transcripción involucrados en respuesta a la hormona SA (Lippok et al., 2007; Zheng et al., 2006). Por otro lado, el gen *CBP60g* está involucrado en el mecanismo de defensa frente a *P. syringae* (Wang et al., 2009b), ya que codifica para una proteína de unión a calmodulina y posee un rol en la acumulación de SA (Zhang et al., 2010). Es importante destacar que los niveles de expresión de los genes antedichos se encuentran modulados por la acción de la CPCg a través de la estabilización de las proteínas DELLA (Rodríguez et al, 2014). Por último, se incorporó al gen *WRKY70*, ya que éste posee un rol clave en modulación positiva de la vía de SA y negativa de JA (Jing et al., 2006) un mecanismo alternativo utilizado por las proteínas virales para contrarrestar las defensas del huésped (Rodríguez et al, 2014). De esta forma, con estos 5 genes con relación comprobada con la acción de la CP sobre el sistema inmune, se usó esta herramienta bioinformática y se obtuvo una nueva red de correulación integrada por 115 genes (representados con círculos). Los genes propuestos para la elaboración de la red están representados en formato hexagonal (Figura 3.6).

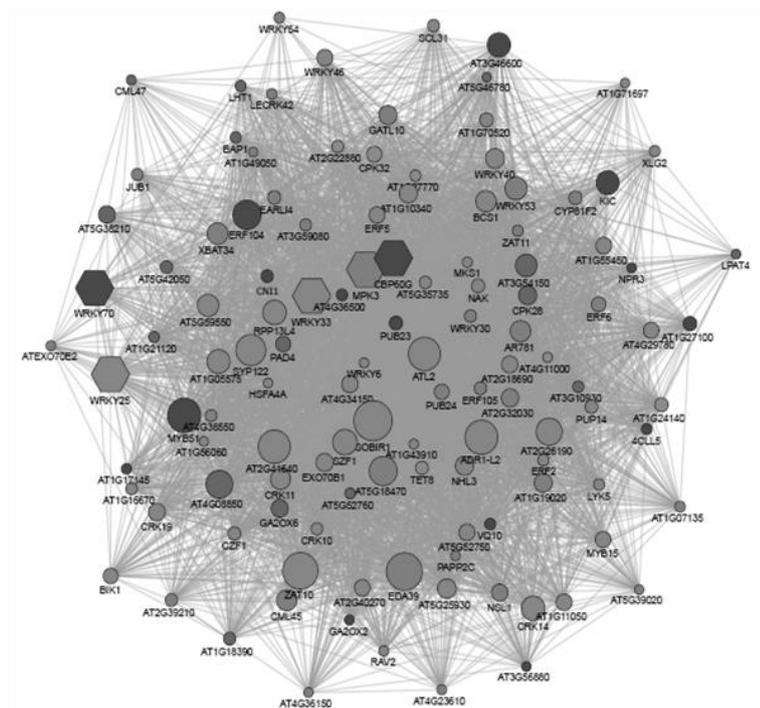


Figura 3.6: Red de coexpresión obtenida a partir de genes implicados en defensa cuya expresión disminuye durante la acumulación de la CgCP. Los hexágonos representan los genes *CBP60G*, *WRKY70*, *WRKY33*, *WRKY25* y *MPK3* a partir de los cuales se construyó la red utilizando el programa *GeneMania*.

3.3 Identificación de un grupo de genes coexpresados altamente interconectados que contienen motivos asociados a la defensa en sus secuencias reguladoras

Para poder caracterizar las regiones promotoras de los genes de la red, se decidió utilizar bases de datos con motivos validados en lugar de la exploración *de novo* realizada previamente. Teniendo en cuenta los trabajos reportados anteriormente en el laboratorio (Conti., et al 2012, Rodríguez et al 2014) y los resultados preliminares de esta Tesis, donde se observó que la CP regula negativamente un conjunto de genes implicados en la vía del SA, se prosiguió a la búsqueda de sitios relacionados con esta fitohormona. Los mecanismos de señalización de la vía del SA involucran al factor NPR1 (Wu et al., 2012). Dicha hormona tiene la capacidad de inducir la translocación nuclear del factor NPR1 y estimular la transcripción de genes relacionados a la defensa contra patógenos. Este factor no se une directamente al ADN, sino que actúa a través de otros factores de transcripción, entre los cuales se destacan los de la familia TGA y WRKY. Los miembros de esta última reconocen el motivo W-BOX (C/TTGACT/C) mientras que los de la familia TGA se unen al elemento TGA (TGACG) (Eulgem et al., 2000; Idrovo Espín et al., 2012; Katagiri et al., 1989).

Se prosiguió entonces, a la búsqueda de los motivos que son reconocidos por estos factores en las regiones promotoras de los 120 genes presentes en la red. Para ello, se utilizó el sitio *AthaMap* (Hehl et al., 2016). Esta base de datos genera un mapa de

los sitios de unión a factores de transcripción predichos para todo el genoma de *A. thaliana*. Recientemente, dicho sitio ha incorporado actualizaciones cualitativas y cuantitativas dando como resultado la posibilidad de predecir hasta 29 familias diferentes de factores de transcripción. En la Figura 3.7 se puede observar la red de la Figura 3.6 coloreada según la presencia o ausencia de predicción de sitios de unión a factores de transcripción TGA y WRKY, a partir del análisis obtenido con *AthaMap*. En rosa es posible visualizar los genes que poseen sitios para ambos motivos, mientras que en violeta se distinguen aquellos para TGA y, en turquesa, los de WRKY. Finalmente, en gris se representan aquellos que no tendrían ninguno. Esta información se encuentra además listada en el Anexo B.

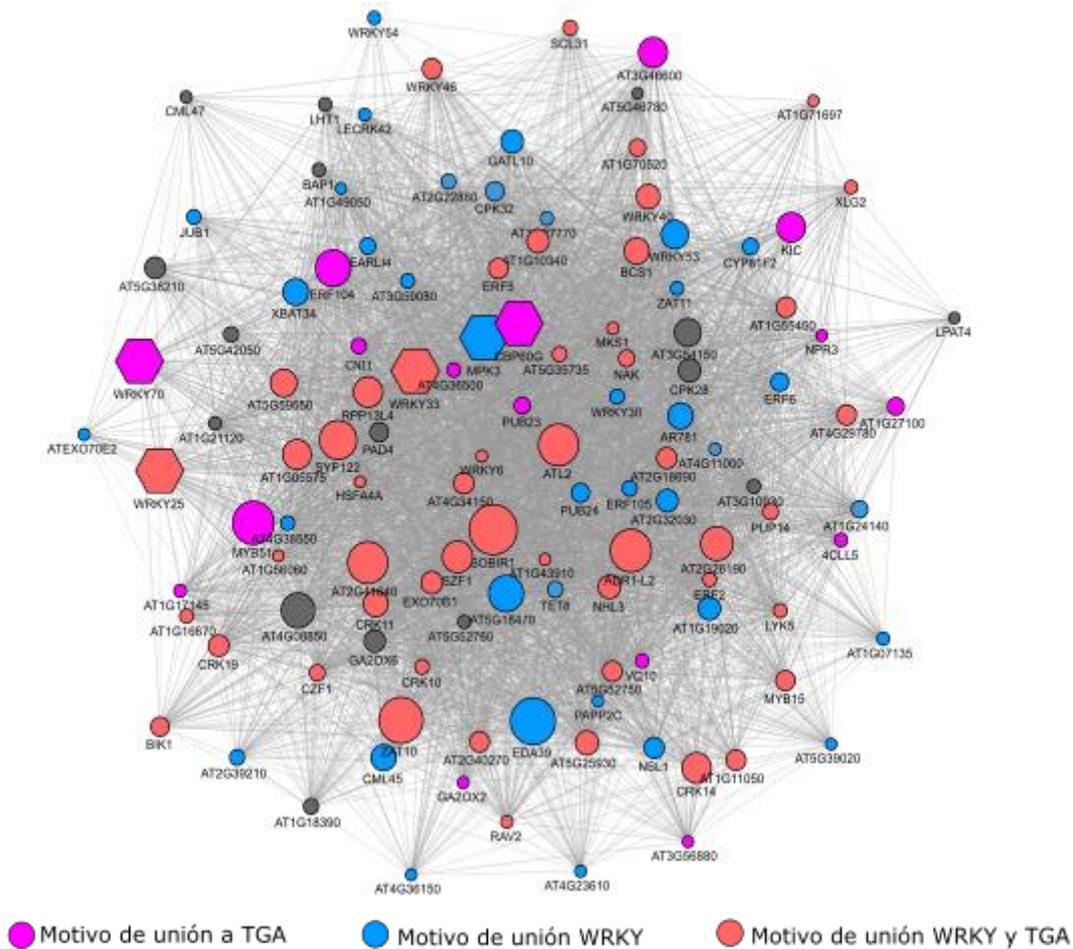


Figura 3.7 Red de coexpresión obtenida a partir de genes implicados en defensa cuya expresión disminuye ante la acumulación de la CgCp y que presentan en sus regiones promotoras el motivo de unión a los factores de transcripción TGA o/y WRKY. Los sitios fueron predichos con el programa *AthaMap*.

Con el fin de validar experimentalmente la información obtenida mediante los análisis bioinformáticos, se realizaron análisis de expresión de un grupo de genes

seleccionados a partir de la red (genes implicados en defensa) mediante RT-qPCR en plantas transgénicas que expresan el CgCP bajo un promotor inducible (CP#72). La inducción del promotor se logró mediante el tratamiento de plantas de la línea CP#72 en el estadio 1.08 (Boyes et al., 2001) con el inductor (MOF).

Esta línea transgénica fue desarrollada en el laboratorio del Dr. Roger Beachy (Donald Danforth Plant Science Center, USA). El nivel de expresión de la proteína CgCP en la línea CP#72 fue analizado en un trabajo realizado por (Koo et al., 2004). En nuestro laboratorio, se realizó la caracterización detallada de la cinética de acumulación de esta proteína y se determinó que el sistema inducible permite obtener mayores niveles de acumulación de la proteína de cápside en comparación a una línea de expresión estable, regulada bajo el promotor 35S (Rodríguez et al., 2014). Por lo tanto, para llevar a cabo la validación mediante análisis de RT-qPCR se decidió utilizar el sistema de expresión inducible ya que tanto la cinética como los elevados niveles de expresión de CPCg alcanzados permiten reproducir más fielmente lo que ocurre en una infección viral y adicionalmente, se puede controlar el estadio del desarrollo de *A. thaliana* en el que la CPCg comienza a acumularse.

Para realizar la validación se seleccionaron los siguientes genes: *ERF6*, *PAPP2C*, *CNI1* y *AT1G05575*, *XLG2*, *MKS1* y *PCRK1*. Para los dos primeros, *AthaMap* predijo sitios de unión al motivo WRKY; y en el caso de *CNI1* y *AT1G05575*, se predijeron motivos TGA. Los restantes presentaron ambos motivos.

El criterio de selección del conjunto de genes a analizar para la validación de la red de coexpresión se basó en su rol en la defensa de amplio espectro, es decir, tanto en defensa antiviral, como también en respuestas a patógenos fúngicos y bacterianos. Por ejemplo *ERF6* y *PAPP2C* confieren resistencia a hongos (Moffat et al., 2012; Wang et al., 2012), mientras que la expresión del gen *XLG2* aumenta frente a infecciones con *P.syringae* (H. Zhu et al., 2009). Adicionalmente, el gen *CNI1* está involucrado tanto en defensa como en el balance de concentraciones de carbono/nitrógeno en las fases de crecimiento (Maekawa et al., 2012; Sato et al., 2009).

El análisis por medio de la técnica RT-qPCR demostró que la expresión de una gran parte de estos genes disminuye durante la expresión de la CgCP (Figura 3.8 A). Estos resultados validan el análisis bioinformático y sugieren que la CgCP actúa regulando negativamente la expresión de genes dependientes de los factores de transcripción TGA y WRKY.

Como se mencionó anteriormente, la utilización de plantas transgénicas que expresan proteínas virales individuales es una herramienta muy útil. Sin embargo, en el contexto de una infección viral, donde la interacción entre todos los componentes del virus está

presente, puede ser muy diferente a lo observado en respuesta a la presencia individual de CPCg. Por esta razón, resulta de gran interés analizar la expresión de estos genes en distintos tiempos del desarrollo de la infección con el virus TMV-Cg. Para la realización de este experimento, se infectaron plantas salvajes pertenecientes al cultivar Col-0 en el estadio 1.08 (Boyes et al., 2001). Se tomaron muestras a 3, 5, 7 y 12 d.p.i del tejido sistémico infectado (la media roseta por encima de la hoja número 3) excluyendo la hoja inoculada (hoja número 3). La cuantificación, por medio de la técnica de RT-qPCR, mostró que la mayoría de los genes que contienen los motivos WRKY y TGA en sus secuencias promotoras son incrementados a 3, 5 y 7 días luego de la infección con el virus TMV-Cg (Figura 3.8 B); mientras que a 12 dpi la expresión de la mayoría de estos genes disminuye significativamente. Los resultados observados sugieren que en el contexto de la infección, en estadios tempranos de la infección, cuando la acumulación de CPCg es baja en comparación a las demás proteínas virales (Rep y MP), los genes de defensa evaluados aumentan significativamente. Sin embargo, en estadios más avanzados (12 dpi), CPCg es la proteína viral mayoritaria y su acción reguladora negativa del sistema inmune propuesta (Rodríguez et al., 2014; Conti et al., 2017) sería la responsable de la reducción de los niveles de expresión observada a 12 dpi (Figura 3.8 B).

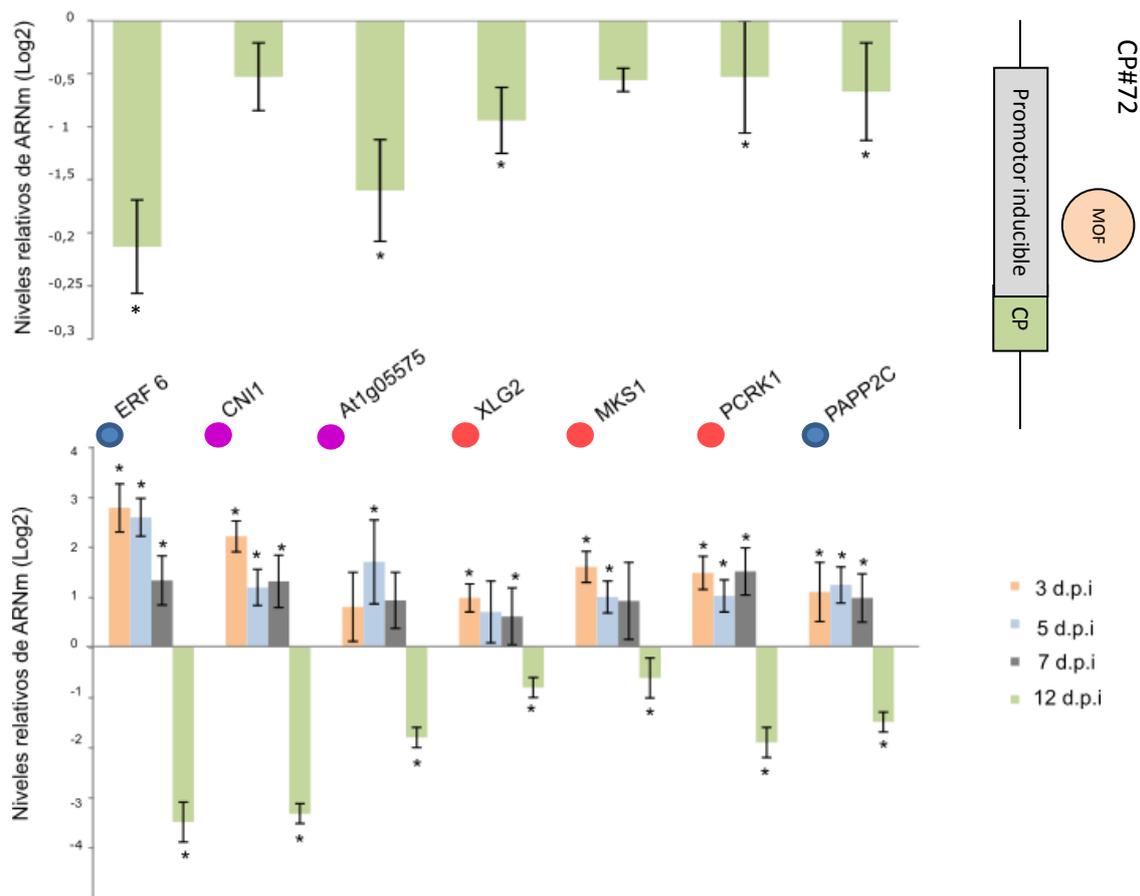


Figura 3.8: La expresión de la CP-cg regula negativamente la expresión de un conjunto de genes que contienen los motivos tga y wrky en sus secuencias promotoras. A) Niveles relativos de ARNm (RT-qPCR) en plantas que expresan la CP-cg (48 hs post-inducción con MOF). Se muestra el promedio \pm ES de cuatro réplicas biológicas. B) Niveles relativos de ARNm (RT-qPCR) en plantas infectadas con el virus TMV-Cg a 3, 5, 7 y 12 dpi. Se muestra el promedio \pm ES de cinco réplicas biológicas. Se realizaron dos ensayos independientes. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas (* = P valor < 0.05).

3.4 Rol de NPR1 y TGA en la modulación de la expresión durante la infección viral

Teniendo en cuenta los trabajos reportados por nuestro grupo, donde se observó que la CP disminuye la vía de SA por medio de la estabilización de las proteínas DELLAs (Rodríguez *et al.*, 2014), y los resultados obtenidos hasta el momento, se propuso caracterizar el mecanismo mediante el cual la CP realiza la modulación antedicha. Como se mencionó anteriormente, las proteínas DELLA actúan mayormente en el núcleo como reguladores negativos de la señalización de GA. Recientemente, se ha descrito además el rol que tienen estas proteínas fuera del núcleo, promoviendo el tráfico de proteínas desde la vía de degradación vacuolar hasta la membrana

plasmática (Salanenka et al., 2018). Estas proteínas, en muchos casos, ejercen su control como moduladores sobre distintas señalizaciones de las plantas mediante la interacción física con factores de transcripción (Schwechheimer, 2011). Particularmente, ha sido reportado un interactoma entre factores de transcripción de *A. thaliana* y las proteínas DELLA que revela que una de ellas, la GAI, es capaz de interactuar con los factores TGAs, específicamente con TGA4 y TGA10 (Marín-de la Rosa et al., 2014). Para el factor TGA4 se ha reportado un rol en la defensa del factor NPR1 y SA (Wang & Fobert, 2013). El factor TGA10 está involucrado en respuestas tanto ante ROS como a flg22 en una vía dependiente de NPR1 (Noshi et al., 2016). A continuación, se prosiguió a evaluar la expresión del conjunto de genes seleccionados para los ensayos de validación, en este caso utilizando plantas de *A.thaliana* mutantes para el factor TGA10, tratadas con TMV-Cg. (Figura 3.9 A). Este ensayo tenía el objetivo de evaluar si la regulación génica observada en la Figura 3.8 se veía alterada ante la ausencia de TGA10. Para ello, se infectaron plantas tanto salvajes como mutantes para el gen *tga10* y las muestras fueron tomadas a 5 d.p.i (infección temprana) y 12 dpi (infección tardía). Se cuantificaron los niveles de mensajeros de los genes seleccionados por medio de la técnica de RT-qPCR. Como se puede observar en la figura, la regulación de la expresión génica visualizada anteriormente no se conservó en las mutantes. Además, al cuantificar la acumulación viral, se pudo observar que las *tga10* son más susceptibles que los controles no mutantes Col0 (Figura 3.9 B). Estos resultados sugieren que estos genes están modulados al menos por el factor TGA10.

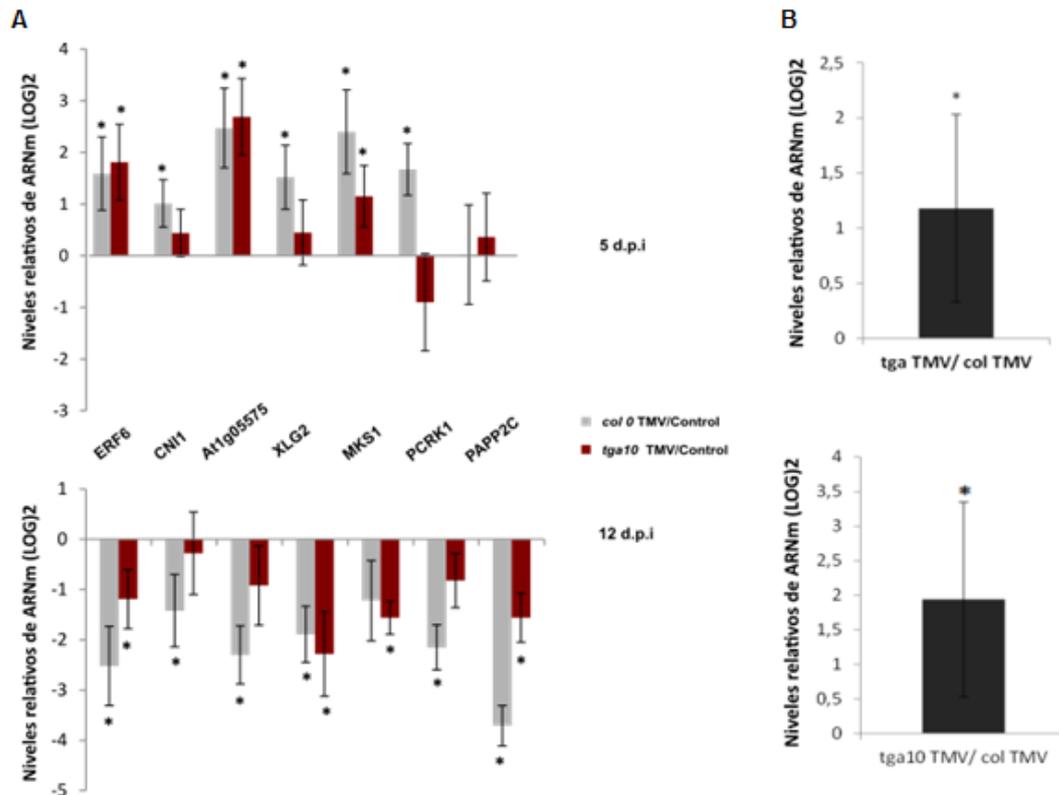


Figura 3.9. La modulación negativa de genes involucrados en defensa durante la infección viral es dependiente de TGA. A) Se determinaron los niveles relativos de ARNm por RT-qPCR en mutantes *tga* infectadas versus no-infectadas y a su vez en Col 0 infectadas versus no infectadas a 5 d.p.i y 12 d.p.i. Se muestran las medias \pm ES de seis repeticiones biológicas. B) Se determinaron los niveles relativos de ARNm de CP por RT-qPCR en mutantes *tga* infectadas versus no-infectadas y a su vez en Col 0 infectadas versus no infectadas a 5 d.p.i y 12 d.p.i. Se muestran las medias \pm ES de seis repeticiones biológicas.

Luego, para estudiar si la CgCP ejerce su rol modulador negativo de la defensa a través de la vía dependiente de NPR1, se analizó la expresión del conjunto de genes seleccionados mediante RT-qPCR en plantas mutantes para el factor *npr1* comparadas a controles Col0, ambas líneas infectadas con TMV-Cg. Nuevamente, se colectaron muestras a 5 y 12 d.p.i. A través de este análisis, se observó que la regulación génica observada en plantas Col0 infectadas, se perdía en algunos casos parcial, y en otros, totalmente durante la infección para la mayor parte de los genes evaluados en tiempos tempranos de la infección (Figura 3.10 A); mientras que para el caso de 12 d.p.i. la regulación específica se perdió totalmente en todos los genes evaluados (Figura 3.10 A). Además, al igual que sucedió con la mutante *tga10*, *npr1* resultó tener mayor acumulación viral que las plantas salvajes (Figura 3.10 B). Estos resultados sugieren que existe un rol de NPR1 en la modulación de la expresión durante la infección viral.

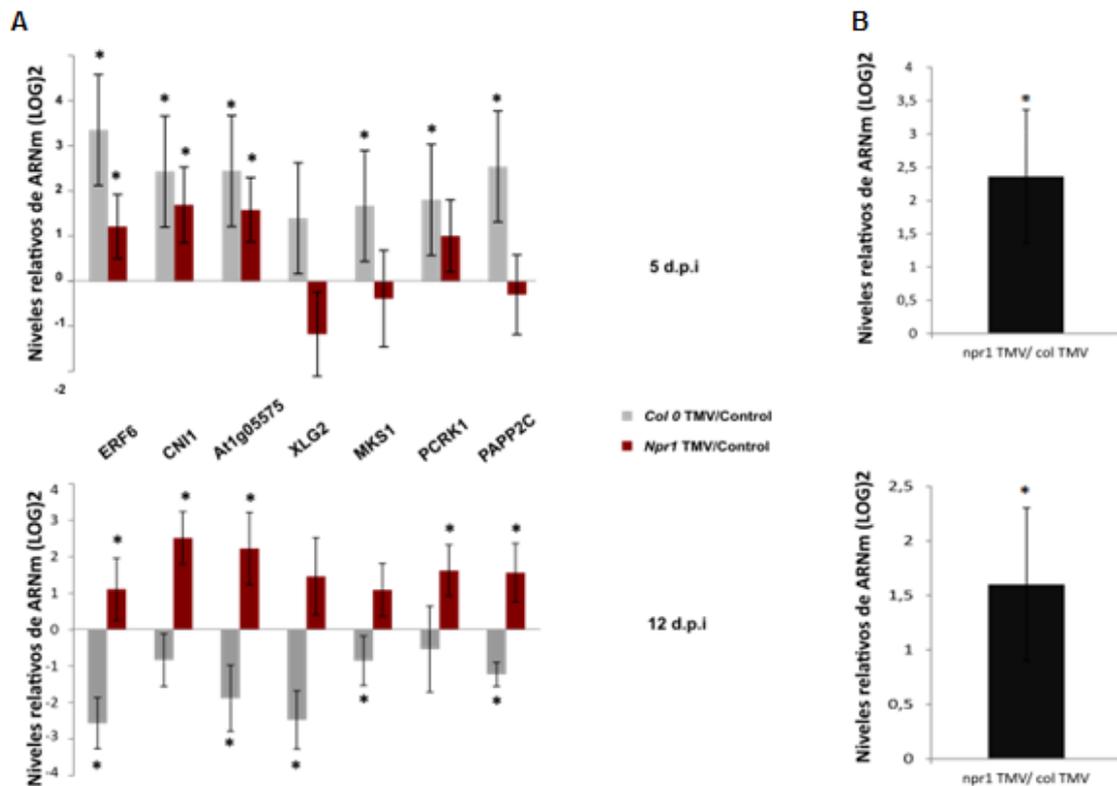


Figura 3.10. La modulación negativa de genes involucrados en defensa durante la infección viral es dependiente de NPR1. A) Se determinaron los niveles relativos de ARNm por RT-qPCR en mutantes *npr1* infectadas versus no-infectadas y a su vez en Col 0 infectadas versus no infectadas a 5 d.p.i y 12 d.p.i. Se muestran las medias \pm ES de cinco repeticiones biológicas. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas (* = P valor < 0.05). B) Se determinaron los niveles relativos de ARNm de CP por RT-qPCR en mutantes *npr1* infectadas versus no-infectadas y a su vez en Col 0 infectadas versus no infectadas a 5 d.p.i y 12 d.p.i. Se muestran las medias \pm ES de cinco repeticiones biológicas.

3.5 Rol de las enzimas de síntesis de GA en la modulación de la expresión durante la infección viral

Dado que las proteínas DELLAs son degradadas en presencia de GA, se propuso evaluar si la estabilización de las DELLA mediada por CP podía estar ocurriendo a través de la modificación de los niveles de GA. Existen varios mecanismos que controlan los niveles de GA en los tejidos, entre los cuales se encuentra su propia biosíntesis.

La acción de las enzimas GA oxidasas es importante para limitar el crecimiento durante las condiciones de estrés. En particular, la enzima GA 20-oxidasa (GA20ox) es una de las principales reguladoras de la biosíntesis de GA (Park et al., 2015), ya que se encuentra involucrada en el cambio de GA inactiva a bioactiva (Hedden & Phillips, 2000). Por otro lado, diversos estreses, tales como bióticos, producen cambios en la expresión de esta enzima, conllevando a alteraciones en los niveles de GA bioactivas (Achard et al., 2008; Dubois et al., 2013; Gupta & Chakrabarty, 2013). En base a estas evidencias, se propuso evaluar los niveles de expresión de dicha

enzima frente a la infección con TMV-Cg. Se cuantificaron los niveles de mensajeros de la enzima GA20ox en plantas infectadas (Figura 3.11). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, aunque es importante mencionar que existió gran variabilidad de expresión génica entre las réplicas biológicas analizadas. A partir de estos resultados no fue posible establecer una relación entre la regulación de la biosíntesis de GA y la infección viral con TMV-Cg.

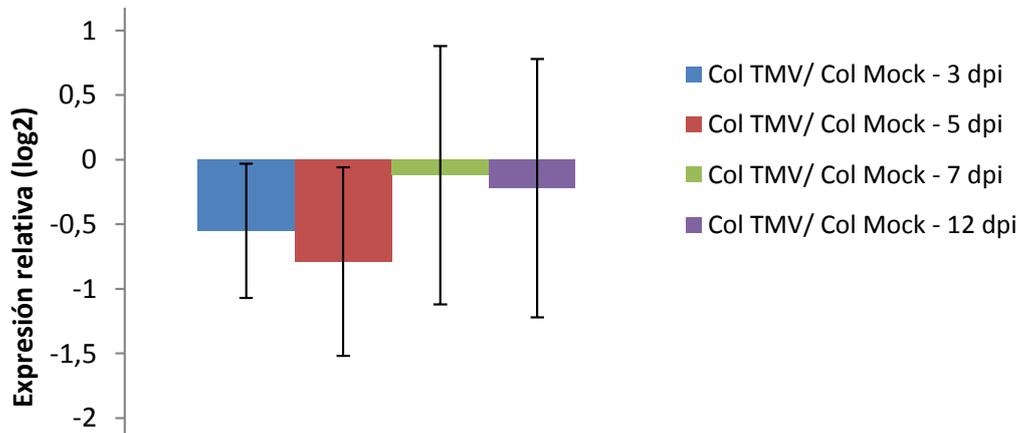


Figura 3.11: La infección con TMVcg no altera los niveles de expresión de GA20ox. Las barras violeta, verde, roja y azul muestran los niveles relativos de mRNA de GA20ox determinados por la técnica de RT-qPCR en plantas infectadas (TMV) comparadas con las no infectadas (*Mock*) a distintos tiempos. El nivel de expresión en las plantas no inducidas (*Mock*) fue arbitrariamente fijado en uno ($\text{Log}_2(1)=0$). Todas las barras representan el valor promedio de cuatro réplicas biológicas \pm error estándar. No existen diferencias significativas (p valor $< 0,05$).

CAPÍTULO 4: Resultados II

4.1 Evaluación del efecto que ejerce la CP en el sistema inmune y sus consecuencias en el movimiento sistémico del virus

Como ya fue previamente mencionado, la CP es esencial para el movimiento sistémico de TMV, aunque se desconoce el mecanismo mediante el cual ejerce dicho rol. En el caso de los *Tobamovirus* estas proteínas son necesarias para el movimiento a larga distancia, pero no para el movimiento que ocurre célula a célula (Callaway et al., 2001; Hilf & Dawson, 1993). Se ha sugerido que la CP de TMV podría reprimir respuestas de defensa y de esta manera, podría tener incidencia en el movimiento sistémico de los Tobamovirus; sin embargo, el mecanismo aún no ha sido dilucidado (Callaway et al., 2001; Collum & Culver, 2017). Es decir, un virus de este género que no tiene dicha proteína queda circunscripto a los tejidos locales donde ingresó, puede moverse célula a célula a través de los plasmodesmos pero no puede translocarse por el floema junto con los fotoasimilados e ingresar a los tejidos sumidero (Bendahmane et al., 1997; Callaway et al., 2001; Hilf & Dawson, 1993; Vuorinen et al., 2011). Teniendo en cuenta los hallazgos recientes realizados por nuestro grupo, se planteó como hipótesis que la modulación negativa de la inmunidad antiviral mediada por CP es requerida para el movimiento del virus a los tejidos sistémicos. Por lo tanto, si la hipótesis es cierta, será posible restablecer dicho movimiento de virus defectivos para la CP reproduciendo las condiciones en las que la inmunidad es modulada negativamente.

Para poder realizar este estudio, se escogió esencialmente el patosistema *N. benthamiana*/TMV. Se decidió utilizar este modelo en lugar de *Arabidopsis*/TMVcg, ya que ofrece una ventana temporal más prolongada durante el avance de la infección, permitiendo así una mejor caracterización. Adicionalmente, existen trabajos previos donde también se ha utilizado esta planta para poder visualizar el avance de una infección viral (Alamillo et al., 2006; Cheng et al., 2000; Lewandowski & Adkins, 2005). El primer paso consistió en establecer la puesta a punto de las condiciones de trabajo (armado de viriones, estadio de la planta a infectar, inóculo, cinética cualitativa de los virus, etc) de los diferentes constructos que se encontraban disponibles en el laboratorio.

En segundo lugar, se decidió evaluar si la CP de TMV era capaz de regular negativamente la inmunidad a través de la estabilización de las proteínas DELLA, y facilitar así, el movimiento sistémico del virus que carecía de CP.

Seguidamente, se propuso estudiar el rol de la vía del SA en el movimiento sistémico. Para ello, se utilizó la estrategia de VIGS para poder reducir los niveles de expresión de los distintos genes a analizar (simular el efecto de modulación negativa ejercido por CP para evaluar su rol en el movimiento sistémico del virus). Dado que los resultados obtenidos no fueron los esperados debido a dificultades presentadas en el uso de la técnica de VIGS, se rediseñó la estrategia utilizando la expresión transitoria de horquillas de silenciamiento (hp), es decir, *knock-down* inducido por ARNs de doble cadena.

Finalmente, se decidió explorar si el rol descrito para la CP en el movimiento sistémico del TMV podía ser desempeñado también para la CP del CLRV.

4.2 Establecimiento de condiciones de trabajo para las construcciones virales

A partir de las diferentes construcciones de TMV disponibles en el laboratorio, se realizó la puesta a punto para establecer las condiciones de trabajo requeridas para llevar a cabo el objetivo número 3. Estas herramientas, tanto para virus completos como defectivos en la CP, poseen un gen reportero lo cual permite visualizar el avance de la infección de manera sencilla a partir de luz UV a 395nm. Además, es importante destacar que el TMV U1 no es capaz de infectar *A. thaliana* como lo hace la variante TMV-Cg (Pereda et.al., 2000). A continuación se listan los clones virales utilizados:

- TMV-GFP (virus completo y GFP regulado por un segundo promotor de CP). Lindbo (2007). Cedida gentilmente por Eduardo Peña (OBBM-UNLP, Argentina).
- TMV Δ CP-GFP (sin la CP y GFP regulado por el promotor de CP). (Tesis Dlabalová, 2013); Cedida gentilmente por quién la diseñó, Tomáš Moravec (Czech Academy of Sciences, Prague (AVCR) Institute of Experimental Botany).
- PVX Δ CP- CP_{TMVU1} (PVX sin su CP que proporciona la CP de TMV. (Tesis Dlabalová, 2013); Cedida gentilmente por quién la diseñó, Tomáš Moravec (Czech Academy of Sciences, Prague (AVCR) Institute of Experimental Botany).

En todos los casos, los clones virales (plásmidos), una vez transformados en *Agrobacterium* se agroinfiltraron en plantas de *N. benthamiana* con el fin de reconstituir los viriones correspondientes. Esta decisión estuvo basada en dos cuestiones. Por un lado, era deseable reproducir de manera más natural la infección, y por el otro, obtener un sistema independiente de la utilización de la *Agrobacteria* teniendo en cuenta que se quería evaluar inmunidad.

El virus TMV-GFP es capaz de formar partículas virales dentro del hospedante, las cuales permiten la transmisión del patógeno de una planta a otra. Por esta razón, al realizar una extracción del tejido vegetal se obtienen fácilmente los viriones. A pesar que este clon infectivo tiene un comportamiento muy similar al virus salvaje, no

funciona exactamente igual, ya que la existencia de un segundo promotor de CP controlando la expresión de GFP le confiere cierta inestabilidad, presentando una tendencia a expulsarlo.

En el caso de la construcción defectiva de CP, con el fin de lograr obtener viriones correctamente encapsidados, fue necesario coagroinfiltrar junto con dicho plásmido, una construcción de PVX Δ CP- CP_{TMV}. De esta forma los viriones de TMV Δ CP-GFP son encapsidados por la CP proporcionada por la construcción PVX Δ CP- CP_{TMVU1}. Una vez extraído el virus a partir del tejido vegetal local donde fueron realizadas las agroinfiltraciones, se realiza una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente. Así, no solo se degradan los ARNs del PVX (ya que éstos no se encuentran encapsidados por no poseer la CP de PVX requerida para éste) sino también, aquellos ARNs genómicos de TMV que no hayan sido correctamente encapsidados.

Luego, para cuantificar el nivel infectivo de cada inóculo viral se realizó una titulación en la planta indicadora *N. tabacum* NN (cultivar Samsun NN, que presenta una reacción de hipersensibilidad HR frente a la Replicasa de los Tobamovirus exhibiendo lesiones locales visibles). La cuantificación de lesiones locales HR permite inferir la concentración de viriones viables en un inóculo, donde cada lesión corresponde a una partícula viral (Figura 4.1 A). Para ello se infectaron hojas de *N. tabacum* NN con distintas diluciones de los extractos obtenidos para ambos clones virales. Se seleccionaron en ambos casos las diluciones de inóculos que produjeron 100 lesiones locales. Se seleccionó este nivel de inóculo basándose en el utilizado para infecciones de *N. benthamiana* con TMV-GFP que alcancen un 100% de infección sin afectar la viabilidad de las plantas, al menos en los primeros 12 dpi. En la Figura 4.1 B se observan las plantas infectadas, con virus en sus hojas superiores, es decir, existe movimiento sistémico. Esto puede ser visualizado por la presencia de GFP en dichas hojas (tejidos más jóvenes) en la Figura 4.1 C. En ella se ilustran dos plantas, la del panel izquierdo infectada con un inóculo capaz de generar 1000 lesiones en las *N. tabacum* NN y la otra, corresponde al inóculo escogido (100 lesiones). Es importante destacar que las diferencias entre las distintas diluciones de inóculos utilizadas se observaron tanto en la acumulación de GFP visualizada en los tejidos sistémicos, como en la intensidad de síntomas. En ambos casos el movimiento comenzó a efectuarse a los 5 d.p.i.

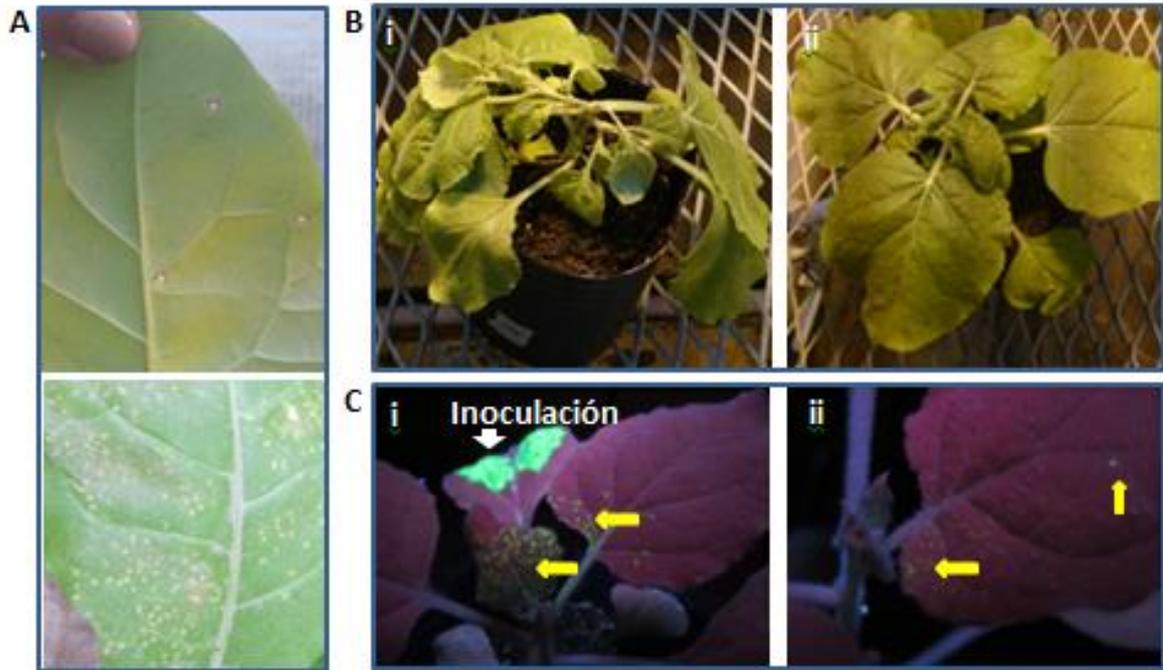


Figura 4.1: Armado de viriones y establecimiento de las diluciones de trabajo. Las imágenes corresponden a la infección de TMV-GFP. A) Lesiones HR locales observadas en hojas de *N. tabacum* NN infectadas con distintas concentraciones de partículas virales a diferentes tiempos pos infección. El panel superior corresponde a 10 dpi, el panel inferior 3 dpi. B) Plantas de *N. benthamiana* infectadas con TMV.GFP a partir de un inóculo i) más concentrado (correspondiente a 1000 lesiones) ii) menos concentrado (correspondiente a 100 lesiones, dilución seleccionada) a 12 dpi. C) Plantas de *N. benthamiana* infectadas con TMV.GFP visualizadas con luz UV a 5 dpi. Concentraciones correspondientes a las lesiones ocasionadas en *N. tabacum* NN: i) 1000 lesiones ii) 100 lesiones. Se indica con una flecha amarilla presencia de GFP en tejidos sistémicos

Una vez obtenidos y cuantificados los viriones, se realizó el ensayo de puesta a punto de las condiciones generales del ensayo, utilizando 20 plantas de *N. benthamiana* para cada tratamiento. Como se puede observar en la Figura 4.2, a 7 d.p.i, aquellas plantas infectadas con el virus completo presentan movimiento sistémico. Esto puede ser visualizado por la presencia de GFP en las hojas superiores (más jóvenes), siempre por encima de la hoja infectada. Es importante notar que el virus aparece inicialmente en la parte del tejido circundante a la nervadura principal, de manera próxima al peciolo. Luego, comienzan a observarse gran cantidad de pequeños focos de GFP cubriendo la totalidad de las hojas sistémicas. Para el caso de la construcción defectiva en CP sólo se observa presencia de virus en la hoja local donde se realizó la infección. En tiempos tardíos (16 d.p.i), el 100% de las plantas inoculadas con TMV-GFP mostraron infección sistémica mientras que en el caso de las inoculadas TMV Δ CP-GFP se observó virus sistémico en solo 4 de las 20 plantas inoculadas. En muchos casos, se pudo visualizar GFP en el tallo inmediatamente superior a la hoja inoculada (a partir de 12 d.p.i), mostrando un tipo de movimiento ligeramente distinto al

observado para el virus salvaje, que permite sugerir la prevalencia de movimiento tipo célula-célula (Figura 4.2 A). Además, tanto con TMV-GFP como con TMV Δ CP-GFP, los pequeños focos iniciales fueron aumentando su diámetro hasta cubrir totalmente la hoja inoculada. Es decir, el movimiento célula a célula, se puede observar normalmente en las inoculaciones debido a que la proteína MP no se encuentra afectada (Callaway et al., 2001). En la Figura 4.2 B se puede apreciar el porcentaje de plantas que presentaron movimiento sistémico en función de los días post infección.

Luego, se realizó el mismo ensayo pero utilizando plantas de *N. tabacum*. En este caso, solo para la infección con TMV-GFP se observó movimiento hacia los tejidos sistémicos (Figura 4.2 C). En la figura 4.2 D se puede observar el porcentaje de plantas que presentaron movimiento sistémico en función de los días post infección. Estos resultados sugieren que, por un lado, el movimiento sistémico está más atrasado (recién comienza a visualizarse a los 12 d.p.i) y, por otro lado, la respuesta inmune generada en *N. tabacum* es más fuerte que en *N. benthamiana* (notar que no existió planta infectada con TMV Δ CP-GFP que presentara movimiento a larga distancia, y por lo tanto, no hay propagación del virus más allá de la hoja inoculada).

Es importante remarcar que se realizaron réplicas de estos ensayos tanto en otoño, invierno como en primavera, manteniendo las condiciones antedichas. Si bien los resultados coincidieron en todas las épocas del año, en el verano se observó mayor virulencia, tanto con TMV-GFP como TMV Δ CP-GFP, por lo tanto el porcentaje de plantas con movimiento sistémico fue mayor para ambos tratamientos. Por esta razón, al observar los resultados globalmente, existe variabilidad entre las diferentes réplicas de los ensayos. Si bien el invernáculo donde se realizan los experimentos tiene las variables ambientales controladas, existe una pequeña oscilación tanto de la temperatura máxima como de la mínima, así como también de la cantidad de radiación solar que reciben las plantas. Este efecto se observa claramente al comparar el uso del invernáculo en verano respecto a las otras estaciones del año.

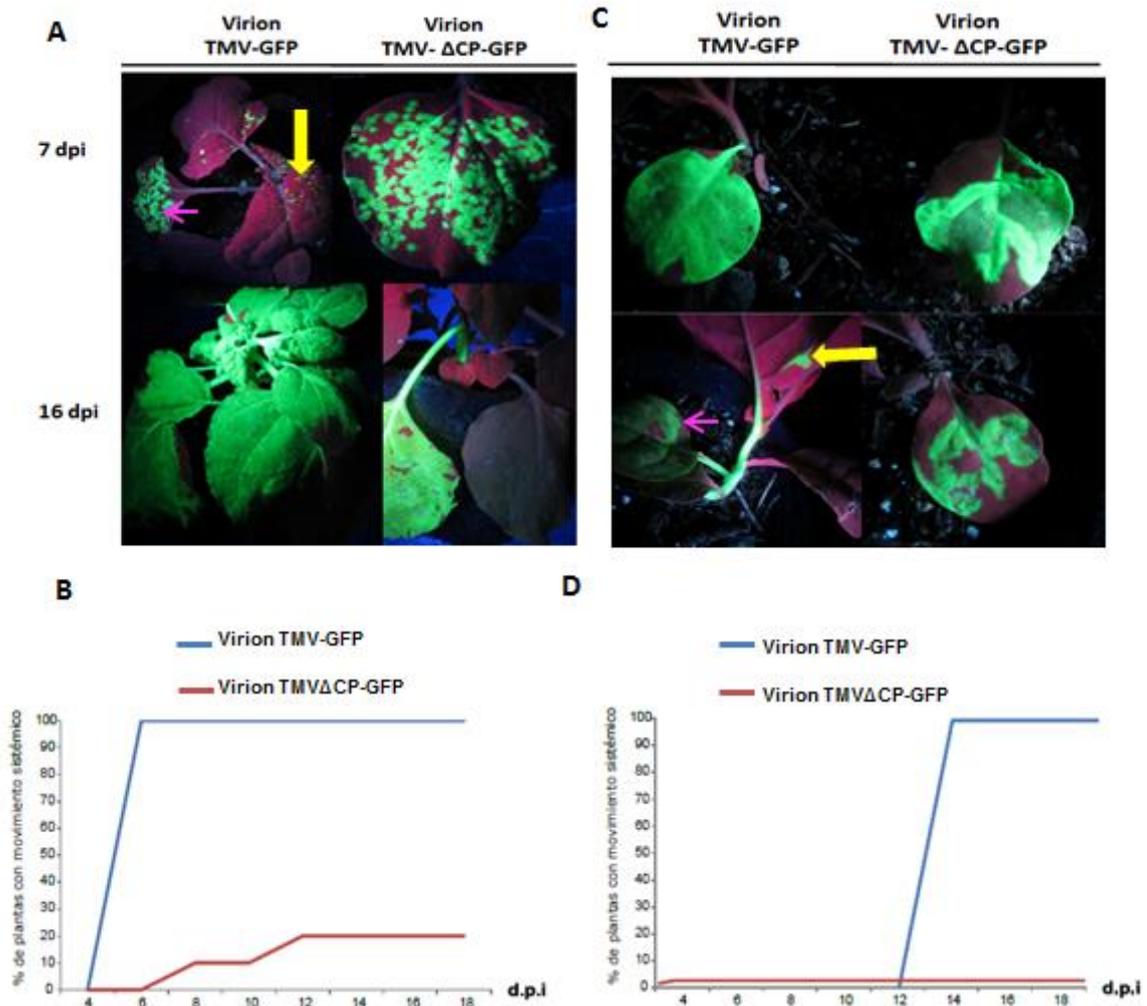


Figura 4.2: Esquema del establecimiento de condiciones experimentales de los viriones TMVΔCP-GFP y TMV-GFP. A) Ensayo realizado en plantas de *N. benthamiana*. Visualización mediante luz UV a 365 nm. Se tomaron fotos a diferentes tiempos, se ilustran solo 7 y 16 dp.i. A modo de ejemplificación, en el panel superior A, se muestra con una flecha rosa la hoja dónde se inoculó el virus y con una amarilla la aparición de GFP sistémico. B) Porcentaje de plantas del ensayo A que presentan movimiento sistémico en función de los días pos infección (d.p.i). C) Réplica del ensayo A realizado en *N. tabacum*. En el panel inferior, se muestra con una flecha rosa la hoja dónde se inoculó el virus y con una amarilla la aparición de GFP sistémico. D) Porcentaje de plantas del ensayo C en *N. tabacum*.

Por otro lado, para el caso de las plantas de *N. benthamiana* infectadas con TMVΔCP-GFP que presentaron movimiento a larga distancia, se verificó que no hubiese una contaminación con el virus entero que explicaran este fenotipo. Se tomaron muestras del tejido sistémico de las 4 réplicas biológicas, se extrajo ARN, se realizó ADNc utilizando *random primers* y se hicieron distintas PCRs (RT-PCRs). Se utilizaron oligonucleótidos específicos que permitieran corroborar la presencia del gen de la MP en ambas construcciones, y la del gen de la CP de TMV solo en el caso del virus completo. Como control positivo se usaron dos plantas infectadas con TMV-GFP. No se detectó virus salvaje, lo que permitió descartar que el fenotipo fuese dado por

contaminación en las plantas tratadas con TMV Δ CP-GFP (Figura 4.3 A y B). La réplica 2, del tratamiento con el virus deficiente de CP, no presentó producto de amplificación en el control actina, por lo que se puede inferir que probablemente se degradó durante el proceso de extracción (Figura 4.3 C). Paralelamente a esta verificación, se realizó otra validación: se tomó tejido de las mismas 4 plantas, se extrajeron los viriones y se infectaron nuevas plantas *N. benthamiana*. Solo se observó GFP a nivel local (donde se realizó la infección), es decir, no se produjo movimiento sistémico del TMV Δ CP-GFP, corroborando nuevamente la ausencia de contaminación (Figura 4.3 D)

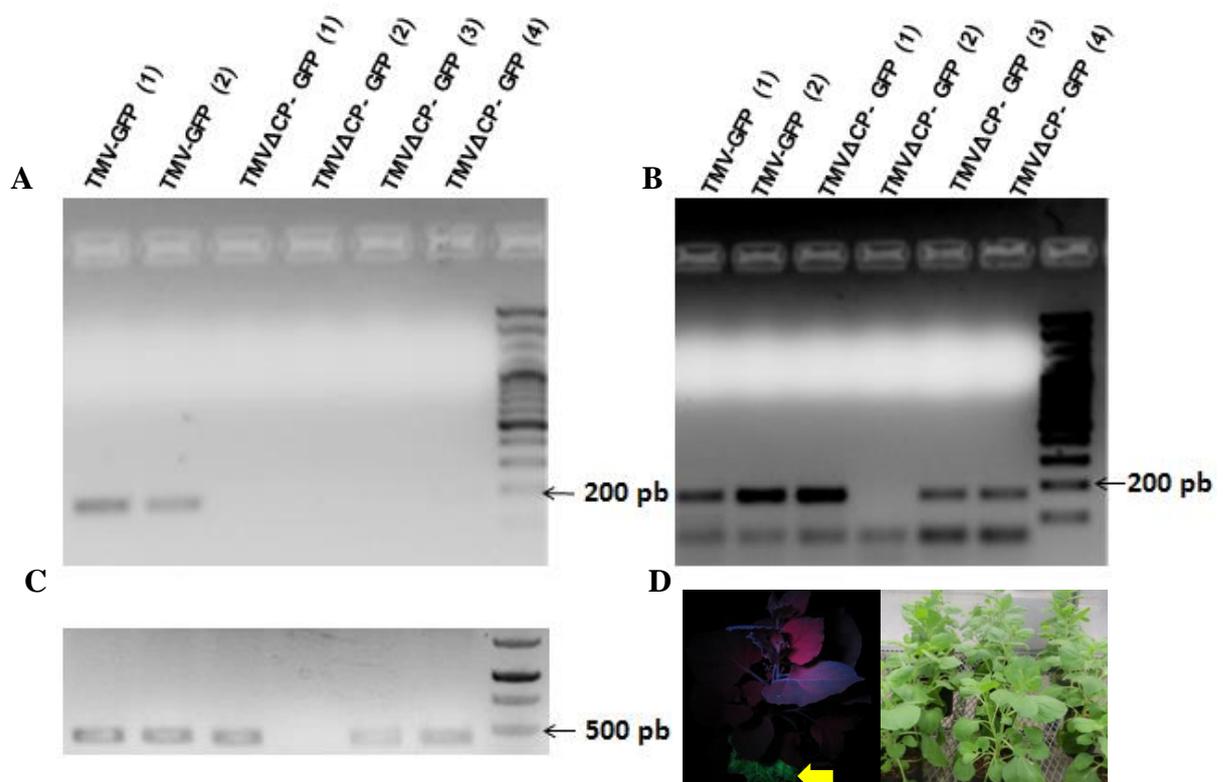


Figura 4.3: Detección molecular de la presencia de los genomas virales de TMV-GFP y TMV Δ CP-GFP a partir de RT-PCR. A) Ampliación de una región del gen de la CP de TMV. El marcador de peso molecular utilizado fue *GeneRuler 100 pb*. B) Ampliación de una región del gen de la MP de TMV. El marcador de peso molecular utilizado fue *GeneRuler 100 pb*. C) Ampliación de una región del gen de la Actina. El marcador de peso molecular utilizado fue *GeneRuler 1 Kb*. La muestra TMV Δ CP-GFP (2) no presentó producto de amplificación en ninguna de las RT-PCR. D) *N. benthamianas* infectadas con partículas tomadas de tejido previamente tratado con TMV Δ CP-GFP. Se muestra con una flecha amarilla la hoja dónde se inoculó el virus. No se observa GFP en tejido distal (panel izquierdo) y no se visualizan síntomas (panel derecho)

4.3 La expresión de la CP de TMV complementa en *cis* y *trans* el movimiento sistémico del virus TMV defectivo de la CP

Con base en resultados previos del laboratorio, que demuestran que tanto la CP de TMV U1 como la CgCP de TMV-Cg son capaces de reducir los niveles de expresión de los genes que responden a la vía de SA, como PR1 y *RDR1* en *N. tabacum*, y *WRKY70*, *AOX1A* y *RDR1* en *Arabidopsis* (Conti et al., 2012; Rodríguez et al., 2014), se decidió validar si la CP de TMV U1 es capaz de permitir el movimiento sistémico de TMVΔCP (virus defectivo de CP).

Para ello, se utilizó un vector binario que expresa la CP de manera inducible (VGE-5XG:M35S::U1CP) en los ensayos en *N. benthamiana* que se detallan a continuación:

- i) Ensayo en *cis* (control): Infiltración de todas las hojas posibles con una Agrobacteria vacía (GV3101 sin plásmido) seguido de infección con el virus TMVΔCP-GFP en una de las hojas pretratadas.
- ii) Ensayo en *cis*: Infiltración de todas las hojas posibles con una Agrobacteria que porta el vector de expresión inducible de CP, seguido de infección con el virus TMVΔCP-GFP en una de las hojas pretratadas.
- iii) Ensayo en *trans* (control): Infiltración de todas las hojas posibles con una Agrobacteria vacía (GV3101), a excepción de una de las hojas superiores (más joven) que se deja libre para poder infectar con el TMVΔCP-GFP
- iv) Ensayo en *trans*: Infiltración de todas las hojas posibles con una Agrobacteria que porta el vector de expresión inducible de CP, a excepción de una de las hojas superiores (más joven) que se deja libre para poder infectar con el TMVΔCP-GFP.

Inicialmente se agroinfiltraron un total de 80 plantas (20 para cada tratamiento). Luego, todas las plantas fueron tratadas con el inductor MOF 24 hs post infiltración. Transcurridas otras 72 hs, se infectó con el virus TMVΔCP-GFP en la hoja correspondiente a cada tratamiento (ver esquema del ensayo en la Figura 4.4). Se realizó el seguimiento de la infección viral a lo largo del tiempo (7, 8, 10 y 14 dpi) a través de la detección de GFP en tejidos sistémicos con una lámpara manual de luz UV. A partir de los resultados, se puede deducir que en los tratamientos donde se expresó la proteína CP, tanto en *cis* como en *trans*, fue facilitado el movimiento sistémico del virus TMVΔCP-GFP. En el caso del tratamiento en *cis*, la complementación del rol de CP fue muy similar a lo observado para el virus salvaje (Figura 4.5 A y Figura 4.2 A y B). No solo en referencia al porcentaje de plantas que presentaban GFP en sus tejidos sistémicos, sino además en el grado de acumulación de dicha proteína y en las características fenotípicas que presentaron los focos de GFP (Figura 4.5 A y C). Este efecto además conllevó a observar síntomas más severos en algunas de las

plantas de este tratamiento. Una observación importante es que en el tratamiento en *trans*, a diferencia del *cis*, la aparición de GFP en los tejidos distales se presenta con un patrón de dispersión diferente, en la mayoría de los ensayos, alejada de la nervadura principal y se observan menos focos de infección pero de mayor tamaño a los observados en el tratamiento en *cis* (Figura 4.5 B y C). Además en ciertos casos, en el tratamiento en *trans* se observa fluorescencia de GFP en tejidos de mayor desarrollo que el tejido sumidero al cual usualmente se dirige el virus salvaje, mientras que en el tratamiento en *cis* la fluorescencia se observa mayoritariamente en hojas más jóvenes. Es decir, el movimiento del virus TMVΔCP-GFP complementado por la CP en *trans* presenta algunos puntos sutilmente diferentes al observado tanto en *cis* como con el virus salvaje. (Figura 4.2 A y 4.5). De todas maneras, el tratamiento en *trans* claramente permitió validar que la CP de TMV es capaz de modular negativamente la defensa del sistema inmune facilitando el movimiento sistémico del virus defectivo en CP. Estos experimentos fueron realizados por duplicado (ver Anexo C) y el análisis estadístico se realizó utilizando Modelos Lineales Generalizados Mixtos (MLGM) sobre ambos ensayos. Dado que arrojaron resultados similares, se escogió uno de los dos y se graficó (Figura 4.5).

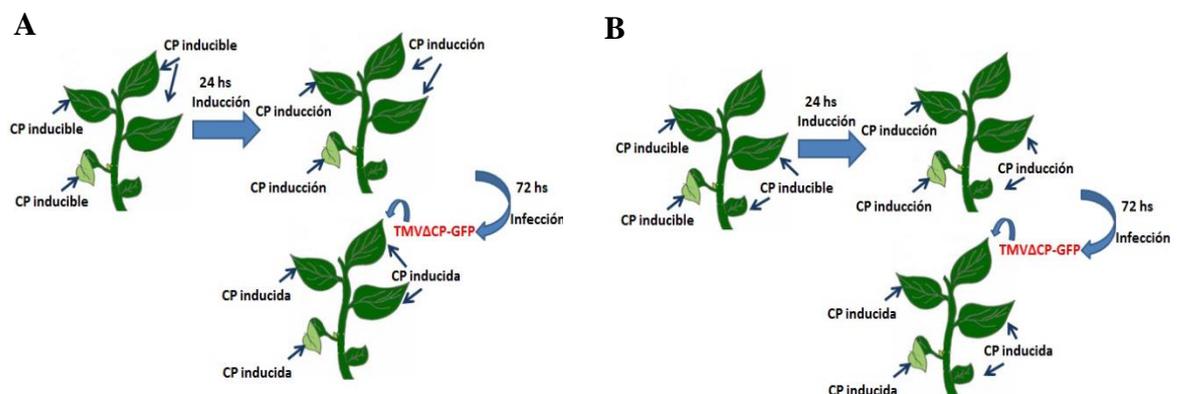


Figura 4.4: Esquema de agroinfiltración e infección con TMVΔCP-GFP. Los controles de ambos tratamientos corresponden a la infiltración de GV3101 en lugar de "Cp inducible". En primer lugar se agroinfiltra la construcción y 24 hs después se realiza la inducción. Luego, al cabo de 72 hs se infecta con TMVΔCP-GFP A) Procedimiento realizado para la agroinfiltración de CP en *cis*. B) Procedimiento realizado para la agroinfiltración de CP en *trans*.

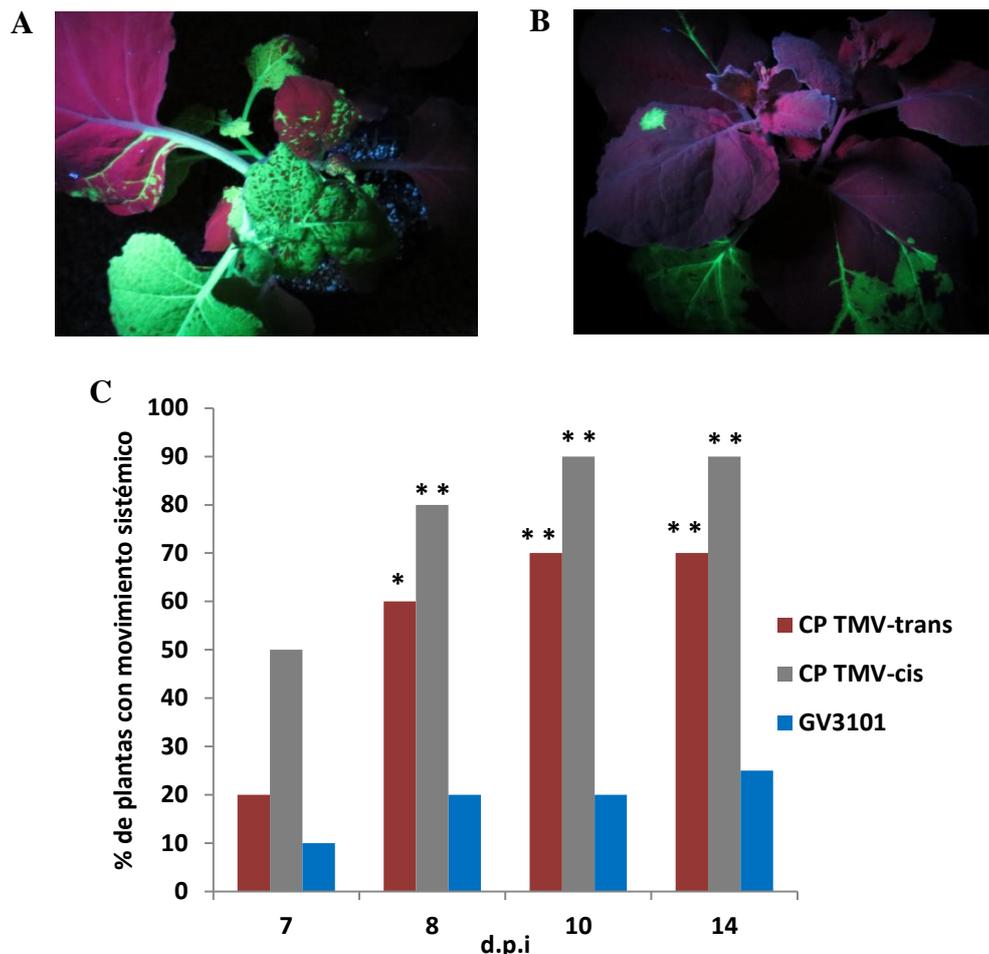


Figura 4.5: La CP de TMV es capaz de complementar el movimiento sistémico del virus de TMV de la CP tanto en cis como en trans. A) Tratamiento correspondiente a la agroinfiltración en cis de CP. B) Tratamiento correspondiente a la agroinfiltración de CP en trans. C) Se representa el porcentaje de plantas *N.benthamiana* que presentan TMVΔCP-GFP en los tejidos sistémicos. El gráfico ilustra uno de los dos ensayos independientes realizados conformados por 20 réplicas biológicas por tratamiento; la estadística (utilizando MLGM) fue realizada a partir de ambos. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, * valores de $p \leq 0.1$, ** valores de $p \leq 0.05$.

4.4 Rol de la estabilización de las proteínas DELLAs en el movimiento sistémico del virus TMV.

Teniendo en cuenta que las proteínas virales modulan la vía de señalización de las hormonas alterando las respuestas de defensa, y que, en particular la CP disminuye la vía del SA por medio de la estabilización de las proteínas DELLAs, se prosiguió a evaluar si dicho efecto permite el movimiento sistémico de TMVΔCP.

Existen especies de plantas que poseen un único gen que codifica para DELLA, como *SLR1* en arroz (Ikeda et al. 2001), o *PROCERA* en tomate (Bassel et al., 2008; Jasinski et al., 2008), mientras que en las Brassicaceae se han multiplicado. Tal es el caso de *Arabidopsis* que posee cinco: *GAI*, *RGA*, *RGL1*, *RGL2* and *RGL3* (Peng et al., 1997b; Silverstone et al., 1998; Tyler et al., 2004). En el caso de *N. benthamiana*, se

realizó una búsqueda por identidad de secuencia en el sitio *Sol Genomics Network* (Fernandez-Pozo et al 2015), encontrando una única proteína similar a la GAI de *Arabidopsis* (denominada GAI1). Al realizar un alineamiento de ambas proteínas se obtuvo un 63% de homología. Además, se utilizó la base de datos *Orthodb*, la cual arrojó el mismo resultado. Esta base de datos utiliza genes codificantes de proteínas de especies eucarióticas y bacterias, para clasificarlos en grupos de ortólogos descendientes de un único gen del último ancestro común de cada clado de especies. *Orthodb* también proporciona información estimada sobre características evolutivas de ortólogos, tales como perfiles génicos de duplicación/pérdida o tasas de divergencia (Waterhouse et al., 2013; Kriventseva et al., 2015; Kriventseva et al., 2018).

Con el objetivo de examinar el efecto de la estabilización de las DELLAs en el movimiento viral, se utilizó una construcción que expresa la proteína GAI de *Arabidopsis* fusionada a YFP en un vector binario: pEarleyGate204, gentilmente cedida por el Dr. Miguel Blázquez (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. Valencia, España). Se agroinfiltraron plantas de *N.benthamiana* con GAI-YFP realizando distintos esquemas de infiltración e infección de manera tal de poner a punto el experimento (Figura 4.6). En todos los casos se ensayaron diferentes combinaciones de agroinfiltraciones foliares, es decir, se variaron los sitios de infección con el virus TMV Δ CP-GFP respecto del sitio de agroinfiltración de GAI-YFP y también los tiempos entre ambas acciones. Luego, se observó en luz UV el progreso de la infección viral a través de la emisión de fluorescencia de GFP (se verifico previamente que la fluorescencia de YFP no interfiriese con la de GFP del vector viral), y como ya se ha descrito anteriormente, se cuantificó el número de plantas que presentaron movimiento sistémico. Como se puede observar en la Figura 4.6, las dos primeras opciones consistieron en agroinfiltrar la mitad de las hojas con la bacteria vacía (GV3101) y la otra mitad con la bacteria que portaba la construcción GAI-YFP. Seguidamente, 72 hs post infiltración, se procedió a infectar una hoja de cada planta con el virus TMV Δ CP-GFP. En la Figura 4.6 A se seleccionó una hoja de las agroinfiltradas con GV3101 y en la Figura 4.6 B una hoja del sector infiltrado con GAI-YFP. En la Figura 4.6 C no existió una ventana temporal entre agroinfiltración e infección, es decir, todas las hojas eran agroinfiltradas y se infectaba en ese mismo momento la hoja superior que no había sido tratada. En la figura 4.6 D al igual que en la Figura 4.6 C se infectó la hoja inmediatamente superior a todas las tratadas con GAI-YFP, pero en este caso, 72 hs después. Finalmente, en las Figuras 4. 6 E y F, se agroinfiltró toda la planta solo con uno de los tratamientos y 72 hs después, la infección se realizaba sobre uno de estos tejidos tratados.

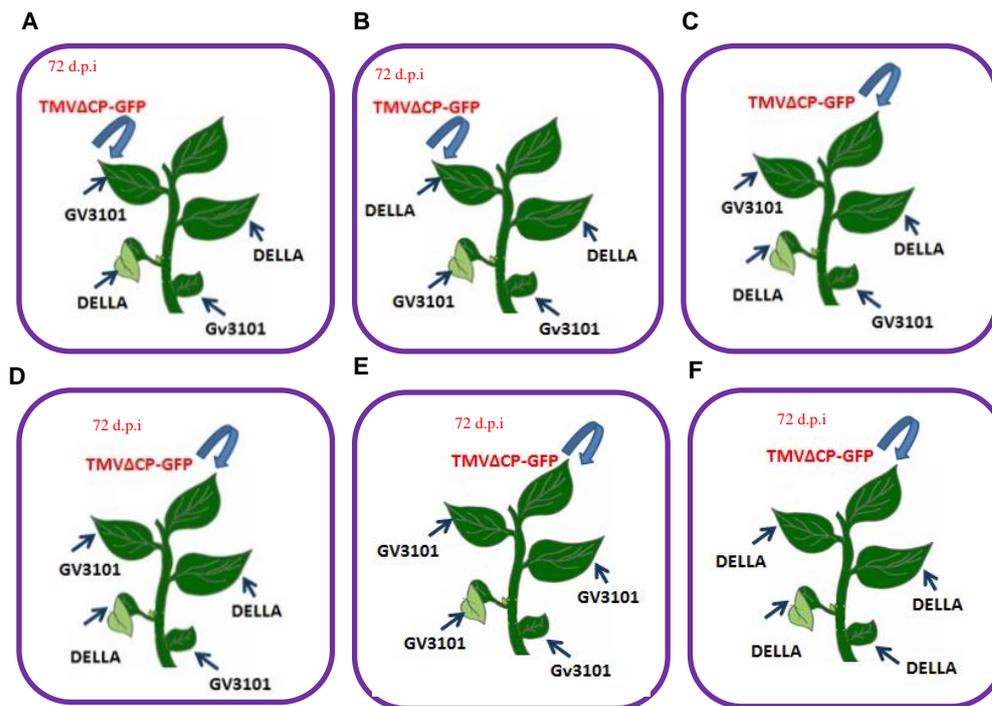


Figura 4.6: Esquemas utilizados de agroinfiltración de GAI-YFP e infección viral con TMV Δ CP-GFP. A) Se agroinfiltran hojas con GV3101 y con GAI-YFP, y se infecta 72 hs después con TMV Δ CP-GFP una hoja de las tratadas con GV3101. B) Se agroinfiltran hojas con GV3101 y con GAI-YFP, y se infecta 72 hs después con TMV Δ CP-GFP una hoja de las tratadas con GAI-YFP. C) Se agroinfiltran hojas con GV3101 y con GAI-YFP y se infecta con TMV Δ CP-GFP una hoja que se encuentra por arriba de una previamente tratada con GAI-YFP. D) Se agroinfiltran hojas con GV3101 y con GAI-YFP y se infecta 72 hs después con TMV Δ CP-GFP una hoja que se encuentra por arriba de una previamente tratada con GAI-YFP. E) Se agroinfiltran hojas con GV3101 y se infecta 72 hs después con TMV Δ CP-GFP una hoja que se encuentra por arriba de una previamente tratada. F) Se agroinfiltran hojas con GAI-YFP y se infecta 72 hs después con TMV Δ CP-GFP una hoja que se encuentra por arriba de una previamente tratada con GAI-YFP.

Para realizar esta puesta a punto se utilizaron 10 plantas por tratamiento y los resultados se encuentran informados en la Tabla 4.1.

Como primera observación de estos ensayos preliminares se pudo sugerir que la presencia de la GAI-YFP facilitó el movimiento sistémico del virus TMV Δ CP-GFP. Curiosamente, otra observación es que en algunos casos el virus se dirigía a tejidos más antiguos que la hoja infectada, es decir, hojas fuente dónde había sido agroinfiltrada la construcción GAI-YFP (Figura 4.7); este suceso no ocurría hacia hojas donde se había tratado con Gv3101.

Si bien los ensayos donde las infecciones eran sobre la misma hoja tratada, en muchos casos arrojaron resultados positivos, en otros el experimento se veía interferido ya que la hoja quedaba muy afectada por ambos tratamientos y en algunas ocasiones se producía necrosis. Por esta razón, se descartaron este tipo de esquemas.

D.p.i →	6		8		12		20	
S/F →	Sumidero	Fuente	Sumidero	Fuente	Sumidero	Fuente	Sumidero	Fuente
Esquema A	0	0	2	0	3	0	3	0
Esquema B	1	0	1	1	6	1	6	1
Esquema C	2	0	5	1	6	1	6	1
Esquema D	2	0	5	0	7	0	8	0
Esquema E	0	0	1	0	2	0	2	0
Esquema F	3	0	8	1	9	1	9	1

Tabla 4.1: Resultados obtenidos para los esquemas realizados de la Figura 4.6. Se muestra el número de plantas que presentó movimiento sistémico, ya sea hacia hojas sumidero (S) como a tejidos fuente (F), a diferentes tiempos post infección (d.p.i).

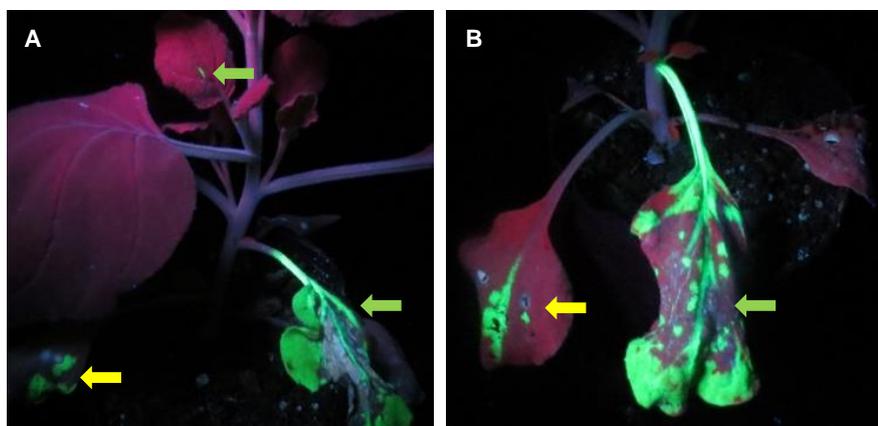


Figura 4.7: Movimiento sistémico de TMV Δ CP-GFP en plantas agroinfiltradas previamente con la construcción GAI-YFP. Las imágenes fueron tomadas utilizando la luz UV a 395 nm y corresponden al tiempo 12 d.p.i. A) *N. benthamiana* que presentó movimiento sistémico tanto hacia tejidos fuente (flecha verde) como al sumidero (hoja previamente tratada con GAI-YFP, flecha amarilla). El lugar de la infección fue indicado con una flecha verde. B) Detalle del movimiento sistémico hacia la hoja sumidero.

A partir de los resultados obtenidos en la puesta a punto, se decidió realizar una caracterización más completa del ensayo utilizando mayor cantidad de plantas. Adicionalmente, se incorporó una versión delecionada de GAI (GAI-M5), también cedida gentilmente por el Dr. Miguel Blázquez (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Valencia, España). Esta construcción comienza en el aminoácido 188 de GAI, es decir, carece del dominio DELLA (localizado en la región de aminoácidos 1-188), entonces al no poder interactuar con el complejo GID-GA, esta proteína se vuelve más estable y se acumula a mayores niveles (Gallego-Bartolomé et al., 2012) (Figura 4.8 A). Se agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* o bien con GAI-YFP o, M5-YFP, y luego de 3 d.p.i se realizó la infección con TMV Δ CP. Como control negativo se realizó la agroinfiltración con GV3101 sola. Para confirmar la expresión de las construcciones y la presencia de las proteínas GAI, se realizaron ensayos de Western blot utilizando un anticuerpo dirigido contra YFP. Se tomaron muestras para extracción

de proteínas de plantas agroinfiltradas (72 hs. post infiltración) con los diferentes tratamientos pero sin infectar con el virus TMV Δ CP-GFP. Los resultados observados en la Figura 4.8 C demuestran la presencia de las proteínas fusionadas a YFP, tanto GAI como M5.

Se evaluó el movimiento sistémico a diferentes tiempos después de la infección mediante la detección de la fluorescencia emitida por GFP con luz UV. Se ilustra a modo de ejemplo a 7 y 16 d.p.i (Figura 4.8 B). A tiempos tempranos se logra visualizar GFP alejado de la nervadura principal en las hojas sumidero, mostrando nuevamente esta diferencia en el movimiento sistémico con respecto al virus salvaje. Como se puede observar en la Figura 4.8 C, fue posible restablecer el movimiento del virus defectivo al estabilizar transitoriamente las DELLAs. Al comparar el tratamiento M5 (GAI estabilizada) con GAI no se observan diferencias significativas en el movimiento a pesar que la acumulación visualizada vía western blot de ambas proteínas es diferente. Probablemente, al realizar la agroinfiltración se producen grandes cantidades de GAI y el sistema se encuentra saturado.

El ensayo fue realizado por duplicado (ver Anexo C), y se analizó estadísticamente mediante MLGM. Se grafica uno de los experimentos independientes representativo conformado por 20 réplicas biológicas por tratamiento (Figura 4.8 C).

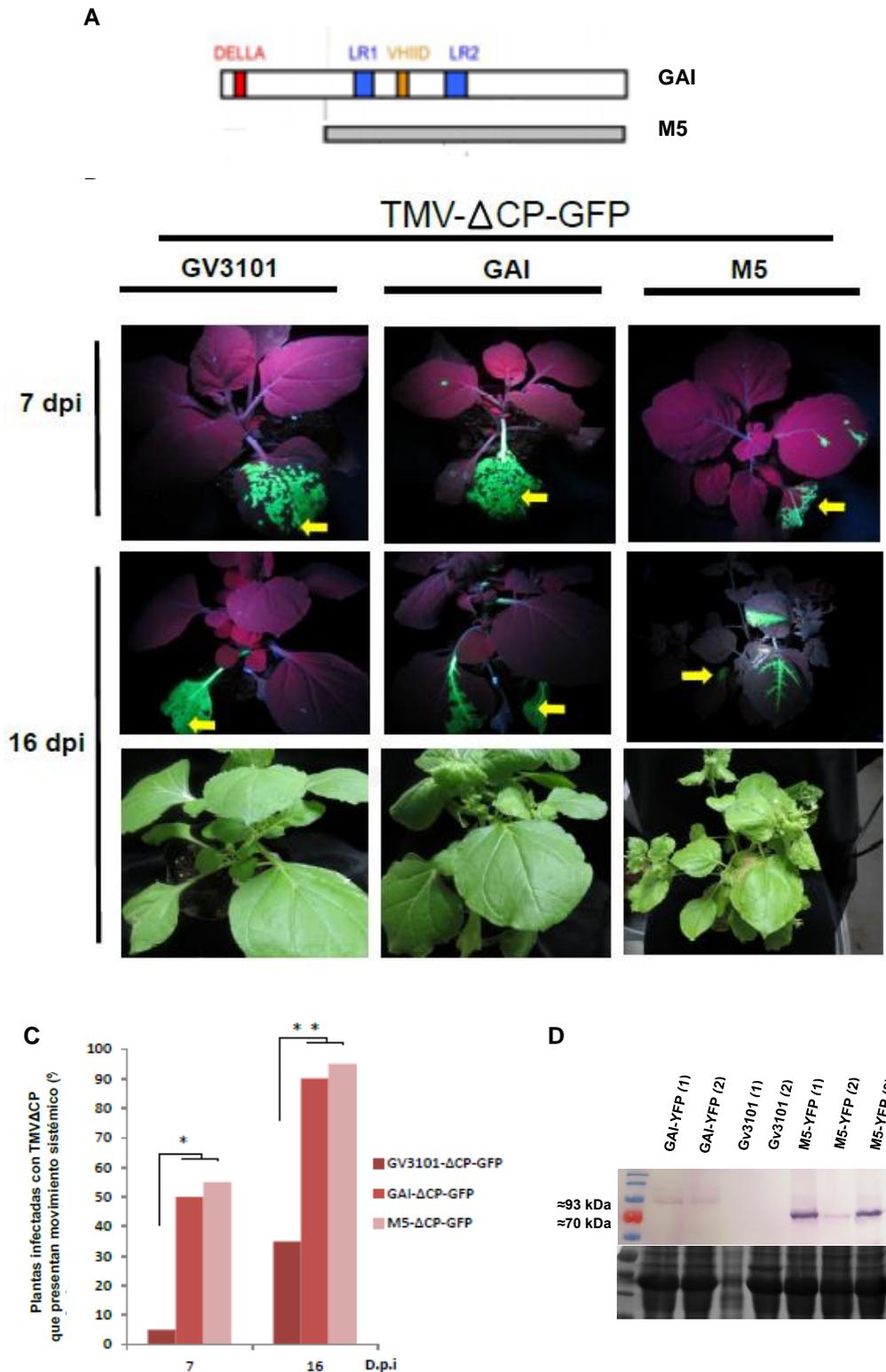


Figura 4.8. La estabilización de las DELLAs mediante expresión transitoria de GAI permite el movimiento sistémico del virus TMV defectivo de la CP. A) Esquema de los constructos utilizados GAI y M5. Tomado de Gallego-Bartolomé et al 2012. B) Se agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* con una construcción que expresa la DELLA GAI o bien M5 y luego de 3 d.p.i se realizó la infección con TMV Δ CP. Como control negativo se agroinfiltró con GV3101. Las imágenes corresponden a los tiempos 7 y 16 días pos infección (d.p.i) iluminadas con luz UV 395 nm. El lugar de la infección fue indicado con una flecha amarilla. C). Porcentaje de plantas con movimiento sistémico a 7 y 16 d.p.i. Análisis estadístico, utilizando MLGM, realizado a partir de dos experimentos independientes, de 20 réplicas biológicas para cada tratamiento en

ambos ensayos. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, * valores de $p \leq 0.1$, ** valores de $p \leq 0.05$. Se grafica uno de ellos en representación. D) Evaluación de la acumulación de GAI-YFP y M5-YFP por Western-blot. Las muestras provienen de plantas agroinfiltradas 72 hs antes con los distintos tratamientos pero sin infectar con el virus. Las proteínas GAI y M5 fueron detectadas con un anticuerpo dirigido contra YFP. La tinción de Ponceau se usó como control de carga para verificar que la concentración de proteínas fue igual en todas las calles del gel sembradas.

Con el objetivo de confirmar y complementar los resultados anteriores, se decidió utilizar una estrategia alternativa para lograr la estabilización de las proteínas DELLA., en este caso mediante la aplicación de un inhibidor de la síntesis de GA: Paclobutrazol (PAC). Dado que este compuesto conlleva a la planta a tener menor cantidad de GA, las proteínas DELLAs no son tan susceptibles a ser enviadas a degradación por acción indirecta de dicha hormona, es decir, se encuentran estabilizadas. A través de esta estrategia alternativa se pretende imitar el rol de estabilización de las proteínas DELLAs reportado para la CP de TMV. Se pulverizaron 20 plantas de *N.benthamiana* con PAC 50 μ M y como control otras 20 plantas fueron tratadas con la misma concentración de DMSO utilizado para disolver el PAC en agua. A las 72 hs pos tratamiento, se realizó una nueva aplicación, previa a la infección con el virus TMV Δ CP-GFP y se realizó el seguimiento del movimiento utilizando luz UV. En la Figura 4.9 se ilustra la presencia de virus en las hojas sistémicas al cabo de 7 días post infección. Se realizó la cuantificación correspondiente a las plantas con movimiento viral a lo largo del tiempo y se graficó los días 7 y 16 d.p.i (Figura 4.9 B). Estos ensayos fueron realizados por duplicado (ver Anexo C) y para los análisis estadísticos se utilizó MLGM. Al igual que en los ensayos de agroinfiltración de GAI, fue posible restablecer el movimiento del virus defectivo al estabilizar las DELLAs (o aumentar su concentración efectiva). En la Figura 4.9 C se puede visualizar las plantas tratadas con PAC vs el control DMSO (diluido en agua) sin haber sido infectadas. Es importante notar que las plantas son más pequeñas y su coloración verde es más oscura, fenotipo esperado por la menor cantidad de GA.

En ambos ensayos donde las DELLAs fueron estabilizadas, se observó un patrón de movimiento del virus TMV Δ CP-GFP similar al visualizado en los ensayos de agroinfiltración de CP en *trans*. Es decir, se repiten las diferencias fenotípicas descritas en 4.3 para el virus deficiente en CP respecto al TMV-GFP. Se observa menor acumulación de GFP, hay menor cantidad de focos y los existentes son de mayor tamaño. Además, aparecen lejos de la nervadura central y en hojas sumidero no tan jóvenes.

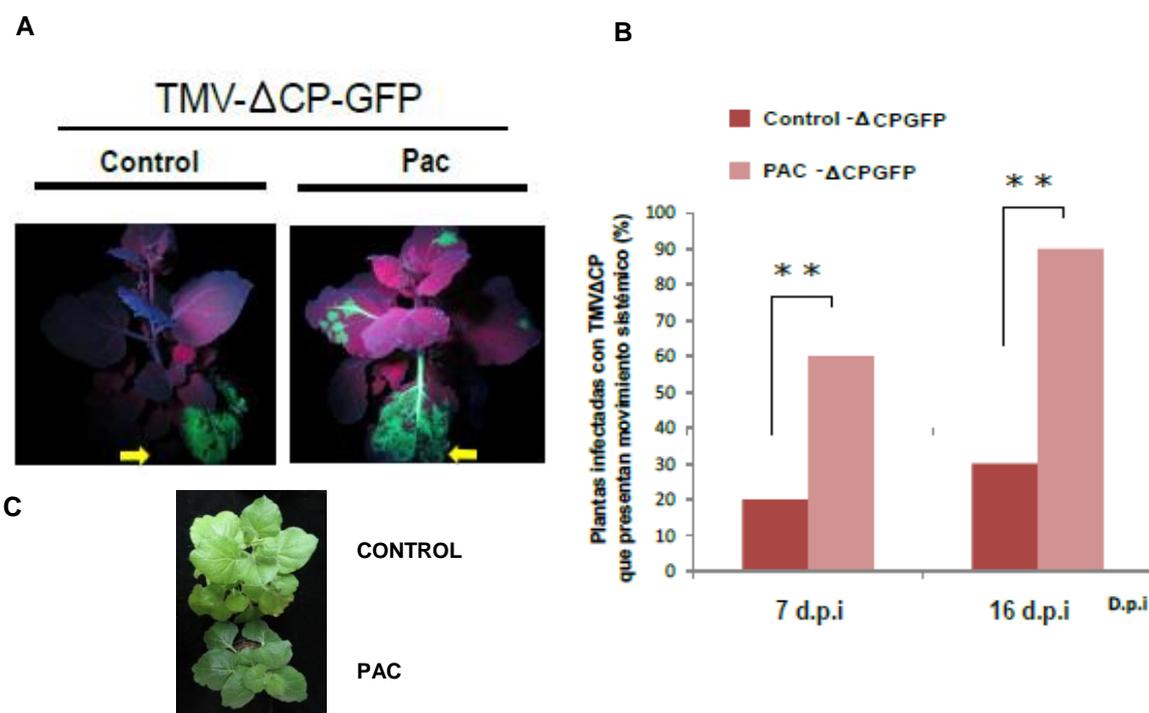


Figura 4.9. La estabilización de las DELLAs mediante aplicación del inhibidor de GA PAC (Paclobutrazol) permite el movimiento sistémico del virus TMV defectivo de la CP. A) Evaluación del movimiento sistémico del virus TMVΔCP a 7 y 16 d.p.i en *N. benthamiana* pulverizadas con PAC 50μM. B) Análisis estadístico, utilizando MLGM, realizado a partir de dos experimentos independientes, de 20 réplicas biológicas para cada tratamiento en ambos ensayos. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, ** valores de $p \leq 0.05$. C) Fenotipo observado para plantas tratadas con PAC vs no tratadas (control).

4.5 Evaluación del fenotipo desarrollado por el silenciamiento de genes de defensa

4.5.1 Estrategia basada en la técnica de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS)

En base a los resultados obtenidos en el objetivo número 1, se decidió, evaluar en primera instancia si los genes NPR1 y TGA10 están involucrados en el movimiento sistémico del virus. Dado que el sistema a utilizar era TMV/*N.benthamiana*/*N.tabacum* y los genes fueron caracterizados hasta el momento en *A.thaliana*, fue necesaria la búsqueda de ortólogos en dichas plantas.

Para llevar a cabo este estudio, y teniendo en cuenta que en *N. benthamiana* y *N.tabacum* no existen mutantes para todos los genes como sucede en *A.thaliana*, se decidió utilizar la técnica de VIGS (Silenciamiento Génico Inducido por Virus) y un sistema basado en vectores TRV modificados (*Tobacco Rattle Virus*) que permiten reducir la expresión del gen a estudiar (Hamilton & Baulcombe, 1999; Y. Liu, Schiff, Marathe, et al., 2002) incorporando un fragmento del mismo en el interior del vector

TRV. Para poder diseñar las construcciones con los genes a silenciar, se tuvo en cuenta la importancia del grado de homología de la secuencia empleada. En general cuanto mayor este valor, mayor es la eficiencia de silenciamiento. Sin embargo existen reportes que muestran que no siempre existe una correlación directa entre el grado de homología de la secuencia heteróloga con la secuencia endógena y la eficiencia de silenciamiento (Senthil-Kumar et al., 2007). Los valores de eficiencia de VIGS dependen de las distintas especies a silenciar. El sistema a utilizar, *N. benthamiana*, posee valores superiores al 90%, mientras que en otras especies de *Solanaceas* los valores de eficiencia esperados no superan el 60% (Senthil Kumar et al, 2007). Se decidió comenzar con el gen *NPR1*, para poder poner a punto dicha técnica. En este caso, la secuencia ortóloga utilizada fue obtenida del trabajo de Liu et al., 2002 (Tabla 4.2). Como control negativo se utilizó el gen bacteriano *UIDA* que codifica para la enzima β -glucuronidasa (GUS) (Jefferson et al., 1987), dado que no presenta homología con ninguna secuencia genómica de la planta. Para verificar esta información, se utilizó la herramienta BLAST de la base de datos *Sol Genomics Network* (Fernandez-Pozo et al., 2015). No se obtuvieron secuencias similares en los genomas de *N.tabacum* y *N.benthamiana*.

Los fragmentos parciales de *NbNPR1* y *GUS* fueron amplificados mediante la técnica de PCR e introducidos en el vector pTRV2-GW. (Figura 4.10). Con estos plásmidos se transformaron *Agrobacterias* de la cepa GV3101. Posteriormente, se mezclaron alícuotas equivalentes de GV3101-pTRV1 y pTRV2 con las distintas construcciones (*GUS* o *NbNPR1*) y se prosiguió a realizar el ensayo. Se agroinfiltraron hojas (todas las posibles) de *N.benthamiana* y 7 días después se infectó la hoja que se encontraba inmediatamente por arriba de la última tratada. Se utilizaron 30 plantas para cada tratamiento. Por otro lado, se adicionaron 30 *N. benthamiana* las cuales fueron infiltradas con la bacteria GV3101 (sin los vectores TRV) e infectadas con TMV Δ CP-GFP como control negativo del impacto de la agroinfiltration *per-se* sobre el movimiento viral.

Sorprendentemente, los resultados no fueron los esperados respecto a la utilización de la técnica VIGS. A los 7 días luego de la infección, de las 30 plantas que contenían el vector GUS, 18 presentaban el virus TMV Δ CP-GFP en sus tejidos sistémicos. De hecho, a los 12 d.p.i casi la totalidad de ellas presentaron movimiento sistémico (Figura 4.10 B, panel inferior). Estos resultados fueron obtenidos en tres repeticiones de los experimentos independientes.

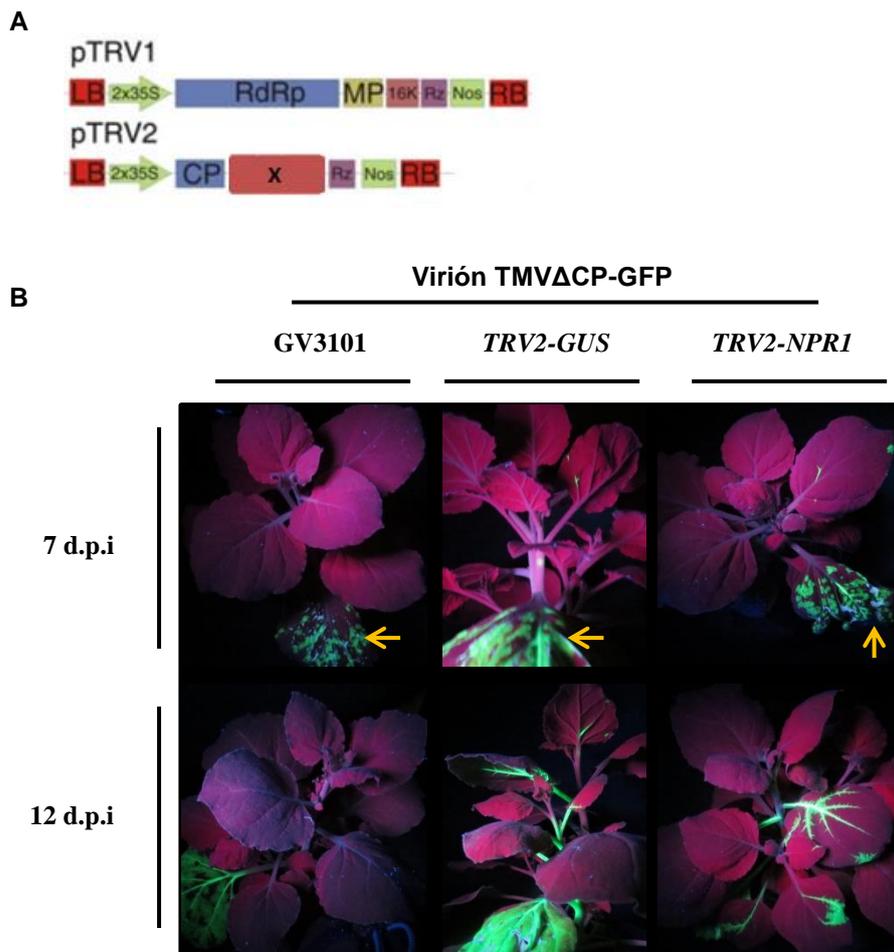


Figura 4.10: Ensayo de técnica de VIGS realizado en *N.benthamiana*. A) Esquema del sistema de constructos utilizados en la técnica de VIGS. La letra "X" representa el sitio donde es clonado el fragmento de la secuencia del gen a silenciar. B) Plantas de *N.benthamiana* infiltradas con los distintos tratamientos: GV3101, TRV1-TRV2-GUS o TRV1-TRV2- *NbNPR1*, infectadas luego con el virus TMVΔCP-GFP. Se tomaron fotos de las imágenes observadas con luz UV de 365 nm a diferentes tiempos, se ilustran solo 7 y 16 dp.i, se muestra con flechas amarillas las hojas dónde se inoculó el virus.

4.5.2 Estrategia basada en la técnica de silenciamiento génico inducido por horquillas de silenciamiento

A partir de resultados obtenidos mediante el uso de VIGS se decidió utilizar otra técnica de silenciamiento ya que la sola presencia del virus TRV (el TRV-gus, es decir, el control) alteraba el sistema de forma tal que no había diferencias entre el control negativo y el positivo. Por lo tanto, se utilizaron horquillas de expresión transitoria como nueva estrategia para reducir los niveles de expresión de genes de interés. La construcción utilizada, basada en el vector pB7GWIWG2(II), produce ARN de doble cadena (ARN en horquilla) a partir de la secuencia de interés insertada, lo que induce el silenciamiento génico postranscripcional de una manera eficiente, algo menos potente que VIGS pero independiente de la utilización de vectores virales (Karimi et al., 2002; Wesley et al., 2001).

Dado que los genes candidatos escogidos en el Objetivo II fueron caracterizados en *Arabidopsis*, se prosiguió a identificar sus correspondientes ortólogos en *Nicotiana*. Para ello, se seleccionaron secuencias ya reportadas como ortólogas y en los casos que no existían dichas publicaciones, se realizó la búsqueda. Se utilizó tanto la base de datos *Sol Genomics Network* así como también *Orthodb*. Respecto a la primera, en particular, se utilizó la herramienta VIGS (App) que posee este sitio para poder seleccionar el fragmento que induzca el silenciamiento génico postranscripcional de manera más específica y eficiente (Fernandez-Pozo et al, 2015).

Una vez seleccionados los genes y sus regiones, en todos los casos se realizaron las PCRs a partir de ADNc de *N. benthamiana* para obtener los distintos fragmentos. Éstas amplificaciones fueron introducidas en un vector pCR®8/GW/TOPO® (Invitrogen®) y posteriormente su secuencia fue verificada por secuenciación. Seguidamente, se realizó una reacción de recombinación LR (LR Clonase Enzyme Mix de Invitrogen®), para poder obtener cada uno de los fragmentos en el vector binario pB7GWIWG2(II) (horquilla, hp). Es importante aclarar que este plásmido posee doble sitio de recombinación lo que le permite posteriormente armar la horquilla. Por esta razón, se verificó que el inserto se encontrara introducido en ambos sitios. Luego, se realizó la transformación de *Agrobacterium* con los vectores para poder hacer los ensayos funcionales en *N. benthamiana*. Estos experimentos fueron repetidos entre dos y cuatro veces y las réplicas varían desde 10 a 20 individuos por tratamiento. Luego, para cada tratamiento se escogió un ensayo que fuese representativo respecto al resto para poder graficar. Los análisis estadísticos fueron realizados contemplando todos los experimentos independientes (ver Anexo C), utilizando Modelos Lineales Generalizados Mixtos (MLGM).

4.5.3 Rol de NPR1 y TGA10 en el movimiento sistémico del virus TMV

Para poder armar las horquillas, en el caso de *NbNPR1* se seleccionó la secuencia usada anteriormente en VIGS y para el caso de *TGA10* se prosiguió a la búsqueda del ortólogo como se mencionó anteriormente. El gen obtenido fue *NtTGA10*, descrito en *N. tabacum* (Schiermeyer et al., 2003) (Tabla 4.2).

Gen descrito en Arabidopsis	Ortólogo en <i>N.benthamiana</i> <i>N.tabacum</i>	Fuente bibliográfica/ Base de datos utilizada
<i>NPR1</i>	<i>NbNPR1</i>	Liu et al., 2002
<i>TGA10</i>	<i>NtTGA</i>	Schiermeyer et al., 2003
<i>EDS1</i>	<i>NbEDS1</i>	Liu et al., 2002
<i>RAR1</i>	<i>NbRAR1</i>	Liu et al., 2002
<i>CNI1</i>	<i>CNI1-LIKE</i>	Base de datos <i>Orthodb</i>
<i>ERF6</i>	<i>ERF6-LIKE</i>	Base de datos <i>Orthodb</i>
<i>WRKY33</i>	<i>NbWRKY8</i>	Ishihama et al., 2011

Tabla 4.2: Genes descritos en *Arabidopsis* y sus ortólogos en *N.benthamiana* y *N.tabacum*. Se informa la fuente bibliográfica o la base de datos utilizada para obtener dicha secuencia para cada gen.

Entonces, con el fin de evaluar si los genes de interés seleccionados están implicados en el movimiento sistémico del TMV mediante la reducción de la defensa ejercida vía la CP, se procedió a cuantificar el movimiento sistémico del TMV Δ CP-GFP en plantas de *N. benthamiana knockdown* para *NbNPR1*, *NtTGA10* y *GUS* como control. Para ello, se agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* con cada una de las horquillas y 7 días después, se realizó la infección con TMV Δ CP-GFP. Luego, se visualizaron las plantas con una lámpara manual de luz UV de 365 nm a 6, 7, 8, 12, 14 y 18 d.p.i y se cuantificó el número de plantas con presencia de virus en tejidos sistémicos mediante la observación de fluorescencia de GFP (Figura 4.11). Se tomaron fotos a los diferentes tiempos, y se escogieron dos de ellos representativos para ilustrar, donde además se indicó con una flecha amarilla las hojas donde se realizó la infección. Nuevamente, a tiempos tempranos, comienza a observarse, en las plantas tratadas con *NbNPR1* y *NtTGA10*, fluorescencia en las hojas sumidero, alejada de la nervadura principal y con un patrón de movimiento similar al visualizado en los ensayos de agroinfiltración de CP en *trans* (Figura 4.11 A, panel superior). Sin embargo, en el panel correspondiente a 16 d.p.i, la proteína GFP ya se puede visualizar cubriendo gran parte de las hojas sistémicas. Por otro lado, en la Figura 4.11 B se aprecian los síntomas típicos de TMV en las plantas tratadas previamente con *NtTGA10* y *NbNPR1*. Para el caso de NPR1 el ensayo fue realizado por cuadruplicado, mientras que para TGA fue por quintuplicado (ver Anexo C). En la Figura 4.11 C se puede observar la cuantificación de plantas con presencia de virus sistémico. Para realizar el gráfico se utilizó un ensayo representativo de la media. De esta manera, fue posible restablecer (complementar) significativamente el movimiento sistémico del virus defectivo en CP en plantas donde previamente *NbNPR1* o *NtTGA10* había sido

silenciado, pudiendo inferir que dichos genes tienen un rol importante en la defensa antiviral y sobre los cuales CP ejerce un efecto de modulador negativo que permite el movimiento sistémico.

Para corroborar el nivel de silenciamiento obtenido en estas plantas previo al inicio de la infección, se agroinfiltraron plantas en paralelo o con la construcción *hp-NbNPR1* o con *hp-GUS*, y se tomaron muestras de tejido sistémico a 7, 10 y 14 d.p.i. Es decir, estas plantas no fueron infectadas con el virus TMV Δ CP-GFP. Se realizó la extracción de ARN, y se realizó RT-qPCR. Las secuencias blanco seleccionadas para la RT-PCR de los genes a silenciar corresponden a una región distinta al fragmento seleccionado para inducir el silenciamiento. Como se puede observar en la Figura 4.12 A, se verificó que en los tiempos analizados la expresión del gen *NPR1* en plantas donde justamente fue silenciado este gen, se encontraba disminuida respecto a las tratadas con el control negativo (*hp-gus*). Para el caso de *NtTGA10*, y teniendo en cuenta el antecedente de *NbNPR1*, se seleccionó un tiempo, 7 d.p.i, para poder confirmar el silenciamiento de dicho gen (Figura 4.12 B)

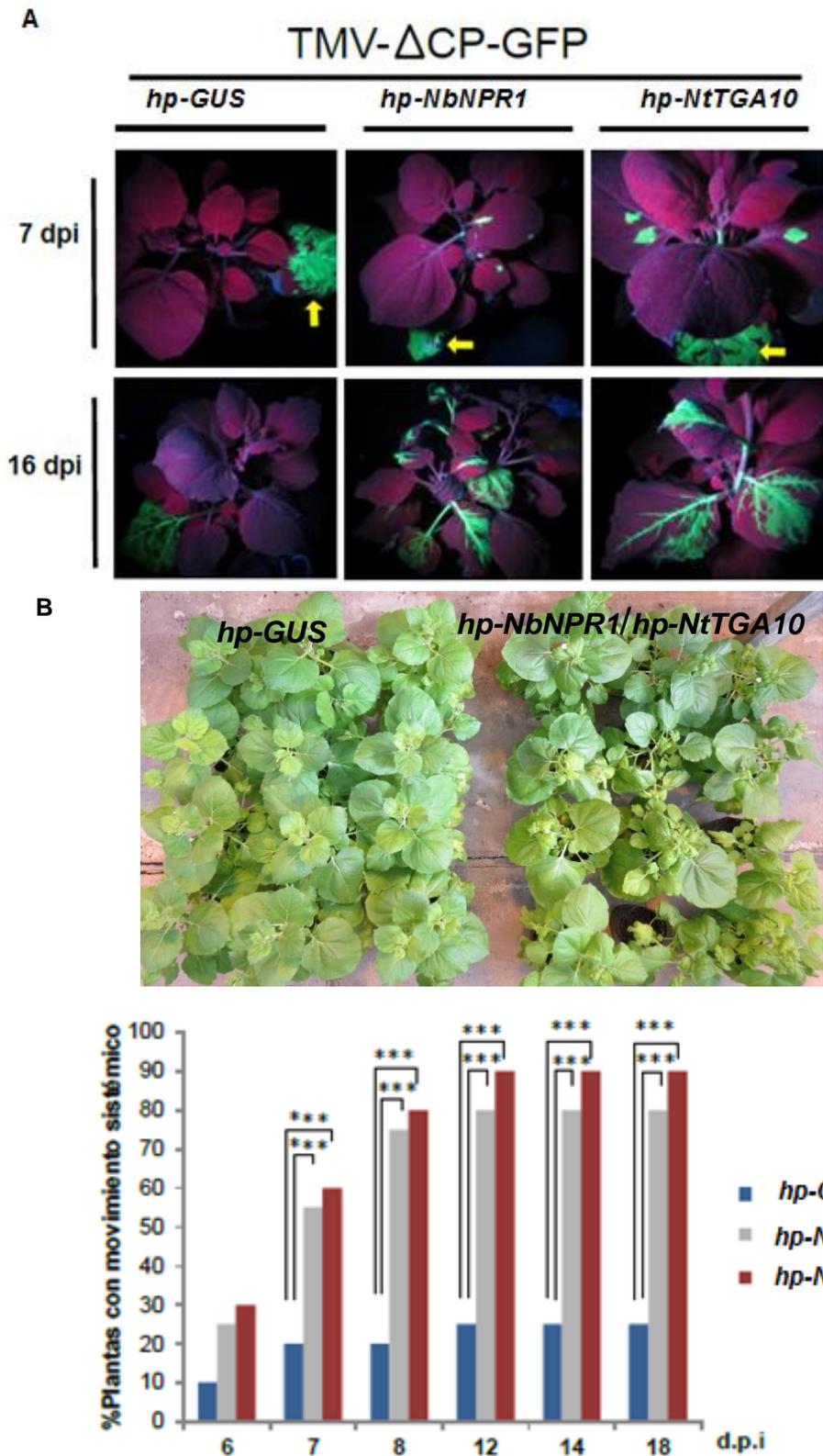


Figura 4.11: CP ejerce un efecto de modulador negativo sobre el gen *NPR1* y *TGA10* en plantas de *N. benthamiana*. Se utilizó el constructo del virus defectivo en la CP fusionado a GFP para poder visualizar el avance de la infección. Con dicha construcción se procedió a la evaluación del movimiento sistémico de los constructos defectivos en CP en plantas defectuosas para *NPR1* o *TGA10*. Para ello, se agroinfiltraron plantas *N. benthamiana* o bien con la construcción *hp-NbNPR1*, o bien con *hp-NtTGA10*, y 7 días después se infectaron con el virus TMV Δ CP. Como control negativo se utilizó una horquilla de silenciamiento para *GUS* (*hpGUS*). A) Se evaluó el movimiento sistémico a diferentes tiempos después de la infección con luz

UV en *N. benthamiana* y se ilustra a 7 y 16 días B) Imágenes de plantas infectadas para los tratamientos hp-gus (grupo de la izquierda) y *hp-NbNPR1* y *hp-NtTGA10* (grupo de la derecha). Se observan síntomas en las plantas el panel derecho y ausencia de los mismos en el izquierdo. C) Porcentaje de plantas con movimiento sistémico en función del tiempo en *N. benthamiana* para: *hp-NbNPR1* / Δ CP-GFP; *hp-NtTGA10* / Δ CP-GFP y *hp-GUS* / Δ CP-GFP. El ensayo fue realizado 4 veces en el caso de *hp-NbNPR1* vs *hp-GUS* y 6 veces para *hp-NtTGA10* vs *hp-GUS*; se seleccionó un experimento representativo constituido por 20 réplicas biológicas y el análisis estadístico utilizado, Modelos Lineales Generalizados Mixtos, contempló todos los ensayos. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, valores de $p \leq 0.001$

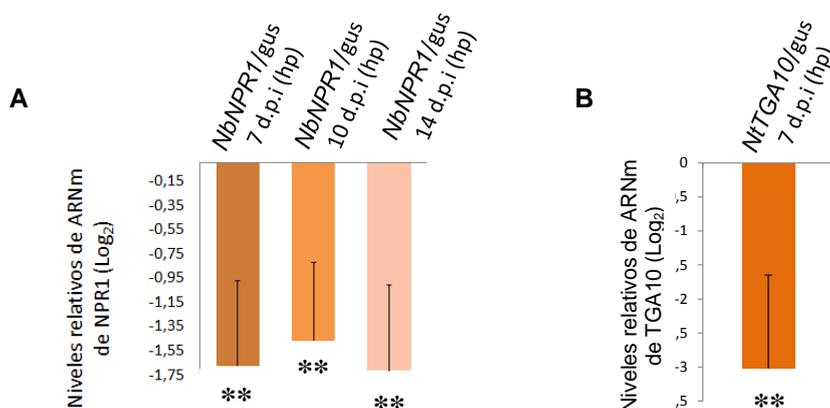


Figura 4.12: Niveles relativos de mRNA de *NbNPR1* y *NtTGA10* determinados por RT-qPCR en plantas de *N.benthamiana*. A) Se realizó la cuantificación a 7, 10 y 14 días pos infiltración de la horquilla *hp-NbNPR1*. Se muestran las medias \pm SE de ocho repeticiones biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, valores de $p \leq 0.05$ B) Se realizó la cuantificación a 7 días pos infiltración de *hp-NtTGA10*. Se muestran las medias \pm SE de 5 repeticiones biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, valores de $p \leq 0.05$

Luego, se decidió hacer el ensayo en *N. tabacum* y se seleccionó el gen *NPR1* por ser un factor de transcripción regulador maestro de las vías de defensa dependientes del SA. A pesar de no obtener resultados estadísticamente significativos, la tendencia es consistente con los resultados obtenidos para *N. benthamiana*. En este sistema, nuevamente, se observa una defensa más robusta que en *N. benthamiana*, tanto para el caso de la *hp-NbNPR1* como también para el control negativo, donde no hubo plantas infectadas con hp-gus capaces de sobrepasar a las vías de defensa (Figura 4.13 B). Al igual que sucedía con *N. benthamiana* a tiempos tardíos es posible apreciar los síntomas característicos de TMV (Figura 4.13 A, panel 20 d.p.i). Este ensayo fue realizado por triplicado.

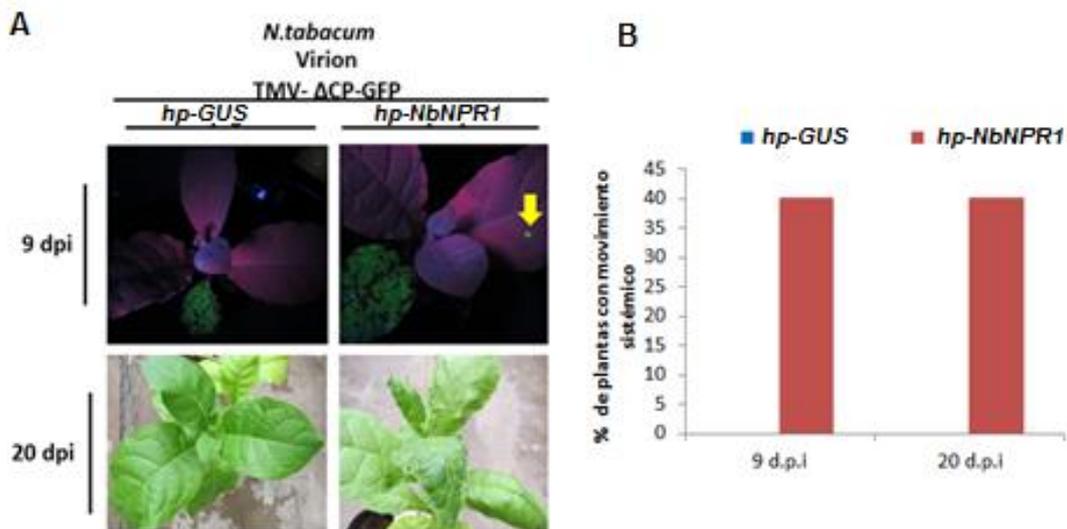


Figura 4.13: Movimiento sistémico a diferentes tiempos después de la infección en *N. tabacum*. A) Imágenes seleccionadas para ilustrar el movimiento sistémico observado a 9 y 20 d.p.i con luz UV. La flecha amarilla indica el sitio donde se observa presencia de GFP en tejidos sistémico. B) Porcentaje de plantas con movimiento sistémico en función del tiempo en *N. tabacum*. Se utilizaron 20 réplicas biológicas. El análisis estadístico utilizado, Modelos Lineales Generalizados Mixtos, contempló todos los ensayos realizados.

4.5.4 Rol del SA y del gen EDS1 en el movimiento sistémico de TMV

Para verificar experimentalmente si la vía SA-NPR1 está a su vez implicada en el movimiento sistémico del virus, se utilizaron plantas transgénicas NahG de *N. benthamiana* y *N. tabacum* (Figura 4.14). Estas plantas transgénicas expresan el gen NahG de la bacteria *Pseudomonas putida*, que codifica para una enzima llamada salicilato hidroxilasa la cual metaboliza al SA para convertirlo en catecol, evitando así su acumulación (Gaffney et al, 1993; Delaney, 1994). Se prosiguió entonces a la infección de estas plantas con TMV Δ CP-GFP y se observó que las *N. benthamiana* NahG mostraron mayor porcentaje de movimiento viral respecto a los controles (Figura 4.14 A). El ensayo fue realizado por duplicado, utilizando 20 réplicas biológicas. Es importante remarcar que los porcentajes observados son inferiores a los obtenidos en las plantas con *npr1* silenciado, esto podría deberse a que estas transgénicas poseen, aunque bajos, niveles de SA, lo cual podría ser suficiente para activar algunas moléculas de NPR1 y las vías correspondientes. Sin embargo, el fenotipo observado en las plantas que presentaron GFP en tejidos sistémicos (Figura 4.14 C), nuevamente es similar a los ensayos descritos anteriormente (Figuras 4.5, 4.8, 4.9, 4.11). Para el caso de *N. tabacum*, no se obtuvieron resultados significativos, pero la tendencia observada en las dos repeticiones independientes realizadas fueron consistentes con lo visualizado en *N. benthamiana* (Figura 4.14 B). En la Figura 4.14 D se aprecian los

síntomas observados en las plantas *N. tabacum* NahG infectadas frente a las salvajes que a excepción de una sola planta no presentaron síntomas.

El ensayo fue realizado por duplicado para ambas especies, utilizando 20 réplicas biológicas por tratamiento (ver Anexo C), y se seleccionaron dos tiempos pos infección representativos (7 y 12 d.p.i). Además, en ambos casos, para poder mostrar lo observado, se graficó una de los experimentos independientes representativo, aunque la estadística corresponde a un análisis de MLGM que contemplo todas las repeticiones realizados.

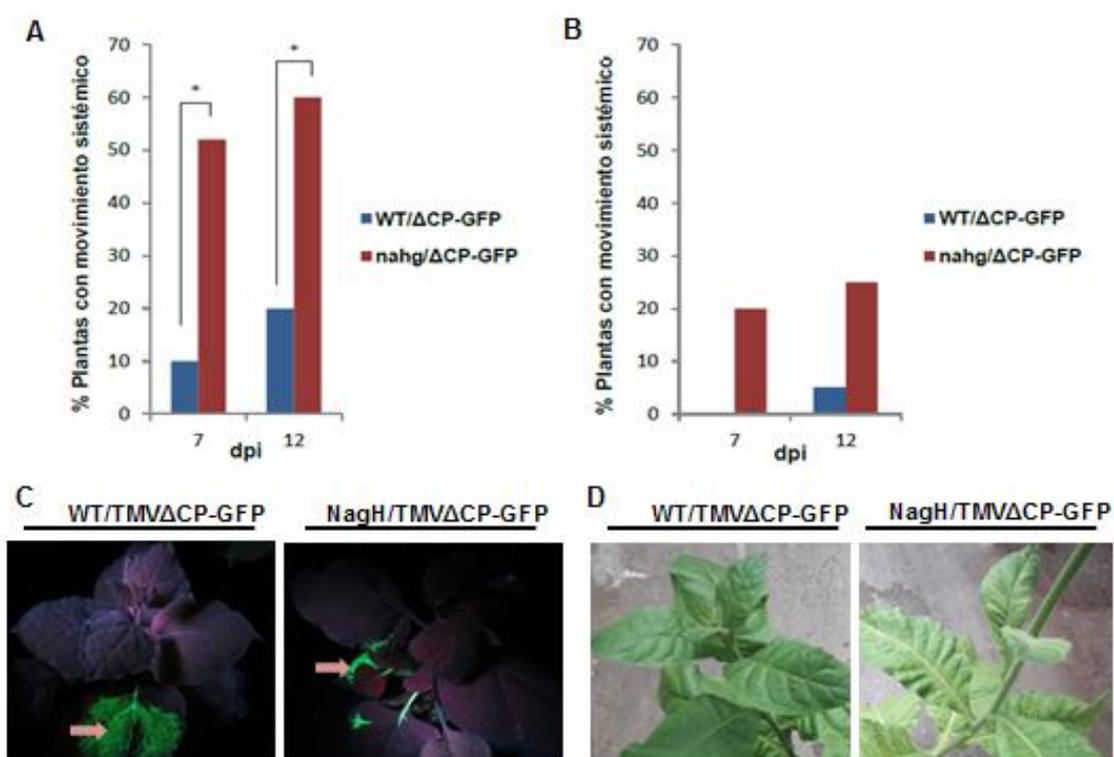


Figura 4.14: Las plantas NahG de *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana tabacum* son más susceptibles que las salvajes a la infección con el virus TMV Δ CP. Se utilizó la construcción del virus TMV Δ CP-GFP en plantas que son transgénicas, incapaces de acumular SA. Se procedió a la evaluación del movimiento sistémico, para ello, se infectaron plantas NahG con el virus TMV Δ CP. Se evaluó el movimiento sistémico con luz UV a diferentes tiempos después de la infección, luego se seleccionaron dos para ilustrar: 7 y 12 d.p.i. En ambos paneles, se escogió un experimento representativo y el análisis estadístico utilizado, Modelos Lineales Generalizados Mixtos, se realizó contemplando todas las repeticiones. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, valores de $p \leq 0.1$ A) Ensayo realizado en *N. benthamiana*. B) Ensayo realizado en *N. tabacum*. C) Plantas *N. benthamiana* WT (salvaje) infectadas (panel izquierdo) y Plantas *N. benthamiana* NahG infectadas (panel derecho) A 7 d.p.i. Se observa movimiento sistémico en la planta del panel derecho. Con una flecha rosa se indica la hoja infectada. D) Plantas *N. tabacum* WT (salvaje) infectadas (panel izquierdo) y Plantas *N. tabacum* Nahg infectadas (panel derecho) a 16 d.p.i. Se observan síntomas en la planta del panel derecho.

Una aclaración importante a destacar es que en la mayoría de los experimentos realizados en *N. tabacum*, al cabo de 20 d.p.i, algunas plantas que mostraban ausencia de GFP en tejidos sistémicos, presentaban síntomas característicos de TMV

(retrasadamente). Este fenómeno no fue observado en *N. benthamiana*. Una posible hipótesis es que dado que la defensa es más restrictiva en tabaco, la construcción evidenciaba más fuertemente su inestabilidad y en muchos casos perdía el gen reportero y de esa forma podía realizar efectivamente la infección. Teniendo en cuenta entonces que los ensayos de movimiento resultaron ser más claros en *N. benthamiana*, se decidió continuar solo con este sistema.

Como se mencionó en el Capítulo I, *EDS1* es un gen implicado en la acumulación del SA. Para continuar caracterizando la participación de esta vía hormonal en el movimiento sistémico del virus, se prosiguió al estudio de dicho gen. Para ello, se siguió el procedimiento detallado en 4.4.2 y en este caso la secuencia ortóloga correspondiente al gen en *N. benthamiana* fue obtenida, al igual que la de *npr1*, del trabajo de Liu et al., 2002 (Tabla 4.2).

Para realizar el ensayo, se agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* con *hp-NbEDS1* y 7 días post infiltración, se trató con el virus TMV Δ CP-GFP. Como se mencionó anteriormente, para verificar el silenciamiento obtenido mediante la horquilla expresada, se tomaron muestras de tejido sistémico de plantas agroinfiltradas a 7 d.p.i. Es decir, estas plantas no fueron infectadas con el virus TMV Δ CP-GFP. Se realizó la extracción de ARN, y RT-qPCR. Las secuencias blanco de la PCR seleccionadas corresponden a una región distinta al fragmento seleccionado para inducir el silenciamiento. Como se puede observar en la Figura 4.15 A los niveles de la expresión del gen *NbEDS1* resultaron significativamente menores en plantas tratadas con la *hp-NbEDS1* respecto a las tratadas con el control negativo (*hp-GUS*) confirmando el *knock-down* para *EDS1*.

Una vez realizada la infección, se observaron las plantas utilizando la lámpara UV a 7 y 12 dpi y se cuantificó el porcentaje con presencia de GFP en sus tejidos sistémicos. Los resultados obtenidos fueron similares a los observados con las plantas NahG. A 12 d.p.i se logró visualizar movimiento sistémico en las plantas donde *NbEDS1* fue silenciado respecto a las plantas control, tratadas con la horquilla de *gus* (Figura 4.15 B) siendo estos resultados estadísticamente significativos. A 7 d.p.i si bien se observó la misma tendencia, los resultados no fueron significativos (Figura 4.15 B). El ensayo fue realizado por triplicado, utilizando 20 plantas para cada tratamiento en dos de los experimentos y 12 en el otro. En la Figura 4.15 C se observa un detalle del movimiento sistémico en una planta tratada con *hp-Nbeds1* y posteriormente infectada. Estos resultados nuevamente sugieren que el movimiento sistémico del virus TMV parecería depender del efecto de inhibición de la defensa producida por la CP en las vías dependientes de SA.

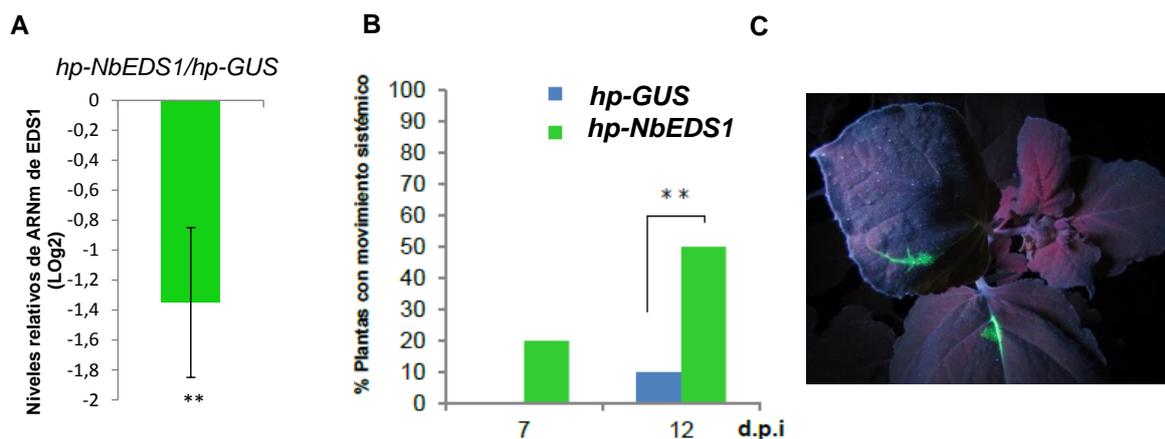


Figura 4.15: Rol de *NbEDS1* en el movimiento sistémico del virus TMVΔCP-GFP. A) Niveles relativos de mRNA de *NbEDS1* en plantas tratadas con *hp-NbEDS1* respecto otras tratadas con *hp-GUS*, determinados por RT-qPCR en plantas de *N. benthamiana*. Se muestran las medias \pm SE de cinco repeticiones biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, **valores de $p \leq 0.05$. B) Porcentaje de plantas con movimiento sistémico en función del tiempo de infección en plantas previamente tratadas con *hp-NbEDS1* respecto a otras tratadas con *hp-GUS*. El análisis estadístico (Modelos Lineales Generalizados Mixtos) se realizó sobre todos los ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, * valores de $p \leq 0.1$, ** valores de $p \leq 0.05$. C) Plantas de *N. benthamiana* tratadas con *hp-NbEDS1* y posteriormente infectadas con el virus TMVΔCP-GFP a 12 d.p.i.

4.5.5 Rol del RAR1 en el movimiento sistémico de TMV

Para poder evaluar la especificidad de la vía de SA involucrada en el movimiento viral, se realizó nuevamente el ensayo, pero esta vez se escogió un gen de defensa contra patógenos biotróficos cuyo rol es independiente de la vía de SA-NPR1: *NbRAR1*. Este gen regula negativamente la defensa de tipo PTI (Shang et al., 2006), forma complejos con las chaperonas HSP90 y SGT1, dando inicio a una cascada de señalización presente en diversas respuestas tempranas de la inmunidad (Kadota et al., 2010; Seo et al., 2008). Para la construcción de la horquilla se utilizó la secuencia descrita en el trabajo de Liu et al., 2002. Análogamente a los ensayos descritos anteriormente se trataron plantas con *hp-NbRAR1* y 7 días post agroinfiltración se verificó que la expresión de dicho gen se encontraba disminuida respecto a las plantas del tratamiento *hp-GUS* (Figura 4.16). En dos repeticiones independientes de este experimento, se llegó a la misma conclusión: no fue posible reestablecer el movimiento sistémico en las plantas donde previamente había sido silenciado *NbRAR1* (Figura 4.16 B). En cada uno de los ensayos se utilizaron 10 y 12 réplicas biológicas para cada tratamiento. Estos resultados sugieren que la inhibición de la defensa producida por CP requerida para el movimiento sistémico es un proceso específico de las vías dependientes de SA.

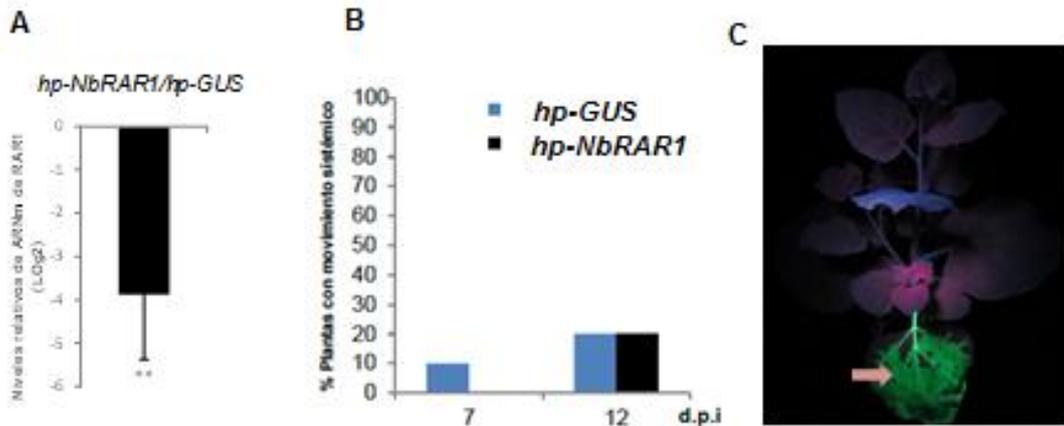


Figura 4.16: Rol de *NbRAR1* en el movimiento sistémico del virus TMVΔCP-GFP. A) Niveles relativos de mRNA de *Nbrar1* en plantas tratadas con *hp-NbRAR1* respecto a otras tratadas con *hp-GUS*, determinados por RT-qPCR en plantas de *N. benthamiana*. Se muestran las medias \pm SE de cinco repeticiones biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, **valores de $p \leq 0.05$. B) Porcentaje de plantas con movimiento sistémico en función del tiempo de infección en plantas previamente tratadas con *hp-NbRAR1* respecto a otras tratadas con *hp-GUS*. El análisis estadístico (Modelos Lineales Generalizados Mixtos) se realizó sobre todos los ensayos independientes (ver Anexo C). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, * valores de $p \leq 0.1$, ** valores de $p \leq 0.05$. C) Plantas de *N. benthamiana* tratadas con *hp-NbRAR1* y posteriormente infectadas con el virus TMVΔCP-GFP a 16 d.p.i. La flecha rosa indica la hoja donde se realizó la infección

4.5.6 Rol de CNI1 y ERF6 en el movimiento sistémico de TMV

Para poder ampliar más el conocimiento acerca de los mecanismos involucrados en el movimiento sistémico del virus, se decidió estudiar que sucedía en el caso de silenciar *CNI1*, un gen que se encuentra río abajo del factor de transcripción TGA10. Como ya fue mencionado, *cni1* posee motivo de unión a dicho factor de transcripción, es decir que su transcripción estaría siendo regulada vía TGA10. Por otro lado, también se seleccionó *ERF6*, un gen que no posee el motivo de unión a TGA10. Además, en el capítulo 3 se observó que ambos factores de transcripción seleccionados tenían alterada su expresión génica durante la infección viral con TMVcg. En el caso de *CNI1*, la búsqueda bibliográfica de *Orthodb* arrojó el ortólogo correspondiente en *N. tabacum*: un *CNI1-like*. La homología entre ambas secuencias es del 43%. Este gen es una E3 ligasa involucrada en el balance de carbono/nitrógeno y defensa (Bolton, 2009; Maekawa et al., 2012; Massad et al., 2012). Por otro lado, *ERF6-like* fue reportado en *N. tabacum* como posible ortólogo de *ERF6* también utilizando la base de datos *Orthodb* y la homología de secuencia obtenida fue del 42 %. Este factor de transcripción posee un dominio AP2 y se encuentra involucrado en respuestas frente a etileno, ROS y defensa (Moffat et al., 2012; Wang & Fobert, 2013; Xu et al., 2016).

Al igual que en los ensayos anteriores, se agroinfiltraron plantas con los distintos tratamientos: *hp-CNI1-like*, *hp-ERF6-like* y *hp-GUS* y 7 días post infiltración se realizó

la infección con TMV Δ CP-GFP. Se trató un conjunto de plantas con las horquillas sin infectar con el fin de evaluar los niveles de expresión de cada uno de los genes y confirmar el *knock-down* de los mismos (Figura 4.17 A y B). En la Figura 4.17 se puede observar que aquellas plantas infectadas con el virus TMV Δ CP-GFP donde se silenció el gen *CNI1-like*, el virus fue capaz de propagarse hacia los tejidos sistémicos a pesar de la ausencia de la CP (Figura 4.17 C). Por el contrario, en el caso de las plantas agroinfiltradas con *hp-ERF6-like* no fue posible restablecer el movimiento sistémico viral (Figura 4.17 D). Se realizaron en ambos casos cuatro ensayos independientes conformados por distintas réplicas biológicas (ver Anexo C). En la Figura 4.17 E, se observa el movimiento sistémico en una planta *N.benthamiana* tratada previamente con *hp-CNI1-like* (panel izquierdo), y la ausencia del mismo para el tratamiento *hp-ERF6-like* (panel derecho). A partir de estos resultados, es posible sugerir que los genes regulados por los factores TGA estarían involucrados en la modulación de la defensa producida por CP requerida para el movimiento sistémico.

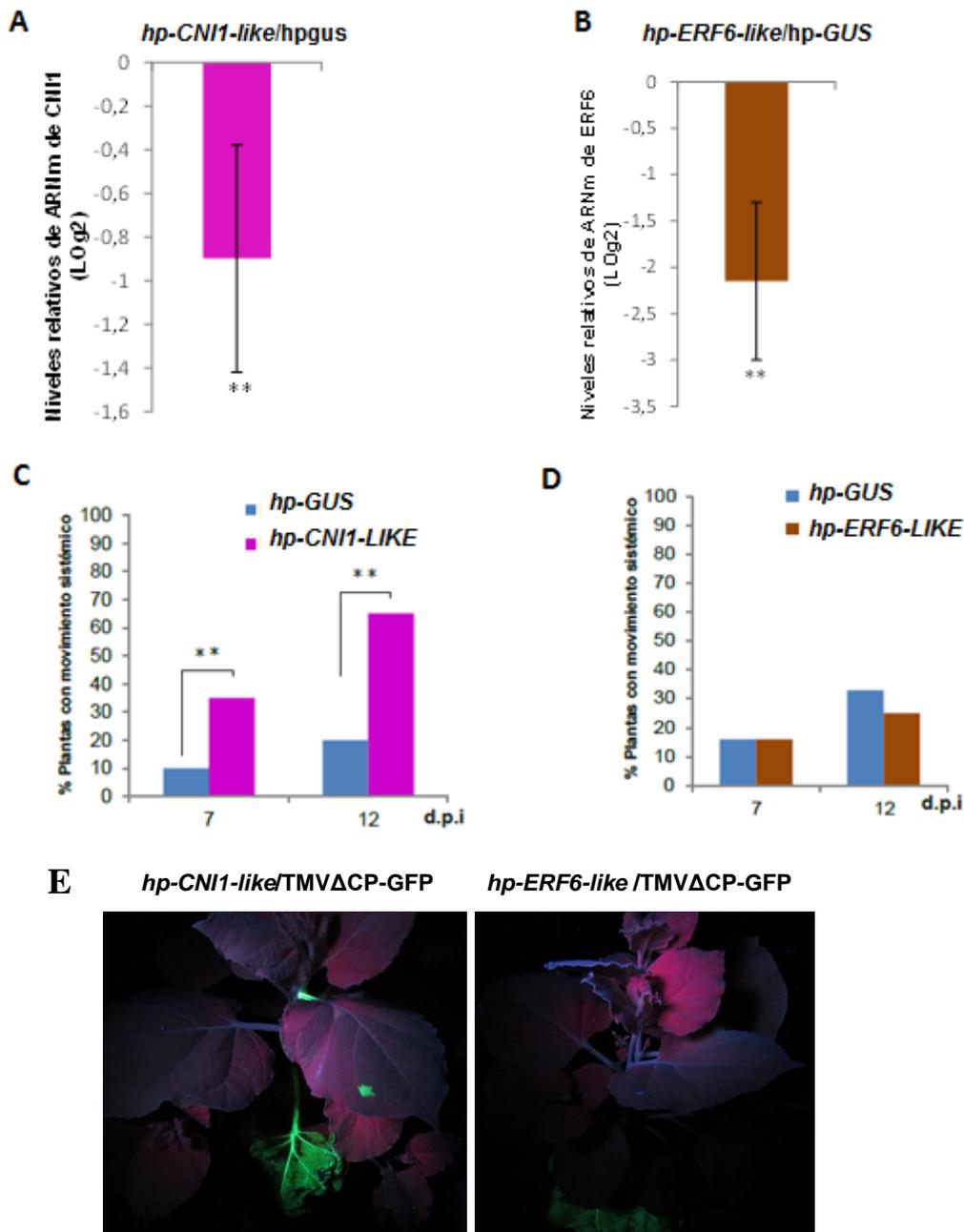


Figura 4.17: Rol de *CNI1-like* y *ERF6-like* en el movimiento sistémico del virus TMVΔCP-GFP. A) Niveles relativos de mRNA de *CNI1-like* en plantas tratadas con *hp-CNI1-like* respecto otras tratadas con *hp-GUS*, determinados por RT-qPCR en plantas de *N. benthamiana*. Se muestran las medias \pm SE de cinco repeticiones biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, **valores de $p \leq 0.05$. B) Niveles relativos de mRNA de *ERF6-like* en plantas tratadas con *hp-ERF6-like* respecto otras tratadas con *hp-GUS*, determinados por RT-qPCR en plantas de *N. benthamiana*. Se muestran las medias \pm SE de cinco repeticiones biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, **valores de $p \leq 0.05$. C) Porcentaje de plantas con movimiento sistémico en función del tiempo de infección en plantas previamente tratadas con *hp-CNI1-like* respecto a otras tratadas con *hp-GUS*. El análisis estadístico MLGM se realizó sobre todos los ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, * valores de $p \leq 0.1$, ** valores de $p \leq 0.05$. D) Porcentaje de plantas con movimiento sistémico en función del tiempo de infección en plantas previamente tratadas con *hp-ERF6-like* respecto a otras tratadas con *hp-GUS*. El análisis estadístico MLGM se realizó sobre todos los ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, * valores de $p \leq 0.1$, ** valores de $p \leq 0.05$. F) Plantas de *N. benthamiana* infectadas con el virus TMVΔCP-GFP a 7

d.p.i. Panel izquierdo tratamiento *hp-CNI1-like*, panel derecho *hp-ERF6-like* La flecha rosa indica la hoja donde se realizó la infección.

4.5.7 Rol de WRKY3 en el movimiento sistémico de TMV

Como ya fue sugerido anteriormente, NPR1 también activa directamente la expresión de varios factores de transcripción WRKY con actividades activadoras y supresoras (Wang et al., 2006). *WRKY33* fue uno de los genes utilizados para armar la red (Figura 3.6) y su ortólogo descrito en *N. benthamiana*, es el gen *NbWRKY8*. Además, este factor de transcripción posee motivos de unión tanto para otros factores WRKY como para los TGA. Se ha reportado que el silenciamiento de *NbWRKY8* disminuye la expresión de genes de defensa y aumenta la susceptibilidad de enfermedades con distintos patógenos (Katou et al., 2011). Por todo esto se decidió estudiar su rol en el movimiento sistémico del virus. Una vez realizado el ensayo de *knock-down* de este gen vía agroinfiltración con el *hp-NbWRKY8*, se midieron sus niveles de expresión génica con el fin de verificar la efectividad del *knock-down* al igual que en los experimentos previos (Figura 4.18 A)

Se infectaron las plantas con TMV Δ CP-GFP previamente tratadas o bien con *hp-Gus* o bien con *hp-NbWRKY8* y se visualizó el movimiento viral a través de la fluorescencia de GFP en luz UV. Nuevamente, se muestran dos tiempos representativos (7 y 18 d.p.i) en los cuales se observa un restablecimiento del movimiento viral, es decir, ocurrió el movimiento sistémico en las plantas donde los niveles de acumulación del mRNA de *NbWRKY8* eran menores que en las plantas control (Figura 4.18 B). Es importante marcar que este resultado se observa más claramente al tiempo más tardío.

Este resultado sugiere que el factor de transcripción *NbWRKY8* podría estar involucrado en el movimiento sistémico, ya sea directamente a través de la acción de NPR1 o en respuesta a la activación de los TGA (debido a que posee sitios de unión para estos factores de transcripción).

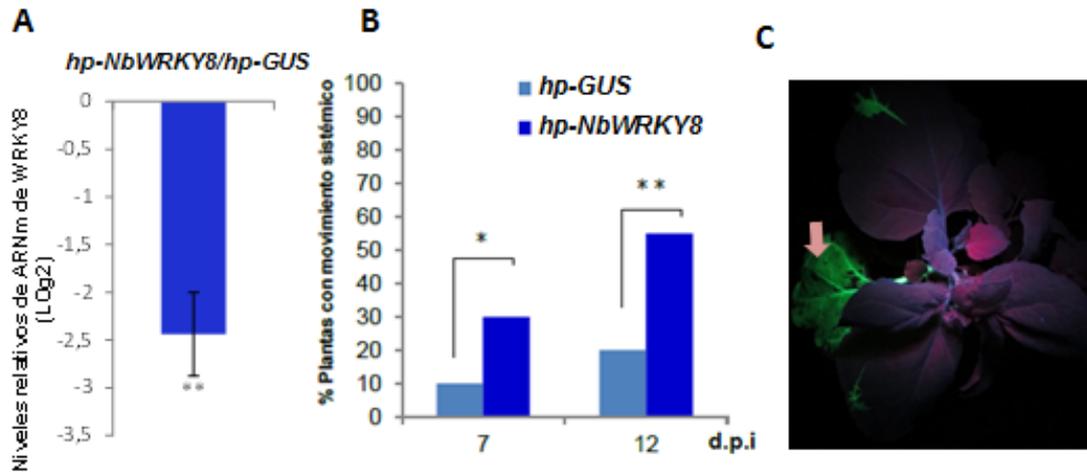


Figura 4.18: Rol de *NbWRKY8* en el movimiento sistémico del virus TMVΔCP-GFP. A) Niveles relativos de mRNA de *NbRAR1* en plantas tratadas con *hp-NbWRKY8* respecto a otras tratadas con *hp-gus*, determinados por RT-qPCR en plantas de *N. benthamiana*. Se muestran las medias \pm SE de cinco repeticiones biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, **valores de $p \leq 0.05$. B) Porcentaje de plantas con movimiento sistémico en función del tiempo de infección en plantas previamente tratadas con *hp-NbWRKY8* respecto a otras tratadas con *hp-GUS*. El análisis estadístico (Modelos Lineales Generalizados Mixtos) se realizó sobre todos los ensayos independientes. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, * valores de $p \leq 0.1$, ** valores de $p \leq 0.05$. C) Plantas de *N. benthamiana* tratadas con *hp-NbWRKY8* e infectadas con el virus TMVΔCP-GFP a 7 d.p.i. La flecha rosa indica la hoja donde se realizó la infección

4.6 La expresión de la CP de CLRV no es capaz de complementar en trans el movimiento sistémico del virus TMV defectivo de la CP

Para completar el estudio del rol de CP en el movimiento sistémico, se propuso analizar si la CP de otro virus era capaz de cumplir dicha función. Para ello, se utilizó un vector que permite la expresión de la proteína CP de CLRV. Al igual que los ensayos detallados en 4.2, como control negativo se agroinfiltró la bacteria GV3101 sin plásmido. Se prosiguió entonces a agroinfiltrar hojas de 40 plantas *N. benthamiana* con la CP de CLRV utilizando GV3101 como control y 72 horas después se infectó una hoja no tratada con TMVΔCP-GFP (Figura 4.19 A). Se realizó luego el seguimiento de la infección a través de la detección de GFP en tejidos sistémicos mediante la lámpara UV, como se ha descrito en los ensayos anteriores. Este experimento fue realizado por duplicado, dando como resultado que la CP de CLRV no es capaz de reestablecer el movimiento sistémico del TMV defectivo de CP, ya sea porque no es capaz de modular negativamente el sistema inmune de la planta conllevando al movimiento sistémico, como si lo hace la CP de TMV (Figura 4.5 y 4.19 B), es decir, no es capaz de complementar el movimiento sistémico del virus ni en *cis*, ni en *trans*. En el gráfico se pueden apreciar los tiempos 7, 8, 10 y 14 d.p.i. El análisis estadístico se realizó mediante MLGM.

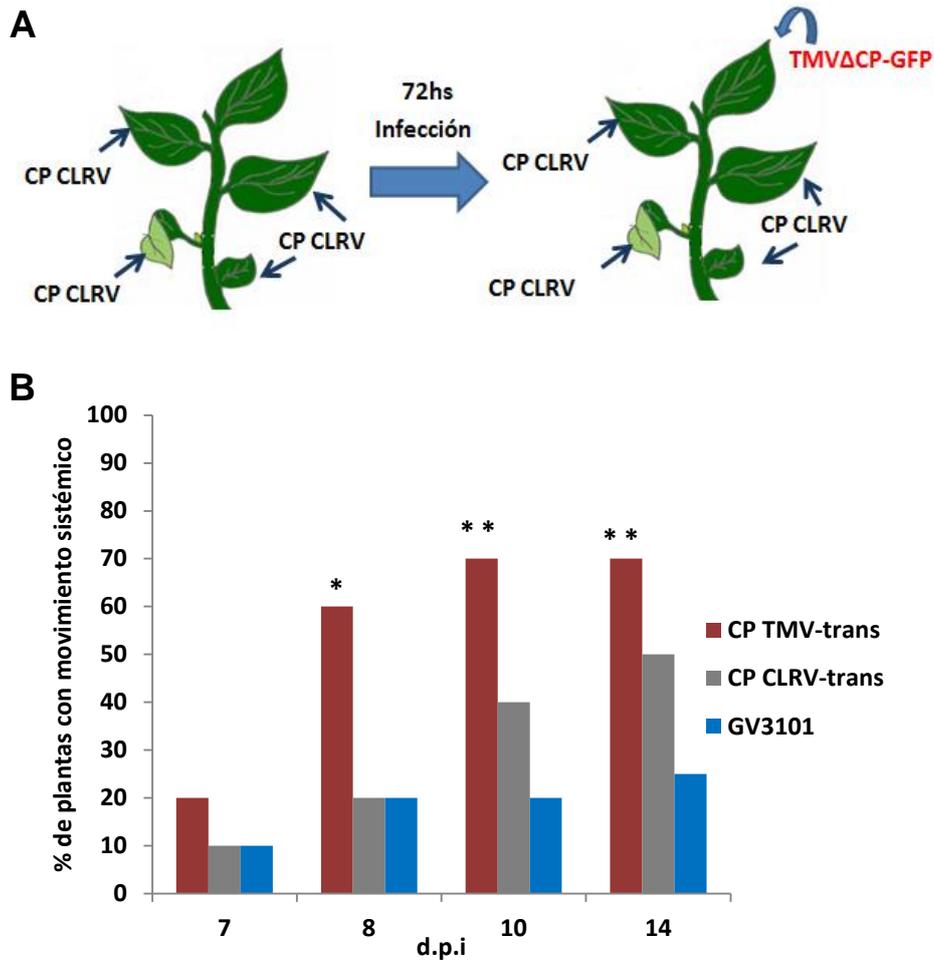


Figura 4.19: La CP de CLRV no es capaz de complementar el movimiento sistémico del virus de TMV de la CP. A) Esquema realizado de agroinfiltración del vector que permite la expresión de CP de CLRV y posterior infección con el virus TMV Δ CP-GFP. B) Porcentaje de plantas *N.benthamiana* que presentan TMV Δ CP-GFP en los tejidos sistémicos en función de los días post infección. El gráfico representa uno de los dos ensayos independientes realizados conformados por 20 réplicas biológicas por tratamiento; la estadística (utilizando MLGM) fue realizada a partir de ambos. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, *valores de $p \leq 0.1$, ** valores de $p \leq 0.05$.

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

Las fitohormonas son reguladores esenciales en las respuestas fisiológicas de las plantas, incluidas aquellas involucradas en la defensa frente a patógenos. Recientes evidencias han puesto luz sobre la contribución de diferentes factores de crecimiento a la inmunidad de las plantas, y de los mecanismos mediante los cuales cooperan para activar dichas respuestas, en un proceso altamente coordinado de *crosstalk* hormonal (Alazem & Lin, 2015; Shigenaga et al., 2017). Durante la infección existen una gran variedad de moléculas derivadas tanto de las plantas como de los patógenos que interfieren o modulan este *crosstalk*. Todos estos cambios traen consecuencias en el metabolismo general de la planta, que a su vez, podrían ser una de las causas de la sintomatología generada por la infección. El empleo de plantas transgénicas ha validado este concepto donde la expresión de proteínas virales individuales tienen efecto en la producción de síntomas (G. Conti et al., 2012; Pallas & Garcia, 2011). Se ha observado que la proteína P2 del virus del enanismo del arroz (Rice dwarf virus, RDV) interactúa con una enzima implicada en la biosíntesis de GA, lo que ocasiona una menor acumulación de los niveles de GA1 y produce el síntoma de enanismo en las plantas de arroz (Zhu et al., 2005). Por otro lado, la vía del SA también es interferida por proteínas virales. Tal es el caso de la proteína supresora del silenciamiento P6 del virus del mosaico del coliflor (CaMV) la cual intercepta la vía del SA interactuando con el factor NPR1 en el citosol (Alazem & Lin, 2015; Laird et al., 2013; Love et al., 2012). En nuestro laboratorio ha sido estudiado el efecto de la expresión de las proteínas MP y CP en el hospedante (Conti et al., 2013; Rodríguez et al., 2014). Teniendo en cuenta que ninguna posee actividad supresora del silenciamiento y que ambas generan numerosas alteraciones morfológicas (Bazzini et al., 2007), es posible inferir que son factores importantes en la generación de los síntomas de las infecciones (Bazzini et al., 2011; Shimura & Pantaleo, 2011). De hecho, previamente al desarrollo de esta tesis, en nuestro laboratorio se ha reportado que la proteína CgCP es capaz de estabilizar a las proteínas DELLAs, lo que conlleva alterar la expresión de genes dependientes de esta proteína y como resultado, reduce el crecimiento de *A. thaliana* (Rodríguez et al 2014).

Con el objetivo de comprender globalmente los cambios que existen en la regulación de la defensa de la planta, se decidió comenzar identificando la red génica interviniente en la modulación del sistema inmune mediada por la expresión de la CP de TMV. Para ello se utilizó un análisis del impacto global que produce la presencia de

CgCP sobre el transcriptoma de *A.thaliana*, en donde se observa alteración de la expresión de genes que están implicados en una amplia variedad de procesos (Tesis Rodríguez 2015; Rodríguez et al 2014). Si bien la confección de redes de coexpresión no implica que en todos los casos exista una relación funcional de los elementos que la integran (Aoki et al., 2007), son herramientas muy útiles que permiten integrar información por ejemplo de ensayos de microarreglos. De hecho, se ha demostrado que los genes asociados a vías metabólicas comunes tienden a mostrar patrones de coexpresión (Ihmels et al., 2004; Kharchenko et al., 2005).

Para obtener la red interviniente se utilizó en segunda instancia el programa *GeneMania* con un desarrollo con una visión más global que el previamente utilizado *ATTED-II* (Warde-Farley et al., 2010). Este software permite no solo integrar datos de coexpresión, sino que también considera información acerca de interacciones proteína-proteína y rutas de señalización y colocalización. De hecho, en un trabajo publicado por (Chen et al., 2011), se realiza una comparación entre los programas *GeneMania*, *ATTED II* y *AreNet*, y si bien los autores concluyen que existe complementación de los tres, afirman que *GeneMania* exhibió la mejor predicción en su sistema. Para la construcción actual de la red génica, los genes de los cuales se partió fueron *CBP60G*, *WRKY70*, *WRKY33*, *WRKY25*, *MPK3*, *AT1G72920*, que se encontraban caracterizados como modulados negativamente por la expresión de la CP (Rodríguez et al, 2014). Respecto a sus funciones, el gen *CBP60G* está involucrado en el mecanismos de defensa frente a *P. syringae* (Wang et al., 2009) y codifica para una proteína de unión a calmodulina, la cual posee un rol en la acumulación de SA (Zhang et al., 2010). Recientemente, se ha demostrado que dos factores de transcripción de la familia TGA, TGA1 y TGA4, regulan positivamente la biosíntesis de SA a través de la expresión de los genes *SARD1* y *CBP60G* (Sun et al., 2018). De hecho, plantas mutantes *tga-1* y *tga-4* infectadas con patógenos bacterianos presentaron menores niveles de *SARD1*, *CBP60G* y SA que las salvajes. Por otro lado, el gen *MPK3* codifica para una MAPK cuya expresión se activa durante las infecciones producidas por patógenos (Li et al., 2012) mientras que *WRKY33* y *WRKY25* codifican para dos factores de transcripción involucrados en respuesta a la hormona SA (Lippok et al., 2007; Zheng et al., 2006). En el caso de *WRKY70*, su proteína correspondiente se encuentra involucrada en la modulación positiva de la vía de SA y negativa de JA (Jing et al., 2006). Además esta regulación sería dependiente de NPR1, sugiriendo que puede estar bajo algún factor de transcripción de tipo TGA (Wang et al., 2006).

La red obtenida compuesta por 120 genes totales, permitió la búsqueda de elementos regulatorios comunes que a partir de los sitios de regulación permitan inferir los

factores regulatorios conjuntos. Para ello, se tuvo en cuenta que muchas de las respuestas de defensa dadas por la vía de SA requieren la participación de NPR1 (Cao et al., 1994). De hecho, más del 98% de la expresión de genes de defensa en respuesta a SA depende de NPR1 (Wang et al., 2006; Blanco et al., 2009). Además, dado que este gen maestro actúa a través de factores de transcripción, tales como TGA y WRKY (Johnson et al., 2003; Lu, 2009; Niggeweg et al., 2000; Wang et al., 2006a; Zhang et al., 1999; Zhou et al., 2000) se buscaron específicamente estos motivos en las regiones regulatorias de los genes. El programa utilizado fue *Athamap* (Hehl et al., 2016).

La red obtenida por medio del análisis bioinformático fue validada empleando la técnica de RT-qPCR. Tanto en las distintas condiciones de expresión de la CP como en plantas infectadas, se obtuvieron patrones similares a los originales en todos los genes validados de la red: *ERF6*, *PAPP2C*, *CNI1* y *AT1G05575*, *XLG2*, *MKS1* y *PCRK1*. Para los dos primeros, *Athamap* predijo sitios de unión para WRKY; para el caso de *CNI1* y *At1g05575*, TGA y, para el resto de los genes escogidos, predijo sitios para ambos motivos, una alta proporción de la red tenía este último arreglo de sitios regulatorios y solo unos pocos no tenían ninguno de los dos. Es por lo tanto de esperar que esta red estuviese controlada en gran medida por estos factores de transcripción. Respecto a las funciones reportadas para estos genes, *ERF6* ha sido involucrado en la respuesta frente al hongo *B. cinerea* (Moffat et al., 2012). El gen *PAPP2C* codifica para una proteína con actividad fosfatasa que es capaz de interactuar con la proteína RPW8.2 que confiere resistencia frente al hongo *Golovinomyces spp* (Wang et al., 2012). *CNI1* está descrita como una ubiquitin-ligasa que funciona en respuesta a concentraciones carbono/nitrógeno para transiciones de fase de crecimiento (Sato et al., 2009). Adicionalmente, esta proteína también se la ha involucrado en defensa (Sato et al 2009; Maekawa et al 2012). Por otra parte, *XLG2* es una proteína de unión a GTP, dependiente de Ca^{2+} , cuya expresión se incrementa luego de la infección con *P. syringae* y modula la susceptibilidad frente a infección con este patógeno (Zhu et al., 2009). *MKS1* y *PCRK1* codifican para proteínas quinasas las cuales tienen un rol altamente conservado en la activación de cascadas de señalización que regulan las respuestas a patógenos. En el genoma de *Arabidopsis* existen 20 genes que codifican para MPKs, siendo las MPK3, MPK4 y MPK6 las más caracterizadas. Estas MPKs son activadas por estrés abiótico, patógenos y estrés oxidativo (Pitzschke et al., 2009). Por ejemplo, MPK4 actúa como un regulador negativo de la vía de SA y positivo de la vía de JA/ET (Petersen et al., 2010). Por otra parte, *MKS1* es un sustrato de MPK4 e interactúa con el factor de transcripción WRKY33 (Qiu et al., 2008). Respecto a *PCRK1* ha sido involucrado en respuestas PTI

frente al ataque bacteriano. De hecho, plantas mutantes *pcrk1* presentaron menor deposición de calosa respecto a las salvajes al ser infectadas con *P.syringae* (Sreekanta et al., 2015).

Ya sea por expresión transgénica de la CgCP o bien en tiempos tardíos de la infección viral, este análisis mostró que esta proteína viral modula negativamente la expresión de un conjunto de genes que tienen a los motivos TGA y WRKY en sus regiones regulatorias. Este patrón se alteró en plantas *npr1* y *tga10* mutantes, validando la participación de ambos durante la infección viral. A partir de los datos obtenidos en esta tesis se propuso un modelo de manera tal de poder integrar los resultados obtenidos con la bibliografía existente (Figura 5.1). En tiempos tempranos de la infección, el virus ingresa y se desencadena un mecanismo bien caracterizado que involucra respuesta mediada por SA (Alazem & Lin, 2015; Nicaise, 2014), que provoca el desacople de tetrámeros de NPR1 seguido de translocación de dicha proteína al núcleo (Delaney et al., 1995). Allí, ante la presencia de SA, se produce un aumento de los genes de defensa (Conti et al 2012). En tiempos tardíos, donde existe mayor acumulación de CP, se produce la estabilización de las proteínas DELLA (Rodríguez et al., 2014). Se ha reportado además que GAI es capaz de interactuar con TGA10 (Marín de la Rosa et al., 2014) y quizás pueda hacerlo con los otros factores de la misma familia. Este factor de transcripción ha estado siempre relacionado a procesos de desarrollo (Murmu et al., 2010); aunque recientemente se lo ha vinculado en respuestas a ROS y defensa bacteriana (Noshi et al 2016). De manera tal que podría suceder que esta interacción GAI-TGA10 generara la imposibilidad de activación de los genes de defensa por parte de NPR1-TGA. Es decir, esto produciría una disminución en la expresión de los genes de respuesta a SA (resultados descritos en esta tesis). El mecanismo de acción de SA con NPR1 es bastante complejo, además de NPR1, existen otras proteínas parálogas a dicho factor de transcripción, NPR3/4. Los tres mostraron la capacidad de unirse a SA *in vitro* por lo que ha sido sugerida la función de receptores de dicha hormona (Ding et al., 2018; Fu et al., 2012; Manohar et al., 2015; Wu et al., 2012). Pero a diferencia de lo que ocurre con NPR1, se ha reportado que SA puede funcionar como inhibidor de NPR3 / NPR4 para liberar la represión de los genes de defensa por parte de estos factores. Existe entonces un balance TGA-NPR regulado por SA (Ding et al 2018). Es decir, que el aumento de los genes de defensa en tiempos tempranos podría estar dado no solo por la activación de NPR1, sino también la inhibición de la represión de NPR3/4. De hecho, estos autores describen que NPR4 regula negativamente la expresión de *CBP60G* y de *WRKY70*, a través de TGA2, TGA5 y TGA6. Considerando estos elementos, en las mutantes *npr1* a tiempos tempranos (5 d.p.i) vemos que *ERF6*, *CNII* y *ATLG05575* son parcialmente

dependientes de dicho factor de transcripción por lo que podrían también estar involucrados NPR3/4. En tiempos tardíos (12 dpi), para estas mutantes *npr1*, puede que el balance entre las NPR-TGA mediado por SA se modifique. El equilibrio podría alterarse debido a que exista más SA disponible para unirse a NPR3/4 y que las DELLA no sean capaces de inhibir a todos los TGA.

Respecto a la naturaleza química mediante la cual SA, NPR y TGAs realizan la activación transcripcional masiva de los genes aún se presentan muchos interrogantes. Recientemente, se ha reportado un posible mecanismo mediante el cual NPR1 es capaz de formar un complejo con las HAC (CBP/p300 de la familia de las histonas acetiltransferasas). Ambos serían reclutados en las histonas de los genes regulados por esta vía, a través de los factores TGA. De esta forma el complejo HAC-NPR1-TGA activaría genes PR a partir de la acetilación de sus histonas (Jin et al., 2018). La interferencia por parte de las DELLAs con TGA10, y posiblemente con otros factores TGA, también podría estar afectando al complejo HAC-NPR1-TGA y por lo tanto afectar aquellos genes regulados por mecanismos epigenéticos como los mencionados.

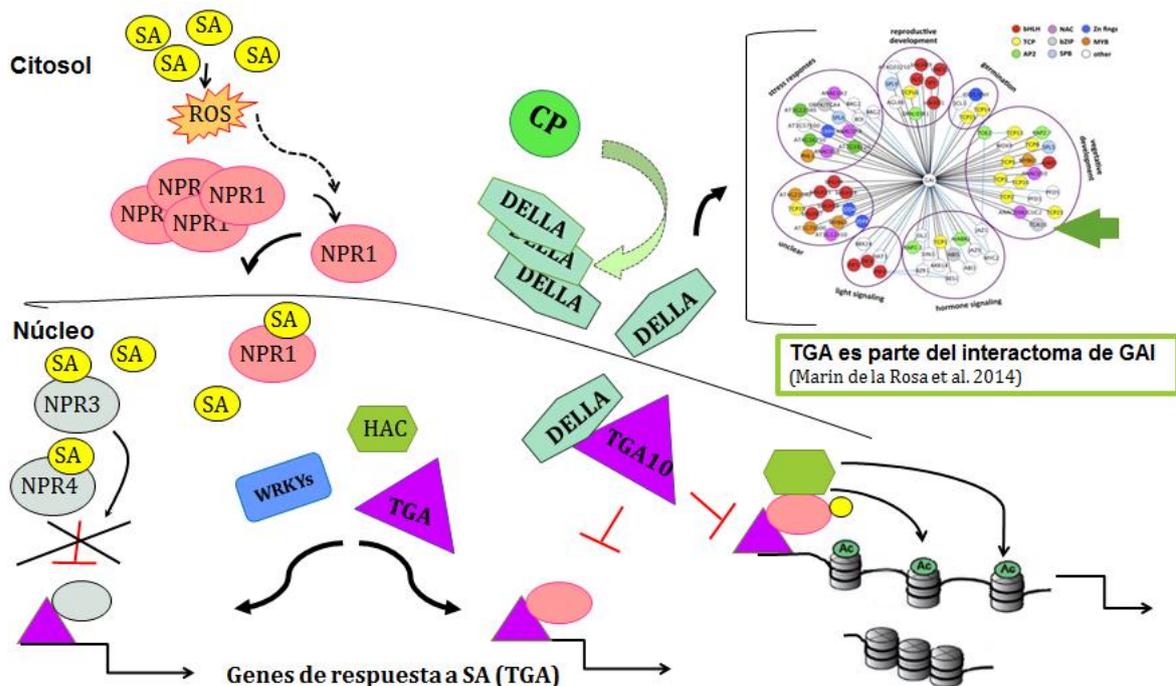


Figura 5.1: Modelo propuesto, adaptado de Pieterse *et al* (2009), Ding, et al. (2018), Jin et al (2018), que integra los resultados obtenidos del capítulo 3.

A pesar que se ha investigado ampliamente sobre los mecanismos que emplean los virus para el movimiento célula a célula, hay poco conocimiento acerca de los mecanismos moleculares mediante los cuales los virus acceden a la vasculatura y la vía de transporte por floema para el movimiento a larga distancia (Cowan et al., 2018). Teniendo en cuenta los hallazgos del laboratorio, datos bibliográficos y los resultados

del capítulo 3 de esta tesis, se prosiguió a estudiar si la modulación negativa mediada por la CP sobre la inmunidad tenía un rol en el movimiento del virus a los tejidos sistémicos. Para el ensayo funcional se utilizó un virus de TMV que no codifica para la CP, pero tiene una proteína MP y una REP que permite moverse entre las células y replicarse normalmente, respectivamente, en la hoja inicialmente infectada (Callaway et al., 2001). Este virus deficiente no puede trasladarse a los tejidos sistémicos. De todos modos, esta imposibilidad no está necesariamente dada por la incapacidad de la formación del virión (rol estructural de la CP). Como ya ha sido mencionado, existen dos hipótesis descriptas acerca del movimiento viral, por un lado, que se encuentre protegido por la proteína CP y por otro lado, formando complejos de ribonucleoproteína (RNP) (Hipper et al., 2013). En el caso de TMV no fue posible identificar partículas virales en el floema. De hecho, existen evidencias que son justamente complejos ribonucleoproteicos los que transportan por el floema el ARN genómico viral (Asurmendi et al., 2004; Kawakami et al., 2004). Adicionalmente, estos complejos pueden estar también asociados a proteínas endógenas del hospedante (Chen & Citovsky, 2003; Cheng et al., 2000; Heinlein, 2002; Hipper et al., 2013; Song et al., 2005). Es decir, en este tipo de sistema el ARN genómico viral puede estar protegido por proteínas virales o del hospedante o también asociado a membranas lipídicas (Wan et al., 2015).

Nuestros datos indican que tanto si se expresa la CP en *cis* como en *trans* (en tejidos distales diferentes al sitio de infección inicial) fue posible restablecer el movimiento sistémico del virus deficiente para dicha proteína. A pesar que los ensayos dieron resultados similares respecto a la presencia de virus en los tejidos distales, es importante aclarar que existieron diferencias. Al colocar la CP en *cis*, el movimiento del virus TMV Δ CP-GFP presentó características similares al TMV-GFP. Por ejemplo, en una infección con TMV las primeras células que se infectan en el tejido distal, en las hojas en desarrollo (Sumidero neto) son las que se encuentran asociadas con las venas mayores (clase I, II y III) (Cheng et al., 2000). Esta característica puede ser observado en las Figuras 4.2 A y 4.5 A. Sin embargo, al realizar el ensayo con la CP en *trans*, a pesar que también se restablecía el movimiento, el patrón de difusión del virus cambiaba. Evidentemente, no solo en algunos casos las células infectadas en el tejido distal se encontraban alejadas de la nervadura principal, sino que además las hojas alcanzadas eran aquellas con mayor desarrollo (más cercanas a la hoja infectada). Esto puede observarse al comparar el patrón de movimiento descrito por Cheng et al (2000) en la Figura 1.5 y la Figura 4.5 B. Adicionalmente, la acumulación viral visualizada era mayor en los ensayos en *cis* que en los en *trans* (Figura 4.5 A y Figura 4.5 B). Otra característica a resaltar fue que tanto para el virus salvaje como

para el tratamiento en *cis*, se apreciaban muchos focos de pequeño tamaño en los tejidos distales, mientras que en el caso del ensayo en *trans*, los focos eran aislados y de mayor tamaño (Figura 4.5 A y Figura 4.5 B). Dado que la acumulación de la proteína MP es dependiente de CP (Bendahmane et al., 2002; Asurmendi et al., 2004), es probable que dicha regulación se encuentre alterada ante la ausencia de CP. Por otro lado, en las infecciones con TMV Δ CP-GFP se observan tramos de las nervaduras de las hojas distales y del tallo con GFP, efecto no visualizado con el virus TMV-GFP. Este patrón alterado de visualización indicaría que el virus sin CP tendría una deficiencia para salir del floema hacia el mesofilo, por ello se acumularía suficiente cantidad como para ser visualizadas las nervaduras con GFP en contraste con el rápido pasaje del virus salvaje por estos tejidos que casi no acumula GFP suficiente para ser visualizado. En concordancia con estos resultados, varios autores han señalado que tanto el ingreso en la células acompañantes y tubos cribosos, así como la salida del floema constituyen pasos limitantes de la infección sistémica (Carrington et al., 1996; Heinlein, 2002; Vuorinen et al., 2011). Es importante destacar que además de las restricciones estructurales en la descarga del floema las respuestas transcripcionales del hospedante también modulan la carga y el movimiento sistémico viral (Collum et al., 2016; Chen et al., 2013). Debido a la estricta regulación del transporte del floema, los virus han evolucionado para modular dinámicamente los factores del hospedador a fin de obtener acceso a los tejidos sistémicos (Chen et al., 2013; Collum et al., 2016). De hecho, existen ejemplos donde la infección por TMV-Cg produce una disminución de la expresión de *AtWRKY8* y esto promueve la propagación del virus a los tejidos sistémicos (Chen et al., 2013). Adicionalmente, se ha visto que el virus TMV altera la expresión génica del floema y de esa manera facilita su carga a este tejido vegetal (Collum y Culver, 2017). Esta regulación está mediada por auxina, demostrando una vez más que durante las infecciones existe una interferencia en el *crosstalk* hormonal, donde más de un factor de crecimiento se encuentra afectado. Estos autores también han demostrado que la infección con TMV altera la acumulación de la expresión génica implicada en la SAR en plantas de *N. benthamiana* (Collum y Culver, 2017). En el caso de las infecciones realizadas en estas tesis con el virus TMV Δ CP-GFP, la resistencia que proporcionan las plantas podrían estar evitando o deteniendo el ingreso del virus a los tejidos sistémicos. Al modular negativamente la respuesta inmune de la planta, podría suceder que el virus sea capaz de ingresar al tejido sistémico de una forma menos eficiente, a través de venas que habitualmente no utiliza. Justamente la resistencia del hospedante estaría dada por un bloqueo en la entrada de TMV a los tejidos sumidero. Por ejemplo, niveles menores de la expresión del gen *PCRK1* observados en el capítulo 3, podrían ser

necesarios para impedir la deposición de calosa en el egreso del floema (Sreekanta et al., 2015). A su vez, esto podría estar causado por interacciones con los factores del hospedante que evitarían el ingreso del virus (Cheng et al., 2000). Es decir, si bien el virus TMV Δ CP-GFP es capaz de moverse sistémicamente al encontrarse modulada negativamente la defensa, este evento es menos eficiente y menos desregulado que cuando se infecta con el virus salvaje, lo cual evidencia que la CP posee además otros roles, tales como interacciones con proteínas del hospedante. Todos estos resultados indican que el movimiento a larga distancia es un proceso altamente regulado y explica la razón por la cual es un paso limitante para una infección exitosa (Vuourinen et al., 2011; Hipper et al., 2013).

Con el objetivo de profundizar el rol funcional de la proteína CP y teniendo en cuenta que CP estabiliza las proteínas DELLAs en plantas de *Arabidopsis*, el siguiente paso fue la validación de dicho resultado en el sistema de TMV U1 y *N.benthamiana*. En este caso, se utilizaron diferentes variantes en el esquema de agroinfiltración de la proteína GAI. Además, se realizó un tratamiento con el inhibidor de GA, PAC, de manera tal de lograr también la estabilización de las DELLAs por otro mecanismo. En todos los casos fue posible restablecer el movimiento sistémico del virus TMV Δ CP-GFP. Continuando con la caracterización fenotípica del tipo de movimiento, ya sea con la GAI en *cis* o en *trans*, el patrón observado para dicha dispersión viral fue similar al del experimento de la CP en *trans*. De hecho, a partir de estos ensayos en *trans* se pudo inferir otra vez que el requerimiento de la modulación negativa no está dado mayoritariamente en el ingreso del virus al floema desde el tejido inicialmente infectado, sino en el egreso desde el floema hacia los tejidos sumidero. Curiosamente, en algunos eventos aislados ocurría el movimiento hacia hojas que eran consideradas fuente y se encontraban por debajo de la hoja infectada, evidencia de desregulación del movimiento viral que sigue el flujo floemático normalmente. Estos datos permitirían suponer un desregulación en el control del flujo floemático permitiendo el ingreso de macromoléculas en tejidos exportadores (fuente) de las mismas. Una hipótesis alternativa es que la señal de la GAI agroinfiltrada podría ser transportada y luego registrada por el virus alterando el movimiento viral. Esto estaría apoyado en datos aportados por el trabajo de Xu y colaboradores, en donde se describe que el ARNm de *AtGAI* es capaz de transportarse por el floema (Xu et al., 2013). Este no es el único caso de macromoléculas capaces de moverse por el floema. Tal es el caso de KN1, un factor de transcripción, capaz de modificar el tamaño del poro de los plasmodesmos. A través de este evento, KN1 favorece su propia dispersión por la planta (Kim et al., 2005; Kim et al., 2018).

Otra alternativa es que adicionalmente a la modulación negativa de la defensa, GAI podría estar involucrada en algún tipo de proceso físico. Por ejemplo, GAI podría promover la permeabilidad de los poros para el ingreso del virus a las células del tejido sistémico o alterar la comunicación entre el floema externo e interno en las hojas sumidero. En efecto, recientemente ha sido reportado un nuevo rol de las DELLAs, diferente a la regulación de la expresión, en donde estarían involucradas en promover el tráfico de proteínas desde la vacuola hacia la membrana plasmática (Salanenka et al., 2018).

Con el fin de poder estudiar el mecanismo mediante el cual la CP modula negativamente la inmunidad, se decidió simular artificialmente su función para poder evaluar su rol. Dado que el sistema seleccionado era *N. benthamiana*-TMV, y ante la ausencia de mutantes disponibles, fue necesario buscar alguna estrategia que permitiese disminuir la expresión de los genes a estudiar. En primera instancia, se escogió VIGS por ser un sistema rápido y eficiente en *N. benthamiana* (posee valores de eficiencia del 90%, mientras que en otras especies de *Solanaceas* los valores no superan el 60 %) (Senthil Kumar et al, 2007). Esta técnica no pudo ser utilizada debido a que el solo hecho de realizar el tratamiento con los vectores derivados del virus TRV (sin agregar un fragmento de un gen endógeno de la planta) provocaba el movimiento sistémico de TMV Δ CP-GFP. Aquí es importante remarcar que en la interacción entre el sistema inmune de la planta y el patógeno existen diversos efectos que pueden inclinar el equilibrio hacia alguno de los dos. De hecho, existen distintos factores que pueden aumentar la virulencia conllevando efectos similares desarrollados por diferentes mecanismos. Entonces, como alternativa, para poder enfocarnos en el estudio específico del mecanismo regulado por la CP se escogió el uso de horquillas para generar silenciamiento transitorio (hp). Este vector produce ARN de doble cadena (ARN en horquilla) a partir de la secuencia de interés insertada, lo que induce el silenciamiento génico postranscripcional de una manera eficiente, algo menos potente que VIGS pero independiente de la utilización de vectores virales y sus consecuencias sobre el sistema inmune (Duwadi et al., 2015; Karimi et al., 2002; Wesley et al., 2001). Dado los resultados obtenidos en el capítulo 3, se decidió estudiar el rol del SA y sus elementos regulatorios en el movimiento sistémico. A partir de los tratamientos ya sea con *hp-NbNPR1* así como *hp-NtTGA10* previo a la infección con TMV Δ CP-GFP, se pudo concluir que ambos están involucrados en este proceso. Además el estudio con este virus en plantas NahG permitió vincular la infección sistémica con la acumulación de SA. Al utilizar *hp-NbEDS1* también fue posible complementar el movimiento del virus TMV Δ CP-GFP. Recientemente se ha relacionado al gen *EDS1*, junto con *PAD4*, en el mantenimiento de la expresión de genes relacionados a SA, reforzando así la

robustez del sistema inmunitario innato (Cui et al., 2017). Los resultados obtenidos vinculados a SA fueron a su vez consistentes con los reportados en fuentes bibliográficas. El trabajo de revisión de Hipper et al (2013) remarca el papel esencial de SA en la restricción de la infección sistémica de los virus. Por ejemplo, la defensa mediada con SA limita el movimiento sistémico del virus *Plum Pox* en plantas de tabaco (Alamillo et al., 2006); mientras que restringe el transporte a larga distancia del virus de la mancha anular del tomate también en plantas de tabaco (Jovel et al., 2011). El movimiento sistémico del virus del mosaico del pepino se retrasa en las plantas de *Arabidopsis* tratadas con SA (Mayers et al., 2005; Naylor et al., 1998). Para poder describir aún más el mecanismo, se prosiguió a estudiar cuan específica era la vía y los genes intervinientes en ella. Para ello se evaluó el rol del gen *NbRAR1*, gen involucrado en inmunidad, aunque no relacionado con la vía del SA que no fue encontrado en la red modulada por CP. Los resultados permitieron determinar que este gen no se encuentra involucrado en el movimiento sistémico del virus defectivo. Probablemente, esto esté relacionado a que su rol ha sido reportado en respuestas tempranas de las plantas. Por ejemplo, induciendo HR en las células donde se inicia la infección, de manera tal de contener el avance del patógeno (Muskett et al., 2002). Se le ha adjudicado además el rol de cochaperona, junto con SGT1, de la chaperona HSP90 (Hahn, 2005; Madaoui et al., 2008). Este complejo es capaz de mediar la degradación de proteínas virales o del hospedante vía proteosoma 26S (Liu et al., 2002; Shirasu, 2009). Particularmente, durante la infección del tabaco por TMV, tanto SGT1 como RAR1 interactúan con CSN3 y CSN8 para mediar la resistencia del gen N contra TMV; el silenciamiento de CSN3 o CSN8 compromete la resistencia del gen N (Liu et al., 2002b; Shirasu, 2009). En el caso testeado por nosotros las plantas de *N. benthamiana* no poseen el gen N permitiendo una interacción compatible al contrario de la interacción incompatible producida en las plantas con el gen N.

Continuando con la caracterización del movimiento viral, se escogieron dos genes presentes en la red confeccionada en el capítulo 3. Se seleccionó uno que tuviese motivo de unión a TGA, *CNI1*, y otro que no, *ERF6*. Dado que no existía una publicación que asociara un posible ortólogo de estos genes en *Nicotiana*, se hicieron alineamientos de secuencias así como también se verificaron los resultados con el programa *Orthodb*. Esta base de datos era más apropiada ya que no solo tiene en cuenta información acerca de la identidad de secuencia, sino que también considera relaciones filogenéticas en su análisis (Kriventseva et al., 2019). Luego de realizar el ensayo funcional, se pudo observar que *NbCNI1-LIKE* fue capaz de restablecer el movimiento sistémico, mientras que *NbERF6-LIKE* no pudo hacerlo. No obstante, los niveles de expresión de *NbERF6* muestran una disminución ante la presencia de CP y

a tiempos tardíos de la infección. Además, en las plantas mutantes para *npr1* esta regulación se alteraba. Es decir que probablemente, es un gen implicado en la infección viral, pero se sugiere que no estaría involucrado en el movimiento sistémico. Respecto a CNI1-LIKE está descrita como una E3 ligasa involucrada en el balance de carbono/nitrógeno. Estas enzimas son las encargadas de transferir de manera específica la ubiquitina al sustrato a degradar. Se ha visto que dicha función en CNI1-LIKE no solo está vinculada a la regulación del crecimiento sino también a la defensa (Bolton, 2009; Sato et al., 2009; Massad et al., 2012; Maekawa et al., 2012). Continuando con la hipótesis de una posible interacción GAI-TGA que podría estar modulando negativamente la inmunidad del hospedante, sería esperable la participación de genes relacionados al sistema de ubiquitinación y degradación de proteínas.

Finalmente, para completar el modelo, se decidió analizar que sucedía con el movimiento sistémico de TMV Δ CP-GFP en plantas que tuvieran niveles menores de algún factor de transcripción de la familia WRKY: *WRKY33*. Este gen es capaz de responder a la hormona SA (Zheng et al., 2006) y además en nuestro grupo se ha demostrado que la CgCP regula negativamente sus niveles (Rodríguez et al 2014). Adicionalmente, fue uno de los seleccionados para armar la red del capítulo 3 y posee motivos de unión a otros factores WRKYs y TGAs. El ortólogo de *AtWRKY33* en *Nicotiana*, se denomina *WRKY8*, fue descrito como un gen involucrado en la defensa frente a los patógenos (Ishihama et al., 2011). A pesar que los resultados obtenidos permiten inferir que *NbWRKY8* se encuentra involucrado en el movimiento a larga distancia, el porcentaje alcanzado de restablecimiento del movimiento no es tan alto como en el caso de *NbNPR1* y *NtTGA10*. Esto estaría sugiriendo una participación menos esencial en el proceso estudiado.

Es importante destacar que los experimentos relacionados al movimiento fueron realizados en *N. benthamiana*. Pero en algunos casos, también se hicieron en *N. tabacum*. Para esta planta los resultados obtenidos no fueron significativos estadísticamente, ni alcanzaron los altos niveles de *N. benthamiana*, aunque se pudo observar una tendencia clara a la complementación del movimiento en acuerdo a lo observado en *N. benthamiana*. En consonancia con esto se observó que estos resultados fueron contundentes si se tiene en cuenta que prácticamente no hubo dispersión viral en los controles negativos (Figuras 4.2, 4.9, 4.13 y 4.14), es decir, la defensa en *N. tabacum* es más restrictiva, por lo tanto es más difícil para el virus sobrepasar a las vías de defensa y quizás deberíamos reducir la expresión de varios genes al mismo tiempo para lograr los mismos resultados de *N. benthamiana*. Se debe considerar también que los niveles de silenciamiento alcanzado mediante horquilla en

las plantas de tabaco son menores con respecto a lo obtenido en las plantas de *N. benthamiana* (Quadrana et al., 2011). Además de la modulación negativa, existen trabajos que demuestran la interacción de la CP con proteínas del huésped. Por ejemplo la proteína IP-L de *N. tabacum* es capaz de interactuar con CP del virus ToMV y facilitar el movimiento sistémico (Song et al., 2005). Lo que nos permite suponer, como era de esperarse que la interacción TMV-tabaco es muy compleja con muchos puntos de contacto sinérgicos.

A partir de los resultados obtenidos en el capítulo 4 fue posible completar el modelo de la Figura 5.1 considerando la infección de forma global (Figura 5.2). En nuestro trabajo, Conti et al (2017), se propuso que las proporciones de los componentes virales influyen en el equilibrio entre las diferentes fuerzas (respuestas de defensa y contra-defensa). En el caso de etapas más tardías de la infección, se propone que la modulación negativa de la CP (la proteína más abundante en esta fase), permite que el virus llegue a los tejidos sistémicos. Este proceso está mediado por la estabilización de las DELLA. Esta regulación estaría dada por el egreso del virus desde el floema hacia las células del mesofilo en el tejido sumidero. Una de las evidencias que permiten sugerir esta última premisa se encuentra la acumulación de GFP (correspondiente al virus) observada en tramos de las nervaduras así como también en el tallo. Es decir que la limitación de la defensa mediada por el sistema inmune no pareciera estar en la carga al floema. Quizás en esta instancia el proceso esté facilitado por la interacción de proteínas del hospedante con el complejo ribonucleoproteico.

Se propone entonces una interferencia específica en la vía de señalización de SA (Qi et al., 2018) mediada por la proteína CP, donde además estarían involucradas las proteínas DELLA. En este proceso participan principalmente los factores de transcripción NPR1 y TGA, que a su vez modulan una gran cantidad de genes que también podrían tener inferencia. En conjunto, todas estas evidencias permiten sugerir que la interferencia en el *crosstalk* hormonal podría ser la causa de la aparición de síntomas como efecto secundario de la infección (Conti et al 2017). Por otro lado, en este trabajo se confirmó que la CP posee un rol no canónico durante la infección viral relacionado a la eficiencia en la propagación del virus TMV por la planta. Adicionalmente, estos resultados indican que el floema y sus tejidos asociados contribuyen a las respuestas de defensa del hospedante y sugieren que la modulación negativa del sistema inmune debe ocurrir principalmente en los tejidos sumidero, es decir, donde se produce la descarga del floema.

Una limitación esperada al modificar el *crosstalk* hormonal en plantas es el alto nivel de interconectividad de las redes hormonales (Figura 1.11). Debido a que estas redes

controlan varias respuestas fisiológicas, las alteraciones de las vías hormonales pueden llevar a efectos pleiotrópicos no deseados. Por lo tanto, la misma plasticidad que permite a las plantas responder a estímulos variables es a la vez, una restricción al alterar los factores involucrados en la modulación hormonal con el objetivo de mejorar la respuesta frente a distintos estreses. Sin embargo, los avances recientes en biología sintética pueden permitir el desarrollo de redes de interferencia hormonales sintéticas con propiedades ajustables que pueden ayudar a eludir los efectos pleiotrópicos (Shigenaga et al., 2017). Dado que muchos efectores suelen tener a NPR1 como blanco y éste en un factor central en el antagonismo SA-JA (Ding et al., 2018; Schellenberg et al., 2010), resulta ser un candidato interesante. De hecho, Molla et al., (2016) demuestran que la sobreexpresión de NPR1 a través de un promotor específico de tejido confiere resistencia a patógenos sin grandes efectos negativos observables en el crecimiento de las plantas de arroz. Como posible perspectiva para mejoramiento de resistencia frente a la infección con *Tobamovirus* proponemos la sobreexpresión de los TGAs, específicamente TGA10, en plantas de *Nicotiana*. Este efecto podría lograrse a través de un promotor específico que permitiera la expresión en tejidos sumidero y/o u el uso de un promotor que responda a alguna señal de patógenos en los tejidos distales únicamente. Los TGAs serían los candidatos que generarían aún menores efectos pleiotrópicos que NPR1, ya que este último es una molécula ampliamente compartida en el *crosstalk* hormonal.

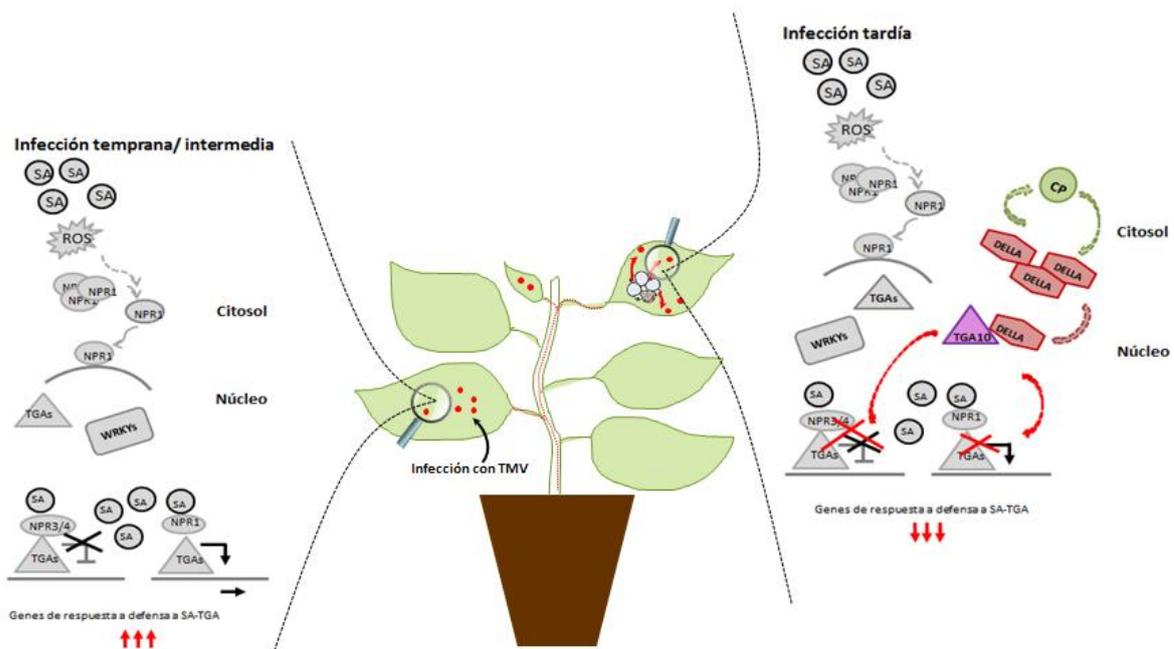


Figura 5.2: Modelo propuesto, adaptado de Pieterse et al, 2009, Conti et al 2016, Ding, et al., 2018, que integra los resultados obtenidos del capítulo 3 y 4.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta Tesis permiten concluir que:

- El conjunto de genes cuya expresión es disminuida por la proteína CP está involucrado en vías de defensa e integra una red génica coordinada, en donde los factores de transcripción NPR1 y TGA son participantes centrales.
- La atenuación producida por la proteína CP sobre la inmunidad mediada por SA promueve la susceptibilidad del hospedante frente a la infección de TMV.
- La modulación negativa de la inmunidad del hospedante mediada por la proteína CP es requerida para el movimiento sistémico del virus TMV.
- La estabilización de las proteínas DELLAs promueve el movimiento sistémico del virus TMV.
- La modulación negativa de la inmunidad del hospedante produciría su acción sobre el movimiento sistémico en el egreso del virus desde el floema hacia los tejidos del mesófilo.

BIBLIOGRAFÍA

- Achard, P., Baghour, M., Chapple, A., Hedden, P., Van Der Straeten, D., Genschik, P., ... Harberd, N. P. (2007). The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(15), 6484–6489. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610717104>
- Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., ... Genschik, P. (2009). Gibberellin Signaling Controls Cell Proliferation Rate in Arabidopsis. *Current Biology*, 19(14), 1188–1193. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.05.059>
- Achard, P., Renou, J.-P., Berthomé, R., Harberd, N. P., & Genschik, P. (2008). Plant DELLAs Restrain Growth and Promote Survival of Adversity by Reducing the Levels of Reactive Oxygen Species. *Current Biology*, 18(9), 656–660. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.04.034>
- Adie, B. A. T., Perez-Perez, J., Perez-Perez, M. M., Godoy, M., Sanchez-Serrano, J.-J., Schmelz, E. A., & Solano, R. (2007). ABA Is an Essential Signal for Plant Resistance to Pathogens Affecting JA Biosynthesis and the Activation of Defenses in Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE*, 19(5), 1665–1681. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048041>
- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. Elsevier Academic Press.
- Agrofoglio, Y. C. (2017). *Caracterización molecular del virus asociado a la enfermedad azul atípica del algodón y estudio del quiebre de la resistencia*.
- Alamillo, J. M., Monger, W., Sola, I., García, B., Perrin, Y., Bestagno, M., ... García, J. A. (2006). Use of virus vectors for the expression in plants of active full-length and single chain anti-coronavirus antibodies. *Biotechnology Journal*, 1(10), 1103–1111. <https://doi.org/10.1002/biot.200600143>
- Alamillo, J. M., Saéñz, P., & García, J. A. (2006). Salicylic acid-mediated and RNA-silencing defense mechanisms cooperate in the restriction of systemic spread of plum pox virus in tobacco. *The Plant Journal*, 48(2), 217–227. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02861.x>
- Alazem, M., & Lin, N.-S. (2015). Roles of plant hormones in the regulation of host-virus interactions. *Molecular Plant Pathology*, 16(5), 529–540. <https://doi.org/10.1111/mpp.12204>
- Alazem, M., & Lin, N.-S. (2017). Antiviral Roles of Abscisic Acid in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1760. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01760>
- Aoki, K., Ogata, Y., & Shibata, D. (2007). Approaches for Extracting Practical Information from Gene Co-expression Networks in Plant Biology. *Plant and Cell Physiology*, 48(3), 381–390. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm013>
- Aranda, M., & Maule, A. (1998). Virus-Induced Host Gene Shutoff in Animals and Plants. *Virology*, 243(2), 261–267. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9032>
- ASSELBERGH, B., ACHUO, A. E., HÖFTE, M., & VAN GIJSEGEM, F. (2007). Abscisic acid deficiency leads to rapid activation of tomato defence responses upon infection with *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular Plant Pathology*, 0(0), 070925014357003–???. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00437.x>
- Asurmendi, S., Berg, R. H., Koo, J. C., & Beachy, R. N. (2004). Coat protein regulates formation of replication complexes during tobacco mosaic virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(5), 1415–1420. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307778101>
- Asurmendi, S., Berg, R. H., Smith, T. J., Bendahmane, M., & Beachy, R. N. (2007). Aggregation

- of TMV CP plays a role in CP functions and in coat-protein-mediated resistance. *Virology*, 366(1), 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.03.014>
- Baebler, Š., Stare, K., Kovač, M., Blejec, A., Prezelj, N., Stare, T., ... Gruden, K. (2011). Dynamics of Responses in Compatible Potato - Potato virus Y Interaction Are Modulated by Salicylic Acid. *PLoS ONE*, 6(12), e29009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029009>
- Bailey, T. L. (2008). Discovering Sequence Motifs. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 452, pp. 231–251). https://doi.org/10.1007/978-1-60327-159-2_12
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., ... Noble, W. S. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, 37(Web Server), W202–W208. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp335>
- Bari, R., & Jones, J. D. G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69(4), 473–488. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9435-0>
- Barrios Barón, M. P., Agrofoglio, Y. C., Delfosse, V. C., Nahirñak, V., Gonzalez de Urreta, M., Almasia, N. I., ... Distéfano, A. J. (2017). First Complete Genome Sequence of Potato leafroll virus from Argentina. *Genome Announcements*, 5(30). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00628-17>
- Bassel, G. W., Mullen, R. T., & Bewley, J. D. (2008). *procera* is a putative DELLA mutant in tomato (*Solanum lycopersicum*): effects on the seed and vegetative plant. *Journal of Experimental Botany*, 59(3), 585–593. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm354>
- Bates, D., Kliegl, R., Vasishth, S., & Baayen, R. H. (n.d.). *Parsimonious Mixed Models*. Retrieved from <https://arxiv.org/pdf/1506.04967.pdf>
- Bazzini, A. A., Hopp, H. E., Beachy, R. N., & Asurmendi, S. (2007). Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(29), 12157–12162. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705114104>
- Bazzini, A. A., Manacorda, C. A., Tohge, T., Conti, G., Rodriguez, M. C., Nunes-Nesi, A., ... Asurmendi, S. (2011). Metabolic and miRNA Profiling of TMV Infected Plants Reveals Biphasic Temporal Changes. *PLoS ONE*, 6(12), e28466. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028466>
- Beachy, R. N., & Heinlein, M. (2000). Role of P30 in replication and spread of TMV. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 1(7), 540–544. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11208141>
- Bendahmane, M., Chen, I., Asurmendi, S., Bazzini, A. A., Szecsi, J., & Beachy, R. N. (2007). Coat protein-mediated resistance to TMV infection of *Nicotiana tabacum* involves multiple modes of interference by coat protein. *Virology*, 366(1), 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.03.052>
- Bendahmane, M., Fitchen, J. H., Zhang, G., & Beachy, R. N. (1997). Studies of coat protein-mediated resistance to tobacco mosaic tobamovirus: correlation between assembly of mutant coat proteins and resistance. *Journal of Virology*, 71(10), 7942–7950. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9311885>
- Blanco, F., Salinas, P., Cecchini, N. M., Jordana, X., Van Hummelen, P., Alvarez, M. E., & Holuigue, L. (2009). Early genomic responses to salicylic acid in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 70(1–2), 79–102. <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9458-1>

- Block, A., Toruño, T. Y., Elowsky, C. G., Zhang, C., Steinbrenner, J., Beynon, J., & Alfano, J. R. (2014). The *Pseudomonas syringae* type III effector HopD1 suppresses effector-triggered immunity, localizes to the endoplasmic reticulum, and targets the Arabidopsis transcription factor NTL9. *New Phytologist*, 201(4), 1358–1370. <https://doi.org/10.1111/nph.12626>
- Bol, J. F. (2008). Role of Capsid Proteins (pp. 21–31). https://doi.org/10.1007/978-1-59745-102-4_2
- Boller, T., & He, S. Y. (2009). Innate Immunity in Plants: An Arms Race Between Pattern Recognition Receptors in Plants and Effectors in Microbial Pathogens. *Science*, 324(5928), 742–744. <https://doi.org/10.1126/science.1171647>
- Bolouri Moghaddam, M. R., & Van den Ende, W. (2013). Sugars, the clock and transition to flowering. *Frontiers in Plant Science*, 4, 22. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00022>
- Bolton, M. D. (2009). Primary Metabolism and Plant Defense—Fuel for the Fire. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(5), 487–497. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-5-0487>
- Bonacic Kresic, I; Ojeda, AD; Gómez, D. (2006). Primera contribución al conocimiento de la enfermedad azul del algodónero en Argentinae. *Bonacic Kresic*.
- Boyes, D. C., Zayed, A. M., Ascenzi, R., McCaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R., & Görlach, J. (2001). Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *The Plant Cell*, 13(7), 1499–1510. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11449047>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Broekaert, W. F., Delauré, S. L., De Bolle, M. F. C., & Cammue, B. P. A. (2006). The Role of Ethylene in Host-Pathogen Interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 44(1), 393–416. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143440>
- Bulow, L., Engelmann, S., Schindler, M., & Hehl, R. (2009). AthaMap, integrating transcriptional and post-transcriptional data. *Nucleic Acids Research*, 37(Database), D983–D986. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn709>
- Bustin, S. A. (2010). Why the need for qPCR publication guidelines?—The case for MIQE. *Methods*, 50(4), 217–226. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.12.006>
- Callaway, A., Giesman-Cookmeyer, D., Gillock, E. T., Sit, T. L., & Lommel, S. A. (2001). The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annu Rev Phytopathol*, 39, 419–+. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.39.1.419>
- Cao, H., Bowling, S. A., Gordon, A. S., & Dong, X. (1994). Characterization of an Arabidopsis Mutant That Is Nonresponsive to Inducers of Systemic Acquired Resistance. *THE PLANT CELL ONLINE*, 6(11), 1583–1592. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.11.1583>
- Caplan, J. L., Mamillapalli, P., Burch-Smith, T. M., Czymbek, K., & Dinesh-Kumar, S. P. (2008). Chloroplastic Protein NRIP1 Mediates Innate Immune Receptor Recognition of a Viral Effector. *Cell*, 132(3), 449–462. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.031>
- Carrington, J. C., Kasschau, K. D., Mahajan, S. K., & Schaad, M. C. (1996). Cell-to-Cell and Long-Distance Transport of Viruses in Plants. *The Plant Cell*, 8(10), 1669–1681. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1669>
- Cauquil, J. (n.d.). Etudes sur une maladie d'origine virale du cotonnier: la maladie bleue. *Coton et Fibres Tropicales*, 1977.

- Chen, H., Chen, J., Li, M., Chang, M., Xu, K., Shang, Z., ... Fu, Z. Q. (2017). A Bacterial Type III Effector Targets the Master Regulator of Salicylic Acid Signaling, NPR1, to Subvert Plant Immunity. *Cell Host & Microbe*, 22(6), 777–788.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.10.019>
- Chen, M.-H., & Citovsky, V. (2003). Systemic movement of a tobamovirus requires host cell pectin methylesterase. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 35(3), 386–392. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12887589>
- Chen, Y., Yan, X., & Chen, S. (2011). Bioinformatic analysis of molecular network of glucosinolate biosynthesis. *Computational Biology and Chemistry*, 35(1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2010.12.002>
- Cheng, N. H., Su, C. L., Carter, S. A., & Nelson, R. S. (2000). Vascular invasion routes and systemic accumulation patterns of tobacco mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Journal*, 23(3), 349–362. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00788.x>
- Cheng, W.-H., Chiang, M.-H., Hwang, S.-G., & Lin, P.-C. (2009). Antagonism between abscisic acid and ethylene in *Arabidopsis* acts in parallel with the reciprocal regulation of their metabolism and signaling pathways. *Plant Molecular Biology*, 71(1–2), 61–80. <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9509-7>
- Chi, Y., Yang, Y., Zhou, Y., Zhou, J., Fan, B., Yu, J.-Q., & Chen, Z. (2013). Protein–Protein Interactions in the Regulation of WRKY Transcription Factors. *Molecular Plant*, 6(2), 287–300. <https://doi.org/10.1093/mp/sst026>
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B. J. (2006). Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell*, 124(4), 803–814. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.008>
- Choi, J., Huh, S. U., Kojima, M., Sakakibara, H., Paek, K.-H., & Hwang, I. (2010). The Cytokinin-Activated Transcription Factor ARR2 Promotes Plant Immunity via TGA3/NPR1-Dependent Salicylic Acid Signaling in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, 19(2), 284–295. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2010.07.011>
- Clare, D. K., & Orlova, E. V. (2010). 4.6Å Cryo-EM reconstruction of tobacco mosaic virus from images recorded at 300keV on a 4kx4k CCD camera. *Journal of Structural Biology*, 171(3), 303–308. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.06.011>
- Collum, T. D., & Culver, J. N. (2017). Tobacco mosaic virus infection disproportionately impacts phloem associated translatomes in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana benthamiana*. *Virology*, 510, 76–89. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.07.002>
- Collum, T. D., Padmanabhan, M. S., Hsieh, Y.-C., & Culver, J. N. (2016). Tobacco mosaic virus-directed reprogramming of auxin/indole acetic acid protein transcriptional responses enhances virus phloem loading. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(19), E2740–E2749. <https://doi.org/10.1073/pnas.1524390113>
- Conti, G. (2013). Estudio de las bases moleculares de la interacción virus- planta, relación entre genes de defensa, ARNs pequeños y sintomatología, 55–57.
- Conti, G., Rodriguez, M. C., Manacorda, C. A., & Asurmendi, S. (2012). Transgenic Expression of *Tobacco mosaic virus* Capsid and Movement Proteins Modulate Plant Basal Defense and Biotic Stress Responses in *Nicotiana tabacum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(10), 1370–1384. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-12-0075-R>
- Conti, G., Rodriguez, M. C., Venturuzzi, A. L., & Asurmendi, S. (2017). Modulation of host plant immunity by Tobamovirus proteins. *Annals of Botany*. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw216>
- Conti, G., Zavallo, D., Venturuzzi, A. L., Rodriguez, M. C., Crespi, M., & Asurmendi, S. (2017). TMV induces RNA decay pathways to modulate gene silencing and disease symptoms. *The Plant Journal*, 89(1), 73–84. <https://doi.org/10.1111/tj.13323>

- Cowan, G. H., Roberts, A. G., Jones, S., Kumar, P., Kalyandurg, P. B., Gil, J. F., ... Torrance, L. (2018). Potato Mop-Top Virus Co-opts the Stress Sensor HIP26 for Long-Distance Movement. *Plant Physiology*, 176(3), 2052–2070. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01698>
- Cui, H., Gobbato, E., Kracher, B., Qiu, J., Bautor, J., & Parker, J. E. (2017a). A core function of EDS1 with PAD4 is to protect the salicylic acid defense sector in Arabidopsis immunity. *New Phytologist*, 213(4), 1802–1817. <https://doi.org/10.1111/nph.14302>
- Cui, H., Gobbato, E., Kracher, B., Qiu, J., Bautor, J., & Parker, J. E. (2017b). A core function of EDS1 with PAD4 is to protect the salicylic acid defense sector in Arabidopsis immunity. *New Phytologist*, 213(4), 1802–1817. <https://doi.org/10.1111/nph.14302>
- Culver, J. N. (2002). T OBACCO M OSAIC V IRUS A SSEMBLY AND D ISASSEMBLY: Determinants in Pathogenicity and Resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 40(1), 287–308. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120301.102400>
- Dawson, W. O. (1992). Tobamovirus-plant interactions. *Virology*, 186(2), 359–367. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1733093>
- Dawson and G. L. Grantham. (1988). Modifications of the Tobacco Mosaic Virus Coat Protein Gene Affecting Replication, Movement, and Symptomatology. *Molecular Plant Pathology*.
- Dawson, W. O., Bar-Joseph, M., Garnsey, S. M., & Moreno, P. (2015). *Citrus Tristeza Virus*: Making an Ally from an Enemy. *Annual Review of Phytopathology*, 53(1), 137–155. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120012>
- De Vleeschauwer, D., Seifi, H. S., Filipe, O., Haecck, A., Huu, S. N., Demeestere, K., & Höfte, M. (2016). The DELLA Protein SLR1 Integrates and Amplifies Salicylic Acid- and Jasmonic Acid-Dependent Innate Immunity in Rice. *Plant Physiology*, 170(3), 1831–1847. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01515>
- Delaney, T. P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., ... Ryals, J. (1994). A Central Role of Salicylic Acid in Plant Disease Resistance. *Science*, 266(5188), 1247–1250. <https://doi.org/10.1126/science.266.5188.1247>
- Dempsey, D. A., & Klessig, D. F. (2017). How does the multifaceted plant hormone salicylic acid combat disease in plants and are similar mechanisms utilized in humans? *BMC Biology*, 15(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0364-8>
- Dempsey, D. A., Shah, J., & Klessig, D. F. (1999). Salicylic Acid and Disease Resistance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18(4), 547–575. <https://doi.org/10.1080/07352689991309397>
- Denancé, N., Sánchez-Vallet, A., Goffner, D., & Molina, A. (2013). Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Frontiers in Plant Science*, 4, 155. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00155>
- Di Rienzo, J.; Casanoves, F.; Gonzalez, L.; Tablada, E.; Díaz M.; Robledo, C.; Balzarini, M. (2001). *Estadística para las Ciencias Agropecuarias*. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/283569519_InfoStat_Version_Beta
- Dill, A., Jung, H. S., & Sun, T. P. (2001). The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24), 14162–14167. <https://doi.org/10.1073/pnas.251534098>
- Ding, X. S., Liu, J., Cheng, N.-H., Folimonov, A., Hou, Y.-M., Bao, Y., ... Nelson, R. S. (2004). The Tobacco mosaic virus 126-kDa Protein Associated with Virus Replication and Movement Suppresses RNA Silencing. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(6), 583–592. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.6.583>

- Ding, Y., Sun, T., Ao, K., Peng, Y., Zhang, Y., Li, X., & Zhang, Y. (2018). Opposite Roles of Salicylic Acid Receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in Transcriptional Regulation of Plant Immunity. *Cell*, *173*(6), 1454–1467. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.044>
- Dlabalová, L. (2013). *In planta* production of TMV (tobacco mosaic virus) nanoparticles of specific length.
- Dong, X., Hong, Z., Chatterjee, J., Kim, S., & Verma, D. P. S. (2008). Expression of callose synthase genes and its connection with Npr1 signaling pathway during pathogen infection. *Planta*, *229*(1), 87–98. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0812-3>
- Dubois, M., Skirycz, A., Claeys, H., Maleux, K., Dhondt, S., De Bodt, S., ... Inze, D. (2013). ETHYLENE RESPONSE FACTOR6 Acts as a Central Regulator of Leaf Growth under Water-Limiting Conditions in Arabidopsis. *PLANT PHYSIOLOGY*, *162*(1), 319–332. <https://doi.org/10.1104/pp.113.216341>
- Durrant, W. E., & Dong, X. (2004). SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE. *Annual Review of Phytopathology*, *42*(1), 185–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>
- Duwadi, K., Chen, L., Menassa, R., & Dhaubhadel, S. (2015). Identification, Characterization and Down-Regulation of Cysteine Protease Genes in Tobacco for Use in Recombinant Protein Production. *PLOS ONE*, *10*(7), e0130556. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130556>
- Edreva, A. (2005). *PATHOGENESIS-RELATED PROTEINS: RESEARCH PROGRESS IN THE LAST 15 YEARS*. *GEN. APPL. PLANT PHYSIOLOGY* (Vol. 31). Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/251a/8c7bfee5a062f4e336474c87338e26882af2.pdf>
- Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S., & Somssich, I. E. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, *5*(5), 199–206. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10785665>
- Fernandez-Pozo, N., Menda, N., Edwards, J. D., Saha, S., Tecle, I. Y., Strickler, S. R., ... Mueller, L. A. (2015). The Sol Genomics Network (SGN)—from genotype to phenotype to breeding. *Nucleic Acids Research*, *43*(D1), D1036–D1041. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1195>
- Feys, B. J., Wiermer, M., Bhat, R. A., Moisan, L. J., Medina-Escobar, N., Neu, C., ... Parker, J. E. (2005). Arabidopsis SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101 stabilizes and signals within an ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 complex in plant innate immunity. *The Plant Cell*, *17*(9), 2601–2613. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.033910>
- Franz, M., Rodriguez, H., Lopes, C., Zuberi, K., Montojo, J., Bader, G. D., & Morris, Q. (2018). GeneMANIA update 2018. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W60–W64. <https://doi.org/10.1093/nar/gky311>
- Frith, M. C. (2011). A new repeat-masking method enables specific detection of homologous sequences. *Nucleic Acids Research*, *39*(4), e23. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1212>
- Fromm, H., Katagiri, F., & Chua, N. H. (1991). The tobacco transcription activator TGA1a binds to a sequence in the 5' upstream region of a gene encoding a TGA1a-related protein. *Molecular & General Genetics: MGG*, *229*(2), 181–188. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1921969>
- Fu, Z. Q., & Dong, X. (2013). Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Annual Review of Plant Biology*, *64*(1), 839–863. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105606>
- Fu, Z. Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., ... Dong, X. (2012). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*, *486*(7402), 228–232. <https://doi.org/10.1038/nature11162>

- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., ... Ryals, J. (1993). Requirement of Salicylic Acid for the Induction of Systemic Acquired Resistance. *Science*, 261(5122), 754–756. <https://doi.org/10.1126/science.261.5122.754>
- Gallego-Bartolomé, J., Minguet, E. G., Grau-Enguix, F., Abbas, M., Locascio, A., Thomas, S. G., ... Blázquez, M. A. (2012). Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(33), 13446–13451. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119992109>
- García, J. A., & Pallás, V. (2015). Viral factors involved in plant pathogenesis. *Current Opinion in Virology*, 11, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.01.001>
- Garcion, C., Lohmann, A., Lamodiére, E., Catinot, J., Buchala, A., Doermann, P., & Metraux, J.-P. (2008). Characterization and Biological Function of the ISOCHORISMATE SYNTHASE2 Gene of Arabidopsis. *PLANT PHYSIOLOGY*, 147(3), 1279–1287. <https://doi.org/10.1104/pp.108.119420>
- Gatz, C. (2013). From Pioneers to Team Players: TGA Transcription Factors Provide a Molecular Link Between Different Stress Pathways. / 151 *MPMI*, 26(2). <https://doi.org/10.1094/MPMI>
- Gergerich, R. C., & Dolja, V. V. (2006). Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2006-0414-01>
- Ghassemian, M., Nambara, E., Cutler, S., Kawaide, H., Kamiya, Y., & McCourt, P. (2000). Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 12(7), 1117–1126. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10899978>
- Göhre, V., & Robatzek, S. (2008). Breaking the Barriers: Microbial Effector Molecules Subvert Plant Immunity. *Annual Review of Phytopathology*, 46(1), 189–215. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.46.120407.110050>
- Grant, M. R., & Jones, J. D. G. (2009). Hormone (Dis)harmony Moulds Plant Health and Disease. *Science*, 324(5928), 750–752. <https://doi.org/10.1126/science.1173771>
- Green y Sambrook. (2012). *Molecular cloning : a laboratory manual*.
- Greenboim-Wainberg, Y., Maymon, I., Borochoy, R., Alvarez, J., Olszewski, N., Ori, N., ... Weiss, D. (2005). Cross Talk between Gibberellin and Cytokinin: The Arabidopsis GA Response Inhibitor SPINDLY Plays a Positive Role in Cytokinin Signaling. *THE PLANT CELL ONLINE*, 17(1), 92–102. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.028472>
- Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z.-L., Powers, S. J., ... Thomas, S. G. (2006). Genetic Characterization and Functional Analysis of the GID1 Gibberellin Receptors in Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE*, 18(12), 3399–3414. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047415>
- Gruner, K., Griebel, T., Návarová, H., Attaran, E., & Zeier, J. (2013). Reprogramming of plants during systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, 4, 252. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00252>
- Guenoune-Gelbart, D., Elbaum, M., Sagi, G., Levy, A., & Epel, B. L. (2008). Tobacco mosaic virus (TMV) Replicase and Movement Protein Function Synergistically in Facilitating TMV Spread by Lateral Diffusion in the Plasmodesmal Desmotubule of *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(3), 335–345. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-3-0335>
- Gupta, R., & Chakrabarty, S. K. (2013). Gibberellic acid in plant. *Plant Signaling & Behavior*, 8(9), e25504. <https://doi.org/10.4161/psb.25504>

- Hahn, J.-S. (2005). Regulation of Nod1 by Hsp90 chaperone complex. *FEBS Letters*, 579(20), 4513–4519. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.07.024>
- Hamilton, A. J., & Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5441), 950–952. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10542148>
- Hedden, P., & Phillips, A. L. (2000). Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends in Plant Science*, 5(12), 523–530. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11120474>
- Hehl, R., Norval, L., Romanov, A., & Bülow, L. (2016). Boosting AthaMap Database Content with Data from Protein Binding Microarrays. *Plant and Cell Physiology*, 57(1), e4–e4. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv156>
- Heinlein, M. (2002). Plasmodesmata: dynamic regulation and role in macromolecular cell-to-cell signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(6), 543–552. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12393018>
- Heinlein, M. (2015, May). Plant virus replication and movement. *Virology*. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.01.025>
- Hellens, R., Allan, A., Friel, E., Bolitho, K., Grafton, K., Templeton, M., ... Laing, W. (2005). Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. *Plant Methods*, 1(1), 13. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-1-13>
- Henry, E., Yadeta, K. A., & Coaker, G. (2013). Recognition of bacterial plant pathogens: local, systemic and transgenerational immunity. *New Phytologist*, 199(4), 908–915. <https://doi.org/10.1111/nph.12214>
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., & Korenaga, T. (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Research*, 27(1), 297–300. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9847208>
- Hilf, M. E., & Dawson, W. O. (1993). The Tobamovirus Capsid Protein Functions as a Host-Specific Determinant of Long-Distance Movement. *Virology*, 193(1), 106–114. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1107>
- 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), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00154>
- Hooker, W. J. (1981). Compendium of Potato Diseases. *American Phytopathological Society*, 33–34.
- Hossain, M. A., Munemasa, S., Uraji, M., Nakamura, Y., Mori, I. C., & Murata, Y. (2011). Involvement of Endogenous Abscisic Acid in Methyl Jasmonate-Induced Stomatal Closure in Arabidopsis. *PLANT PHYSIOLOGY*, 156(1), 430–438. <https://doi.org/10.1104/pp.111.172254>
- Hou, S., Yang, Y., & Zhou, J.-M. (2009). The multilevel and dynamic interplay between plant and pathogen. *Plant Signaling & Behavior*, 4(4), 283–293. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19794843>
- Huang, Z., Yeakley, J. M., Garcia, E. W., Holdridge, J. D., Fan, J.-B., & Whitham, S. A. (2005). Salicylic Acid-Dependent Expression of Host Genes in Compatible Arabidopsis-Virus Interactions. *PLANT PHYSIOLOGY*, 137(3), 1147–1159. <https://doi.org/10.1104/pp.104.056028>
- Hull, R. (2002). Transmission 2: Mechanical, Seed, Pollen and Epidemiology. In *Matthews' Plant Virology* (pp. 533–581). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012361160-4/50063-3>

- Idrovo Espín, F. M., Peraza-Echeverría, S., Fuentes, G., & Santamaría, J. M. (2012). In silico cloning and characterization of the TGA (TGACG MOTIF-BINDING FACTOR) transcription factors subfamily in *Carica papaya*. *Plant Physiology and Biochemistry*, *54*, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.02.011>
- Ihmels, J., Levy, R., & Barkai, N. (2004). Principles of transcriptional control in the metabolic network of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotechnology*, *22*(1), 86–92. <https://doi.org/10.1038/nbt918>
- Ikedo, A., Ueguchi-Tanaka, M., Sonoda, Y., Kitano, H., Koshioka, M., Futsuhara, Y., ... Yamaguchi, J. (2001). Slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8. *The Plant Cell*, *13*(5), 999–1010. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11340177>
- Iwai, T., Seo, S., Mitsuhashi, I., & Ohashi, Y. (2007). Probenazole-Induced Accumulation of Salicylic Acid Confers Resistance to *Magnaporthe oryzae* in Adult Rice Plants. *Plant and Cell Physiology*, *48*(7), 915–924. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm062>
- Jasinski, S., Piazza, P., Craft, J., Hay, A., Woolley, L., Rieu, I., ... Tsiantis, M. (2005). KNOX Action in Arabidopsis Is Mediated by Coordinate Regulation of Cytokinin and Gibberellin Activities. *Current Biology*, *15*(17), 1560–1565. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.023>
- Jasinski, S., Tattersall, A., Piazza, P., Hay, A., Martínez-García, J. F., Schmitz, G., ... Tsiantis, M. (2008). PROCERA encodes a DELLA protein that mediates control of dissected leaf form in tomato. *The Plant Journal*, *56*(4), 603–612. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2008.03628.x>
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, *6*(13), 3901–3907. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3327686>
- Ji, L.-H., & Ding, S.-W. (2001). The Suppressor of Transgene RNA Silencing Encoded by *Cucumber mosaic virus* Interferes with Salicylic Acid-Mediated Virus Resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *14*(6), 715–724. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.6.715>
- Jin, H., Choi, S.-M., Kang, M.-J., Yun, S.-H., Kwon, D.-J., Noh, Y.-S., & Noh, B. (2018). Salicylic acid-induced transcriptional reprogramming by the HAC-NPR1-TGA histone acetyltransferase complex in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, *46*(22), 11712–11725. <https://doi.org/10.1093/nar/gky847>
- Johnson, C., Boden, E., & Arias, J. (2003). Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *15*(8), 1846–1858. <https://doi.org/10.1105/TPC.012211>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, *444*(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Joshi, J. R., Khazanov, N., Senderowitz, H., Burdman, S., Lipsky, A., & Yedidia, I. (2016). Plant phenolic volatiles inhibit quorum sensing in pectobacteria and reduce their virulence by potential binding to ExpI and ExpR proteins. *Scientific Reports*, *6*, 38126. <https://doi.org/10.1038/srep38126>
- Jovel, J., Walker, M., & Sanfaçon, H. (2011). Salicylic Acid-Dependent Restriction of *Tomato ringspot virus* Spread in Tobacco Is Accompanied by a Hypersensitive Response, Local RNA Silencing, and Moderate Systemic Resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *24*(6), 706–718. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-10-0224>
- Kachroo, A., & Kachroo, P. (2007). Salicylic acid-, jasmonic acid- and ethylene-mediated regulation of plant defense signaling. *Genetic Engineering*, *28*, 55–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17153933>

- Kadota, Y., Shirasu, K., & Guerois, R. (2010). NLR sensors meet at the SGT1–HSP90 crossroad. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(4), 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.12.005>
- Karimi, M., Inzé, D., & Depicker, A. (2002). GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, 7(5), 193–195. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11992820>
- Katagiri, F., Lam, E., & Chua, N.-H. (1989). Two tobacco DNA-binding proteins with homology to the nuclear factor CREB. *Nature*, 340(6236), 727–730. <https://doi.org/10.1038/340727a0>
- Katou, S., Yamada, R., Ishihama, N., Yoshioka, H., & Yoshioka, M. (2011). Phosphorylation of the Nicotiana benthamiana WRKY8 Transcription Factor by MAPK Functions in the Defense Response. *The Plant Cell*, 23(3), 1153–1170. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.081794>
- Kawakami, S., Watanabe, Y., & Beachy, R. N. (2004). Tobacco mosaic virus infection spreads cell to cell as intact replication complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(16), 6291–6296. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401221101>
- Kazan, K., & Manners, J. M. (2009). Linking development to defense: auxin in plant–pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, 14(7), 373–382. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.04.005>
- Kharchenko, P., Church, G. M., & Vitkup, D. (2005). Expression dynamics of a cellular metabolic network. *Molecular Systems Biology*, 1(1), E1–E6. <https://doi.org/10.1038/msb4100023>
- Kim, H. S., & Delaney, T. P. (2002). Over-expression of *TGA5*, which encodes a bZIP transcription factor that interacts with NIM1/NPR1, confers SAR-independent resistance in *Arabidopsis thaliana* to *Peronospora parasitica*. *The Plant Journal*, 32(2), 151–163. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01411.x>
- Kim, J.-Y. (2018). Symplasmic Intercellular Communication through Plasmodesmata. *Plants*, 7(1), 23. <https://doi.org/10.3390/plants7010023>
- Kim, J.-Y., Rim, Y., Wang, J., & Jackson, D. (2005). A novel cell-to-cell trafficking assay indicates that the KNOX homeodomain is necessary and sufficient for intercellular protein and mRNA trafficking. *Genes & Development*, 19(7), 788–793. <https://doi.org/10.1101/gad.332805>
- Klug, A. (1999). The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 354(1383), 531–535. <https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0404>
- Koo, J. C., Asurmendi, S., Bick, J., Woodford-Thomas, T., & Beachy, R. N. (2004). Ecdysone agonist-inducible expression of a coat protein gene from tobacco mosaic virus confers viral resistance in transgenic Arabidopsis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 37(3), 439–448. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14731262>
- Koornneef, A., Leon-Reyes, A., Ritsema, T., Verhage, A., Den Otter, F. C., Van Loon, L. C., & Pieterse, C. M. J. (2008). Kinetics of Salicylate-Mediated Suppression of Jasmonate Signaling Reveal a Role for Redox Modulation. *PLANT PHYSIOLOGY*, 147(3), 1358–1368. <https://doi.org/10.1104/pp.108.121392>
- Kriventseva, E. V., Tegenfeldt, F., Petty, T. J., Waterhouse, R. M., Simão, F. A., Pozdnyakov, I. A., ... Zdobnov, E. M. (2015). OrthoDB v8: update of the hierarchical catalog of orthologs and the underlying free software. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D250–D256. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1220>

- Kriventseva, E. V., Kuznetsov, D., Tegenfeldt, F., Manni, M., Dias, R., Simão, F. A., & Zdobnov, E. M. (2019). OrthoDB v10: sampling the diversity of animal, plant, fungal, protist, bacterial and viral genomes for evolutionary and functional annotations of orthologs. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D807–D811. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1053>
- Kurihara, Y., Inaba, N., Kutsuna, N., Takeda, A., Tagami, Y., & Watanabe, Y. (2007). Binding of tobamovirus replication protein with small RNA duplexes. *Journal of General Virology*, 88(8), 2347–2352. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82994-0>
- Laird, J., McInally, C., Carr, C., Doddiah, S., Yates, G., Chrysanthou, E., ... Milner, J. J. (2013). Identification of the domains of cauliflower mosaic virus protein P6 responsible for suppression of RNA silencing and salicylic acid signalling. *The Journal of General Virology*, 94(Pt 12), 2777–2789. <https://doi.org/10.1099/vir.0.057729-0>
- Lam, E., Benfey, P. N., Gilmartin, P. M., Fang, R. X., & Chua, N. H. (1989). Site-specific mutations alter in vitro factor binding and change promoter expression pattern in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(20), 7890–7894. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2813365>
- Leone, M., Keller, M. M., Cerrudo, I., & Ballaré, C. L. (2014). To grow or defend? Low red : far-red ratios reduce jasmonate sensitivity in Arabidopsis seedlings by promoting DELLA degradation and increasing JAZ10 stability. *New Phytologist*, 204(2), 355–367. <https://doi.org/10.1111/nph.12971>
- Lewandowski, D. J., & Adkins, S. (2005). The tubule-forming NSm protein from Tomato spotted wilt virus complements cell-to-cell and long-distance movement of Tobacco mosaic virus hybrids. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.06.050>
- Li, G., Meng, X., Wang, R., Mao, G., Han, L., Liu, Y., & Zhang, S. (2012). Dual-Level Regulation of ACC Synthase Activity by MPK3/MPK6 Cascade and Its Downstream WRKY Transcription Factor during Ethylene Induction in Arabidopsis. *PLoS Genetics*, 8(6), e1002767. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002767>
- Li, J., Brader, G., Kariola, T., & Tapio Palva, E. (2006). WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *The Plant Journal*, 46(3), 477–491. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02712.x>
- Li, J., Pang, Z., Trivedi, P., Zhou, X., Ying, X., Jia, H., & Wang, N. (2017). ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ Encodes a Functional Salicylic Acid (SA) Hydroxylase That Degrades SA to Suppress Plant Defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(8), 620–630. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-16-0257-R>
- Link, K., & Sonnewald, U. (2016). Interaction of Movement Proteins with Host Factors, Mechanism of Viral Host Cell Manipulation and Influence of MPs on Plant Growth and Development. In *Plant-Virus Interactions* (pp. 1–37). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25489-0_1
- Lippok, B., Birkenbihl, R. P., Rivory, G., Brümmer, J., Schmelzer, E., Logemann, E., & Somssich, I. E. (2007). Expression of *AtWRKY33* Encoding a Pathogen- or PAMP-Responsive WRKY Transcription Factor Is Regulated by a Composite DNA Motif Containing W Box Elements. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(4), 420–429. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0420>
- Liu, L., Sonbol, F.-M., Huot, B., Gu, Y., Withers, J., Mwimba, M., ... Dong, X. (2016). Salicylic acid receptors activate jasmonic acid signalling through a non-canonical pathway to promote effector-triggered immunity. *Nature Communications*, 7(1), 13099. <https://doi.org/10.1038/ncomms13099>
- Liu, T., Song, T., Zhang, X., Yuan, H., Su, L., Li, W., ... Dou, D. (2014). Unconventionally secreted effectors of two filamentous pathogens target plant salicylate biosynthesis. *Nature Communications*, 5(1), 4686. <https://doi.org/10.1038/ncomms5686>

- Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R., & Dinesh-Kumar, S. P. (2002). Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 30(4), 415–429. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12028572>
- Liu, Y., Schiff, M., Serino, G., Deng, X.-W., & Dinesh-Kumar, S. P. (2002). Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the N gene-mediated resistance response to Tobacco mosaic virus. *The Plant Cell*, 14(7), 1483–1496. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12119369>
- Love, A. J., Geri, C., Laird, J., Carr, C., Yun, B.-W., Loake, G. J., ... Milner, J. J. (2012a). Cauliflower mosaic virus Protein P6 Inhibits Signaling Responses to Salicylic Acid and Regulates Innate Immunity. *PLoS ONE*, 7(10), e47535. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047535>
- Love, A. J., Geri, C., Laird, J., Carr, C., Yun, B.-W., Loake, G. J., ... Milner, J. J. (2012b). Cauliflower mosaic virus Protein P6 Inhibits Signaling Responses to Salicylic Acid and Regulates Innate Immunity. *PLoS ONE*, 7(10), e47535. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047535>
- Lu, H. (2009). Dissection of salicylic acid-mediated defense signaling networks. *Plant Signaling & Behavior*, 4(8), 713–717. <https://doi.org/10.4161/PSB.4.8.9173>
- Madaoui, H., Ducassou, L., Ochsenbein, F., Shirasu, K., Guerois, R., Kadota, Y., & Amigues, B. (2008). Structural and functional analysis of SGT1–HSP90 core complex required for innate immunity in plants. *EMBO Reports*, 9(12), 1209–1215. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.185>
- Maekawa, S., Sato, T., Asada, Y., Yasuda, S., Yoshida, M., Chiba, Y., & Yamaguchi, J. (2012). The Arabidopsis ubiquitin ligases ATL31 and ATL6 control the defense response as well as the carbon/nitrogen response. *Plant Molecular Biology*, 79(3), 217–227. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9907-0>
- Mahony, S., & Benos, P. V. (2007). STAMP: a web tool for exploring DNA-binding motif similarities. *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server), W253–W258. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm272>
- Makarov, V. V., & Kalinina, N. O. (2016). Structure and noncanonical activities of coat proteins of helical plant viruses. *Biochemistry (Moscow)*, 81(1), 1–18. <https://doi.org/10.1134/S0006297916010016>
- Mandadi, K. K., & Scholthof, K.-B. G. (n.d.). Plant Immune Responses Against Viruses: How Does a Virus Cause Disease? OA. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.111658>
- Manohar, M., Tian, M., Moreau, M., Park, S.-W., Choi, H. W., Fei, Z., ... Klessig, D. F. (2015). Identification of multiple salicylic acid-binding proteins using two high throughput screens. *Frontiers in Plant Science*, 5, 777. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00777>
- Marano, M., Malcuit, I., De Jong, W., & Baulcombe, D. (2002). High-resolution genetic map of Nb, a gene that confers hypersensitive resistance to potato virus X in Solanum tuberosum. *Theoretical and Applied Genetics*, 105(2), 192–200. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0962-9>
- Marín-de la Rosa, N., Sotillo, B., Miskolczi, P., Gibbs, D. J., Vicente, J., Carbonero, P., ... Blázquez, M. A. (2014). Large-scale identification of gibberellin-related transcription factors defines group VII ETHYLENE RESPONSE FACTORS as functional DELLA partners. *Plant Physiology*, 166(2), 1022–1032. <https://doi.org/10.1104/pp.114.244723>
- Martí, C., Orzáez, D., Ellul, P., Moreno, V., Carbonell, J., & Granell, A. (2007). Silencing of *DELLA* induces facultative parthenocarpy in tomato fruits. *The Plant Journal*, 52(5), 865–876. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03282.x>

- Massad, T. J., Dyer, L. A., & Vega C., G. (2012). Costs of Defense and a Test of the Carbon-Nutrient Balance and Growth-Differentiation Balance Hypotheses for Two Co-Occurring Classes of Plant Defense. *PLoS ONE*, 7(10), e47554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047554>
- Maule, A. J., & Palukaitis, P. (1991). Virus movement in infected plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 9(6), 457–473. <https://doi.org/10.1080/07352689109382301>
- Maule, A., Leh, V., & Lederer, C. (2002). The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(4), 279–284. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12179959>
- Mayers, C. N., Lee, K.-C., Moore, C. A., Wong, S.-M., & Carr, J. P. (2005). Salicylic Acid-Induced Resistance to *Cucumber mosaic virus* in Squash and *Arabidopsis thaliana*: Contrasting Mechanisms of Induction and Antiviral Action. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(5), 428–434. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-0428>
- McGinnis, K. M., Thomas, S. G., Soule, J. D., Strader, L. C., Zale, J. M., Sun, T., & Steber, C. M. (2003). The Arabidopsis SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *The Plant Cell*, 15(5), 1120–1130. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12724538>
- Metraux, J. P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., ... Inverardi, B. (1990). Increase in Salicylic Acid at the Onset of Systemic Acquired Resistance in Cucumber. *Science*, 250(4983), 1004–1006. <https://doi.org/10.1126/science.250.4983.1004>
- Moffat, C. S., Ingle, R. A., Wathugala, D. L., Saunders, N. J., Knight, H., & Knight, M. R. (2012). ERF5 and ERF6 Play Redundant Roles as Positive Regulators of JA/Et-Mediated Defense against *Botrytis cinerea* in Arabidopsis. *PLoS ONE*, 7(4), e35995. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035995>
- Molla, K. A., Karmakar, S., Chanda, P. K., Sarkar, S. N., Datta, S. K., & Datta, K. (2016). Tissue-specific expression of Arabidopsis NPR1 gene in rice for sheath blight resistance without compromising phenotypic cost. *Plant Science*, 250, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.06.005>
- Montejo, J., Zuberi, K., Rodriguez, H., Kazi, F., Wright, G., Donaldson, S. L., ... Bader, G. D. (2010). GeneMANIA Cytoscape plugin: fast gene function predictions on the desktop. *Bioinformatics*, 26(22), 2927–2928. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq562>
- Mou, Z., Fan, W., & Dong, X. (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, 113(7), 935–944. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12837250>
- Munemasa, S., Oda, K., Watanabe-Sugimoto, M., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., & Murata, Y. (2007). The coronatine-insensitive 1 Mutation Reveals the Hormonal Signaling Interaction between Abscisic Acid and Methyl Jasmonate in Arabidopsis Guard Cells. Specific Impairment of Ion Channel Activation and Second Messenger Production. *PLANT PHYSIOLOGY*, 143(3), 1398–1407. <https://doi.org/10.1104/pp.106.091298>
- Murase, K., Hirano, Y., Sun, T., & Hakoshima, T. (2008). Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature*, 456(7221), 459–463. <https://doi.org/10.1038/nature07519>
- Murmu, J., Bush, M. J., DeLong, C., Li, S., Xu, M., Khan, M., ... Hepworth, S. R. (2010). Arabidopsis Basic Leucine-Zipper Transcription Factors TGA9 and TGA10 Interact with Floral Glutaredoxins ROXY1 and ROXY2 and Are Redundantly Required for Anther Development 1[C][W][OA]. <https://doi.org/10.1104/pp.110.159111>

- Muskett, P. R., Kahn, K., Austin, M. J., Moisan, L. J., Sadanandom, A., Shirasu, K., ... Parker, J. E. (2002). Arabidopsis RAR1 exerts rate-limiting control of R gene-mediated defenses against multiple pathogens. *The Plant Cell*, 14(5), 979–992. <https://doi.org/10.1105/TPC.001040>
- Muthamilarasan, M., & Prasad, M. (2013). Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. *Journal of Biosciences*, 38(2), 433–449. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23660678>
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lisón, P., Nemri, A., Harberd, N. P., & Jones, J. D. G. (2008). DELLAs Control Plant Immune Responses by Modulating the Balance of Jasmonic Acid and Salicylic Acid Signaling. *Current Biology*, 18(9), 650–655. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.03.060>
- Naylor, M., Murphy, A. M., Berry, J. O., & Carr, J. P. (1998). Salicylic Acid Can Induce Resistance to Plant Virus Movement. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(9), 860–868. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.9.860>
- Nicaise, V. (2014). Crop immunity against viruses: outcomes and future challenges. *Frontiers in Plant Science*, 5, 660. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00660>
- Niehl, A., & Heinlein, M. (2011). Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma*, 248(1), 75–99. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0246-1>
- Niggeweg, R., Thurow, C., Kegler, C., Gatz, C., & Author, C. (n.d.). *Tobacco transcription factor TGA2.2 is the main component of ASF-1/SARP and is involved in salicylic acid-and auxin-inducible expression of as-1-containing target promoters** Downloaded from. Retrieved from <http://www.jbc.org/>
- Niggeweg, R., Thurow, C., Weigel, R., Pfitzner, U., & Gatz, C. (2000). Tobacco TGA factors differ with respect to interaction with NPR1, activation potential and DNA-binding properties. *Plant Molecular Biology*, 42(5), 775–788. <https://doi.org/10.1023/A:1006319113205>
- Nobuta, K., Okrent, R. A., Stoutemyer, M., Rodibaugh, N., Kempema, L., Wildermuth, M. C., & Innes, R. W. (n.d.). The GH3 Acyl Adenylase Family Member PBS3 Regulates Salicylic Acid-Dependent Defense Responses in Arabidopsis 1[W][OA]. <https://doi.org/10.1104/pp.107.097691>
- Nomura, K., Melotto, M., & He, S.-Y. (2005). Suppression of host defense in compatible plant–Pseudomonas syringae interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4), 361–368. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.05.005>
- Noshi, M., Mori, D., Tanabe, N., Maruta, T., & Shigeoka, S. (2016). Arabidopsis clade IV TGA transcription factors, TGA10 and TGA9, are involved in ROS-mediated responses to bacterial PAMP flg22. *Plant Science*, 252, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.06.019>
- Obayashi, T., Hayashi, S., Saeki, M., Ohta, H., & Kinoshita, K. (2009). ATTED-II provides coexpressed gene networks for Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, 37(Database), D987–D991. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn807>
- Oliferuk, S., Ródenas, R., Pérez, A., Martínez, V., Rubio, F., & Santa-María, G. E. (2017). DELLAs Contribute to Set the Growth and Mineral Composition of Arabidopsis thaliana Plants Grown Under Conditions of Potassium Deprivation. *Journal of Plant Growth Regulation*, 36(2), 487–501. <https://doi.org/10.1007/s00344-016-9656-4>
- Olszewski, N., Sun, T.-P., & Gubler, F. (2002). Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *The Plant Cell*, 14 Suppl, S61–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045270>

- Oparka, K. J., Prior, D. A., Santa Cruz, S., Padgett, H. S., & Beachy, R. N. (1997). Gating of epidermal plasmodesmata is restricted to the leading edge of expanding infection sites of tobacco mosaic virus (TMV). *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 12(4), 781–789. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9375392>
- Padmanabhan, M. S., Kramer, S. R., Wang, X., & Culver, J. N. (2008). Tobacco Mosaic Virus Replicase-Auxin/Indole Acetic Acid Protein Interactions: Reprogramming the Auxin Response Pathway To Enhance Virus Infection. *Journal of Virology*, 82(5), 2477–2485. <https://doi.org/10.1128/JVI.01865-07>
- Pajerowska-Mukhtar, K. M., Emerine, D. K., & Mukhtar, M. S. (2013). Tell me more: roles of NPRs in plant immunity. *Trends in Plant Science*, 18(7), 402–411. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.04.004>
- Pallas, V., & Garcia, J. A. (2011). How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *Journal of General Virology*, 92(12), 2691–2705. <https://doi.org/10.1099/vir.0.034603-0>
- Palmer, M., Steenkamp, E. T., Coetzee, M. P. A., Chan, W.-Y., van Zyl, E., De Maayer, P., ... Venter, S. N. (2017). Phylogenomic resolution of the bacterial genus *Pantoea* and its relationship with *Erwinia* and *Tatumella*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(10), 1287–1309. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0852-4>
- Park, E.-J., Kim, H.-T., Choi, Y.-I., Lee, C., Nguyen, V. P., Jeon, H.-W., ... Ko, J.-H. (2015). Overexpression of *gibberellin 20-oxidase1* from *Pinus densiflora* results in enhanced wood formation with gelatinous fiber development in a transgenic hybrid poplar. *Tree Physiology*, 35(11), tpv099. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpv099>
- Peña, E. J., & Heinlein, M. (2012). RNA transport during TMV cell-to-cell movement. *Frontiers in Plant Science*, 3, 193. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00193>
- Peng, J., Carol, P., Richards, D. E., King, K. E., Cowling, R. J., Murphy, G. P., & Harberd, N. P. (1997a). The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes & Development*, 11(23), 3194–3205. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9389651>
- Pereda, S., Ehrenfeld, N., Medina, C., Delgado, J., & Arce-Johnson, P. (2000). Comparative analysis of TMV-Cg and TMV-U1 detection methods in infected *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Virological Methods*, 90(2), 135–142. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(00\)00230-5](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(00)00230-5)
- Petersen, K., Qiu, J.-L., Lütje, J., Fiil, B. K., Hansen, S., Mundy, J., & Petersen, M. (2010). Arabidopsis MKS1 Is Involved in Basal Immunity and Requires an Intact N-terminal Domain for Proper Function. *PLoS ONE*, 5(12), e14364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014364>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886>
- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van Der Ent, S., & Van Wees, S. C. M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, 5(5), 308–316. <https://doi.org/10.1038/nchembio.164>
- Pieterse, C. M. J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. M. (2012). Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28(1), 489–521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>
- Pieterse, C. M., & Van Loon, L. (2004). NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4), 456–464. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.05.006>

- Pitzschke, A., Schikora, A., & Hirt, H. (2009). MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(4), 421–426. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.06.008>
- Poque, S., Wu, H.-W., Huang, C.-H., Cheng, H.-W., Hu, W.-C., Yang, J.-Y., ... Yeh, S.-D. (2018). Potyviral Gene-Silencing Suppressor HCPro Interacts with Salicylic Acid (SA)-Binding Protein 3 to Weaken SA-Mediated Defense Responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(1), 86–100. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-17-0128-FI>
- PRINS, M., LAIMER, M., NORIS, E., SCHUBERT, J., WASSENEGGER, M., & TEPFER, M. (2007). Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Molecular Plant Pathology*, 0(0), 071127144754001–??? <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00447.x>
- Qi, G., Chen, J., Chang, M., Chen, H., Hall, K., Korin, J., ... Fu, Z. Q. (2018a). Pandemonium Breaks Out: Disruption of Salicylic Acid-Mediated Defense by Plant Pathogens. *Molecular Plant*, 11(12), 1427–1439. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.10.002>
- Qiu, J.-L., Fiil, B. K., Petersen, K., Nielsen, H. B., Botanga, C. J., Thorgrimsen, S., ... Petersen, M. (2008). Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *The EMBO Journal*, 27(16), 2214–2221. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.147>
- Quadrana, L., Rodriguez, M. C., López, M., Bermúdez, L., Nunes-Nesi, A., Fernie, A. R., ... Carrari, F. (2011). Coupling virus-induced gene silencing to exogenous green fluorescence protein expression provides a highly efficient system for functional genomics in Arabidopsis and across all stages of tomato fruit development. *Plant Physiology*, 156(3), 1278–1291. <https://doi.org/10.1104/pp.111.177345>
- Rabe, F., Ajami-Rashidi, Z., Doehlemann, G., Kahmann, R., & Djamei, A. (2013). Degradation of the plant defence hormone salicylic acid by the biotrophic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology*, 89(1), 179–188. <https://doi.org/10.1111/mmi.12269>
- Regenmortel, M. H. V. van, Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., ... Wickner, R. B. (2000). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20013040876>
- Ren, X.-J., Huang, W.-D., Li, W.-Z., & Yu, D.-Q. (2010). Tobacco transcription factor WRKY4 is a modulator of leaf development and disease resistance. *Biologia Plantarum*, 54(4), 684–690. <https://doi.org/10.1007/s10535-010-0121-0>
- Riaño-Pachón, D., Ruzicic, S., Dreyer, I., & Mueller-Roeber, B. (2007). PlnTFDB: an integrative plant transcription factor database. *BMC Bioinformatics*, 8(1), 42. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-42>
- Rocha-Peña M., Ochoa-Corona F., Martínez-Soriano J., Roistacher C., Lee R. (1998). Citrus tristeza virus: events that occur before, during and after the disease epidemics.
- Rodriguez, M. C. (2015). Estudio del rol de la proteína de cápside del virus TMV-Cg en la modulación de la expresión génica y en la alteración de factores endógenos del hospedante Arabidopsis thaliana.
- Rodriguez, M. C., Conti, G., Zavallo, D., Manacorda, C. A., & Asurmendi, S. (2014). TMV-Cg Coat Protein stabilizes DELLA proteins and in turn negatively modulates salicylic acid-mediated defense pathway during Arabidopsis thalianaviral infection. *BMC Plant Biology*, 14(1), 210. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0210-x>

- Salanenka, Y., Verstraeten, I., Löffke, C., Tabata, K., Naramoto, S., Glanc, M., & Friml, J. (2018). Gibberellin DELLA signaling targets the retromer complex to redirect protein trafficking to the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(14), 3716–3721. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721760115>
- Saleh, A., Withers, J., Mohan, R., Marqués, J., Gu, Y., Yan, S., ... Dong, X. (2015). Posttranslational Modifications of the Master Transcriptional Regulator NPR1 Enable Dynamic but Tight Control of Plant Immune Responses. *Cell Host & Microbe*, *18*(2), 169–182. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2015.07.005>
- Sánchez, G., Gerhardt, N., Siciliano, F., Vojnov, A., Malcuit, I., & Marano, M. R. (2010). Salicylic Acid Is Involved in the Nb -Mediated Defense Responses to Potato virus X in *Solanum tuberosum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *23*(4), 394–405. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-4-0394>
- Santner, A., Calderon-Villalobos, L. I. A., & Estelle, M. (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology*, *5*(5), 301–307. <https://doi.org/10.1038/nchembio.165>
- Sasaki, A., Itoh, H., Gomi, K., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., ... Matsuoka, M. (2003). Accumulation of Phosphorylated Repressor for Gibberellin Signaling in an F-box Mutant. *Science*, *299*(5614), 1896–1898. <https://doi.org/10.1126/science.1081077>
- Sato, T., Maekawa, S., Yasuda, S., Sonoda, Y., Kato, E., Ichikawa, T., ... Yamaguchi, J. (2009). CNI1/ATL31, a RING-type ubiquitin ligase that functions in the carbon/nitrogen response for growth phase transition in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal*, *60*(5), 852–864. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04006.x>
- Schellenberg, B., Ramel, C., & Dudler, R. (2010). *Pseudomonas syringae* Virulence Factor Syringolin A Counteracts Stomatal Immunity by Proteasome Inhibition. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *23*(10), 1287–1293. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-10-0094>
- Schiermeyer, A., Thurow, C., & Gatz, C. (2003). Tobacco bZIP factor TGA10 is a novel member of the TGA family of transcription factors. *Plant Molecular Biology*, *51*(6), 817–829. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12777042>
- SCHOLTHOF, K.-B. G., ADKINS, S., CZOSNEK, H., PALUKAITIS, P., JACQUOT, E., HOHN, T., ... FOSTER, G. D. (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, *12*(9), 938–954. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x>
- Schwechheimer, C. (2011). Gibberellin signaling in plants - the extended version. *Frontiers in Plant Science*, *2*, 107. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00107>
- Senthil-Kumar, M., Hema, R., Anand, A., Kang, L., Udayakumar, M., & Mysore, K. S. (2007). A systematic study to determine the extent of gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and other Solanaceae species when heterologous gene sequences are used for virus-induced gene silencing. *New Phytologist*, *176*(4), 782–791. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02225.x>
- Seo, Y.-S., Lee, S.-K., Song, M.-Y., Suh, J.-P., Hahn, T.-R., Ronald, P., & Jeon, J.-S. (2008). The HSP90-SGT1-RAR1 molecular chaperone complex: A core modulator in plant immunity. *Journal of Plant Biology*, *51*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/BF03030734>
- Shang, Y., Li, X., Cui, H., He, P., Thilmony, R., Chintamanani, S., ... Zhou, J.-M. (2006). RAR1, a central player in plant immunity, is targeted by *Pseudomonas syringae* effector AvrB. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(50), 19200–19205. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607279103>
- Shapiro, A. D., & Zhang, C. (2001). The role of NDR1 in avirulence gene-directed signaling and control of programmed cell death in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *127*(3), 1089–1101. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11706189>

- Shaw, J. G. (1999). Tobacco mosaic virus and the study of early events in virus infections. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 354(1383), 603–611. <https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0412>
- Shearer, H. L., Cheng, Y. T., Wang, L., Liu, J., Boyle, P., Després, C., ... Fobert, P. R. (2012). *Arabidopsis* Clade I TGA Transcription Factors Regulate Plant Defenses in an NPR1-Independent Fashion. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(11), 1459–1468. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-11-0256>
- Shigenaga, A. M., Berens, M. L., Tsuda, K., & Argueso, C. T. (2017). Towards engineering of hormonal crosstalk in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 38, 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.021>
- Shimura, H., & Pantaleo, V. (2011). Viral induction and suppression of RNA silencing in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1809(11–12), 601–612. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.04.005>
- Shirasu, K. (2009). The HSP90-SGT1 Chaperone Complex for NLR Immune Sensors. *Annual Review of Plant Biology*, 60(1), 139–164. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092906>
- Silverstone, A. L., Ciampaglio, C. N., & Sun, T. (1998). The *Arabidopsis* RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *The Plant Cell*, 10(2), 155–169. <https://doi.org/10.1105/TPC.10.2.155>
- Song, H. H., Hu, X., Qiu, B. S., Li, Y., & Wu, M. Y. (2005). Identification of a tobacco protein interacting with tomato mosaic virus coat protein and facilitating long-distance movement of virus. *Archives of Virology*, 150(10), 1993–2008. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0554-5>
- Soosaar, J. L. M., Burch-Smith, T. M., & Dinesh-Kumar, S. P. (2005). Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 789–798. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1239>
- Spoel, S. H. (2003). NPR1 Modulates Cross-Talk between Salicylate- and Jasmonate-Dependent Defense Pathways through a Novel Function in the Cytosol. *THE PLANT CELL ONLINE*, 15(3), 760–770. <https://doi.org/10.1105/tpc.009159>
- Spoel, S. H., Mou, Z., Tada, Y., Spivey, N. W., Genschik, P., & Dong, X. (2009). Proteasome-Mediated Turnover of the Transcription Coactivator NPR1 Plays Dual Roles in Regulating Plant Immunity. *Cell*, 137(5), 860–872. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2009.03.038>
- Sreekanta, S., Bethke, G., Hatsugai, N., Tsuda, K., Thao, A., Wang, L., ... Glazebrook, J. (2015). The receptor-like cytoplasmic kinase PCRK1 contributes to pattern-triggered immunity against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 207(1), 78–90. <https://doi.org/10.1111/nph.13345>
- Sun, T., Busta, L., Zhang, Q., Ding, P., Jetter, R., & Zhang, Y. (2018). TGACG-BINDING FACTOR 1 (TGA1) and TGA4 regulate salicylic acid and piperolic acid biosynthesis by modulating the expression of SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE DEFICIENT 1 (SARD1) and CALMODULIN-BINDING PROTEIN 60g (CBP60g). *New Phytologist*, 217(1), 344–354. <https://doi.org/10.1111/nph.14780>
- Szabo, L. J., & Bushnell, W. R. (2001). Hidden robbers: The role of fungal haustoria in parasitism of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(14), 7654–7655. <https://doi.org/10.1073/pnas.151262398>
- Tada, Y., Spoel, S. H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., ... Dong, X. (2008). Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5891), 952–956. <https://doi.org/10.1126/science.1156970>

- Taliansky, M., Roberts, I. M., Kalinina, N., Ryabov, E. V., Raj, S. K., Robinson, D. J., & Oparka, K. J. (2003). An umbraviral protein, involved in long-distance RNA movement, binds viral RNA and forms unique, protective ribonucleoprotein complexes. *Journal of Virology*, *77*(5), 3031–3040. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12584328>
- Tilsner, J., Taliansky, M. E., & Torrance, L. (2014). Plant Virus Movement. In eLS. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0020711.pub2>
- Ton, J., Flors, V., & Mauch-Mani, B. (2009). The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in Plant Science*, *14*(6), 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.03.006>
- Tyler, L., Thomas, S. G., Hu, J., Dill, A., Alonso, J. M., Ecker, J. R., & Sun, T.-P. (2004). DELLA Proteins and Gibberellin-Regulated Seed Germination and Floral Development in Arabidopsis. *PLANT PHYSIOLOGY*, *135*(2), 1008–1019. <https://doi.org/10.1104/pp.104.039578>
- Underwood, W. (2012). The Plant Cell Wall: A Dynamic Barrier Against Pathogen Invasion. *Frontiers in Plant Science*, *3*, 85. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00085>
- USADEL, B., OBAYASHI, T., MUTWIL, M., GIORGI, F. M., BASSEL, G. W., TANIMOTO, M., ... PROVART, N. J. (2009). Co-expression tools for plant biology: opportunities for hypothesis generation and caveats. *Plant, Cell & Environment*, *32*(12), 1633–1651. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02040.x>
- van Loon, L. C., Gerritsen, Y. A. M., & Ritter, C. E. (1987). Identification, purification, and characterization of pathogenesis-related proteins from virus-infected Samsun NN tobacco leaves. *Plant Molecular Biology*, *9*(6), 593–609. <https://doi.org/10.1007/BF00020536>
- Vlot, A. C., Maris, D. ', Dempsey, A., & Klessig, D. F. (2009). Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202>
- Vuorinen, A. L., Kelloniemi, J., & Valkonen, J. P. T. (2011a). Why do viruses need phloem for systemic invasion of plants? *Plant Science*, *181*(4), 355–363. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.06.008>
- Wan, J., Cabanillas, D. G., Zheng, H., & Laliberté, J.-F. (2015). Turnip mosaic virus Moves Systemically through Both Phloem and Xylem as Membrane-Associated Complexes. *Plant Physiology*, *167*(4), 1374–1388. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00097>
- Wang, A. (2015). Dissecting the Molecular Network of Virus-Plant Interactions: The Complex Roles of Host Factors. *Annual Review of Phytopathology*, *53*(1), 45–66. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120001>
- Wang, D., Amornsiripanitch, N., & Dong, X. (2006a). A Genomic Approach to Identify Regulatory Nodes in the Transcriptional Network of Systemic Acquired Resistance in Plants. *PLoS Pathogens*, *2*(11), e123. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020123>
- Wang, D., Weaver, N. D., Kesarwani, M., & Dong, X. (2005). Induction of Protein Secretory Pathway Is Required for Systemic Acquired Resistance. *Science*, *308*(5724), 1036–1040. <https://doi.org/10.1126/science.1108791>
- Wang, L., & Fobert, P. R. (2013a). Arabidopsis clade I TGA factors regulate apoplastic defences against the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* through endoplasmic reticulum-based processes. *PLoS One*, *8*(9), e77378. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077378>
- Wang, L., Tsuda, K., Sato, M., Cohen, J. D., Katagiri, F., & Glazebrook, J. (2009). Arabidopsis CaM Binding Protein CBP60g Contributes to MAMP-Induced SA Accumulation and Is Involved in Disease Resistance against *Pseudomonas syringae*. *PLoS Pathogens*, *5*(2), e1000301. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000301>
- Wang, W.-M., Ma, X.-F., Zhang, Y., Luo, M.-C., Wang, G.-L., Bellizzi, M., ... Xiao, S.-Y. (2012). PAPP2C Interacts with the Atypical Disease Resistance Protein RPW8.2 and Negatively

- Regulates Salicylic Acid-Dependent Defense Responses in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 5(5), 1125–1137. <https://doi.org/10.1093/mp/sss008>
- Wang, X., Goregaoker, S. P., & Culver, J. N. (2009). Interaction of the Tobacco mosaic virus replicase protein with a NAC domain transcription factor is associated with the suppression of systemic host defenses. *Journal of Virology*, 83(19), 9720–9730. <https://doi.org/10.1128/JVI.00941-09>
- Warde-Farley, D., Donaldson, S. L., Comes, O., Zuberi, K., Badrawi, R., Chao, P., ... Morris, Q. (2010). The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Research*, 38(suppl_2), W214–W220. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq537>
- Wasternack, C., & Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany*, 111(6), 1021–1058. <https://doi.org/10.1093/aob/mct067>
- Waterhouse, R. M., Tegenfeldt, F., Li, J., Zdobnov, E. M., & Kriventseva, E. V. (2013). OrthoDB: a hierarchical catalog of animal, fungal and bacterial orthologs. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D358-65. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1116>
- Weiss, D., & Ori, N. (2007). Mechanisms of Cross Talk between Gibberellin and Other Hormones. *PLANT PHYSIOLOGY*, 144(3), 1240–1246. <https://doi.org/10.1104/pp.107.100370>
- Wesley, S. V., Helliwell, C. A., Smith, N. A., Wang, M. B., Rouse, D. T., Liu, Q., ... Waterhouse, P. M. (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 27(6), 581–590. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11576441>
- Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G., & Ausubel, F. M. (2001). Erratum: Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414(6863), 562–565. <https://doi.org/10.1038/35107108>
- Willige, B. C., Ghosh, S., Nill, C., Zourelidou, M., Dohmann, E. M. N., Maier, A., & Schwechheimer, C. (2007). The DELLA Domain of GA INSENSITIVE Mediates the Interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A Gibberellin Receptor of Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE*, 19(4), 1209–1220. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.051441>
- Wu, L., Chen, H., Curtis, C., & Fu, Z. Q. (2014). Go in for the kill: How plants deploy effector-triggered immunity to combat pathogens. *Virulence*, 5(7), 710–721. <https://doi.org/10.4161/viru.29755>
- Wu, Y., Zhang, D., Chu, J. Y., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I. D., ... Després, C. (2012a). The Arabidopsis NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid. *Cell Reports*, 1(6), 639–647. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.008>
- Xu, H., Iwashiro, R., Li, T., & Harada, T. (2013). Long-distance transport of Gibberellic Acid Insensitive mRNA in *Nicotiana benthamiana*. *BMC Plant Biology*, 13(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-165>
- Xu, J., Meng, J., Meng, X., Zhao, Y., Liu, J., Sun, T., ... Zhang, S. (2016). Pathogen-Responsive MPK3 and MPK6 Reprogram the Biosynthesis of Indole Glucosinolates and Their Derivatives in Arabidopsis Immunity. *The Plant Cell*, 28(5), 1144–1162. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00871>
- Xu, Y., Ju, H.-J., DeBlasio, S., Carino, E. J., Johnson, R., MacCoss, M. J., ... Gray, S. M.

- (2018). A Stem-Loop Structure in Potato Leafroll Virus Open Reading Frame 5 (ORF5) Is Essential for Readthrough Translation of the Coat Protein ORF Stop Codon 700 Bases Upstream. *Journal of Virology*, 92(11), e01544-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01544-17>
- Yamanaka, T., Komatani, H., Meshi, T., Naito, S., Ishikawa, M., & Ohno, T. (1998). Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of tobacco mosaic virus strain Cg. *Virus Genes*, 16(2), 173–176. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9608662>
- Yang, B., Kang, Z., Dubcovsky, J., Cantu, D., Wang, X., & Li, K. (2016). A Conserved Puccinia striiformis Protein Interacts with Wheat NPR1 and Reduces Induction of Pathogenesis - Related Genes in Response to Pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(12), 977–989. <https://doi.org/10.1094/mpmi-10-16-0207-r>
- Yeh, S.-D., Cheng, H.-W., Hu, W.-C., Wu, H.-W., Poque, S., Wang, D., ... Yang, J.-Y. (2017). Potyviral Gene-Silencing Suppressor HCPro Interacts with Salicylic Acid (SA)-Binding Protein 3 to Weaken SA-Mediated Defense Responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(1), 86–100. <https://doi.org/10.1094/mpmi-06-17-0128-fi>
- Yilmaz, A., Mejia-Guerra, M. K., Kurz, K., Liang, X., Welch, L., & Grotewold, E. (2011). AGRIS: the Arabidopsis Gene Regulatory Information Server, an update. *Nucleic Acids Research*, 39(Database), D1118–D1122. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1120>
- Yu, D., Chen, C., & Chen, Z. (2001). Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. *The Plant Cell*, 13(7), 1527–1540. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11449049>
- Zhang, J., & Zhou, J.-M. (2010). Plant Immunity Triggered by Microbial Molecular Signatures. *Molecular Plant*, 3(5), 783–793. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq035>
- Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., Li, X., & Dong, X. (1999). Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(11), 6523–6528. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10339621>
- Zhang, Y., Tessaro, M. J., Lassner, M., & Li, X. (2003). Knockout Analysis of Arabidopsis Transcription Factors TGA2, TGA5, and TGA6 Reveals Their Redundant and Essential Roles in Systemic Acquired Resistance. *THE PLANT CELL ONLINE*, 15(11), 2647–2653. <https://doi.org/10.1105/tpc.014894>
- Zhang, Y., Xu, S., Ding, P., Wang, D., Cheng, Y. T., He, J., ... Zhang, Y. (2010). Control of salicylic acid synthesis and systemic acquired resistance by two members of a plant-specific family of transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(42), 18220–18225. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005225107>
- Zheng, X., Spivey, N. W., Zeng, W., Liu, P.-P., Fu, Z. Q., Klessig, D. F., ... Dong, X. (2012). Coronatine Promotes Pseudomonas syringae Virulence in Plants by Activating a Signaling Cascade that Inhibits Salicylic Acid Accumulation. *Cell Host & Microbe*, 11(6), 587–596. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.04.014>
- Zheng, Z., Qamar, S. A., Chen, Z., & Mengiste, T. (2006). Arabidopsis WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant Journal*, 48(4), 592–605. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02901.x>
- Zhou, J.-M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J., & Klessig, D. F. (2000). NPR1 Differentially Interacts with Members of the TGA/OBF Family of Transcription Factors That Bind an Element of the PR-1 Gene Required for Induction by Salicylic Acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(2), 191–202. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.2.191>
- Zhou, L., He, H., Liu, R., Han, Q., Shou, H., & Liu, B. (2014). Overexpression of GmAKT2

- potassium channel enhances resistance to soybean mosaic virus. *BMC Plant Biology*, 14, 154. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-154>
- Zhu, H., Li, G.-J., Ding, L., Cui, X., Berg, H., Assmann, S. M., & Xia, Y. (2009). Arabidopsis extra large G-protein 2 (XLG2) interacts with the Gbeta subunit of heterotrimeric G protein and functions in disease resistance. *Molecular Plant*, 2(3), 513–525. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp001>
- Zhu, S., Gao, F., Cao, X., Chen, M., Ye, G., Wei, C., & Li, Y. (2005). The Rice Dwarf Virus P2 Protein Interacts with ent-Kaurene Oxidases in Vivo, Leading to Reduced Biosynthesis of Gibberellins and Rice Dwarf Symptoms. *PLANT PHYSIOLOGY*, 139(4), 1935–1945. <https://doi.org/10.1104/pp.105.072306>
- Zipfel, C. (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(4), 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.06.003>
- Zuberi, K., Franz, M., Rodriguez, H., Montojo, J., Lopes, C. T., Bader, G. D., & Morris, Q. (2013). GeneMANIA Prediction Server 2013 Update. *Nucleic Acids Research*, 41(W1), W115–W122. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt533>
- Zvereva, A., & Pooggin, M. (2012). Silencing and Innate Immunity in Plant Defense Against Viral and Non-Viral Pathogens. *Viruses*, 4(11), 2578–2597. <https://doi.org/10.3390/v4112578>

ANEXO

Anexo A. Puesta a punto y estandarización del protocolo de RT-qPCR: información mínima requerida para la publicación de experimentos de RTqPCR (MIQE)

El empleo de las reglas MIQE (Bustin *et al.*, 2010) tiene objetivo asegurar que los protocolos de RT-qPCR sean presentados de manera detallada en la literatura para que puedan ser reproducidos por otros investigadores.

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

Muestras

- Tipo de muestra: hojas de Arabidopsis/ Nicotiana benthamiana/N.tabacum
- Procesamiento: Homogenización con nitrógeno líquido
- Condiciones de congelamiento: -80°C

Extracción de RNA

- Procedimiento Extracción: fenol-ácido
- Reactivos: TRIzol (Invitrogen®)
- Detalles del tratamiento con DNasa: DNase I Amp Grade (Invitrogen), 15 min a temperatura ambiente
- Determinación de contaminaciones: <3%
- Cuantificación de ácidos nucleicos: absorbancia a 260 nm
- Instrumento NanoDrop ND-1000; NanoDrop® Technologies
- Pureza (A260/ A 280): >1.8
- Integridad del RNA: análisis mediante electroforesis en geles de agarosa
- Transcripción reversa: condiciones De acuerdo a las instrucciones del fabricante Invitrogen
- Cantidad de RNA y volumen de reacción 20 µg de reacción.
- Oligonucleotidos utilizados: oligo d(T)20 de (Invitrogen®) y oligonucleótidos al azar.
- Transcriptasa reversa: MMLVI (Invitrogen®).
- Temperatura y tiempo: 50 min a 37°C, luego 15 min a 70°C

Protocolo para RT-qPCR

- Condiciones para la reacción: 5 min a 95 °C, 40 ciclos de 30 seg a 95°C y 1 min 60°C
- Volumen de reacción y cantidad de cDNA: 20µl de reacción, 20-200 ng de ARN Primers, Mg²⁺ y concentración de dNTPs: 3 mM Mg²⁺, 200 nM oligos, 0,2 mM de dNTPs

- Polymerasa: *Taq Platinum* (Invitrogen ®)
- *Buffer*: 20 mM Tris-HCL (pH 8,4) y 50 mM KCl
- Fabricante del equipo de qPCR: StepOnePlus Real-Time - Applied Biosystems™

Validación de Qpcr

- Especificidad: análisis mediante geles de agarosa y curvas de disociación en cada corrida de qPCR
- Método para determinación de eficiencia de las PCRs
- Eficiencia media por amplicón calculada mediante el programa LingRegPCR (Ramakers *et al*, 2003).

Análisis de datos

- Programa para análisis de qPCR: LinRegPCR
- Método para determinación de Ct: LinRegPCR
- Identificación de datos espúreos: LinRegPCR
- Criterios de selección de genes de referencia: Se seleccionó como control interno UBQ5 en los ensayos de *Arabidopsis* (Tesis Rodríguez, 2015) y ACTINA en los ensayos de *Nicotiana* (Tesis Conti, 2012)
- Descripción de método de normalización: Pfaffl, 2001

$$R = \frac{E_{target}^{(control Ct mean - sample Ct mean)_{target}}}{E_{reference}^{(control Ct mean - sample Ct mean)_{reference}}}$$

Implementado mediante la interface multivariada fgStatistics

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

Anexo B. Lista de genes coexpresados obtenida por medio del *GeneMania* que presentan en sus regiones promotoras el motivo de unión a los factores de transcripción TGA o/y WRKY. Los sitios fueron predichos con el programa *AthMap*

Genes	Identificador (Id)	Motivo de unión a TGAs	Motivo de unión a WRKYs
WRKY33	AT2G38470	si	si
MPK3	AT3G45640	no	si
SOBIR1	AT2G31880	si	si
CBP60G	AT5G26920	si	si
EDA39	AT4G33050	no	si
MYB51	AT1G18570	si	no
ATL2	AT3G16720	si	si
WRKY25	AT2G30250	si	si
SYP122	AT3G52400	si	si
ERF104	AT5G61600	si	no
ADR1-L2	AT5G04720	si	si
AT5G18470	AT5G18470	no	si
AT4G08850	AT4G08850	no	no
IQM4	AT2G26190	si	si
SZF1	AT3G55980	si	si
RPP13L4	AT3G50950	si	si
AT3G46600	AT3G46600	si	no
KIC	AT2G46600	si	no
WRKY53	AT4G23810	no	si
AT5G59550	AT5G59550	si	si
XBAT34	AT4G14365	no	si
AR781	AT2G26530	no	si
ZAT10	AT1G27730	si	si
CML45	AT5G39670	no	si
WRKY70	AT3G56400	si	no
BCS1	AT3G50930	si	si
CRK11	AT4G23190	si	si
WRKY40	AT1G80840	si	si
CPK28	AT5G66210	no	no
NHL3	AT5G06320	si	si
AT1G10340	AT1G10340	si	si
GATL10	AT3G28340	no	si
AT1G19020	AT1G19020	no	si
AT2G32030	AT2G32030	no	si
LRK10L3	AT5G38210	no	no
NSL1	AT1G28380	no	si
AT4G34150	AT4G34150	si	si
AT2G18690	AT2G18690	si	si
AT1G11050	AT1G11050	si	si
AT1G05575	AT1G05575	si	si
AT5G25930	AT5G25930	si	si
WRKY46	AT2G46400	si	si
AT2G41640	AT2G41640	si	si
AT5G52750	AT5G52750	si	si

CRK14	AT4G23220	si	si
AT1G55450	AT1G55450	si	si
AT2G40270	AT2G40270	si	si
MYB15	AT3G23250	si	si
ERF5	AT5G47230	si	si
AT4G29780	AT4G29780	si	si
PAD4	AT3G52430	no	no
CPK32	AT3G57530	no	si
PUB24	AT3G11840	no	si
ERF6	AT4G17490	no	si
AT1G24140	AT1G24140	no	si
AT1G70520	AT1G70520	si	si
PUB23	AT2G35930	si	no
CYP81F2	AT5G57220	no	si
NAK	AT5G02290	si	si
CZF1	AT2G40140	si	si
TET8	AT2G23810	no	si
PUP14	AT1G19770	si	si
AT2G39210	AT2G39210	no	si
ERF105	AT5G51190	no	si
AT5G42050	AT5G42050	no	no
ATL31	AT5G27420	si	no
WRKY30	AT5G24110	no	si
AT5G35735	AT5G35735	si	si
CRK19	AT4G23270	si	si
AT2G22880	AT2G22880	no	si
CRK10	AT4G23180	si	si
AT3G59080	AT3G59080	no	si
AT4G38550	AT4G38550	no	si
AT1G16670	AT1G16670	si	si
AT4G36500	AT4G36500	si	no
ERF2	AT5G47220	si	si
LYK5	AT2G33580	si	si
VQ10	AT1G78410	si	no
AT3G10930	AT3G10930	no	no
BAP1	AT3G61190	no	no
XLG2	AT4G34390	si	si
ZAT11	AT2G37430	no	si
AT1G27770	AT1G27770	no	si
4CLL5	AT1G20510	si	no
AT1G21120	AT1G21120	no	no
AT5G52760	AT5G52760	no	no
WRKY54	AT2G40750	no	si
LECRK42	AT3G53810	no	si
SCL31	AT1G07520	si	si
RAV2	AT1G68840	si	si
MKS1	AT3G18690	si	si
CML47	AT3G47480	no	no
AT4G11000	AT4G11000	no	si
PAPP2C	AT1G22280	no	si
AT4G36150	AT4G36150	no	si
AT5G39020	AT5G39020	no	si

NPR3	AT5G45110	si	no
AT1G43910	AT1G43910	si	si
AT3G56880	AT3G56880	si	no
pEARLI4	AT2G20960	no	si
AT1G56060	AT1G56060	si	si
AT5G46780	AT5G46780	no	no
AT1G49050	AT1G49050	no	si
ATEXO70E2	AT5G61010	no	si
AT3G54150	AT3G54150	no	no
GA2OX6	AT1G02400	no	no
BIK1	AT2G39660	si	si
AT1G18390	AT1G18390	no	no
EXO70B1	AT5G58430	si	si
AT1G07135	AT1G07135	no	si
LHT1	AT5G40780	no	no
AT4G23610	AT4G23610	no	si
LPAT4	AT1G75020	no	no
AT1G71697	AT1G71697	si	si
HSFA4A	AT4G18880	si	si
AT1G17145	AT1G17145	si	no
AT1G27100	AT1G27100	si	no
JUB1	AT2G43000	no	si
GA2OX2	AT1G30040	si	no
WRKY6	AT1G62300	si	si

Anexo C. Ensayos realizados para evaluar el movimiento sistémico del virus TMV Δ CP-GFP frente a las distintas condiciones experimentales.

En todos los casos se cuantificó el número de plantas con presencia de GFP en los tejidos sistémicos (movimiento sistémico del virus TMV Δ CP-GFP). Se indica el número total de plantas utilizadas en cada ensayo para cada uno de los tratamientos.

Tratamiento con CP en *cis* o en *trans*, e infección con TMV Δ CP-GFP

Ensayo 1: 20 plantas por tratamiento			Ensayo 2: 20 plantas por tratamiento		
7 dpi			7 dpi		
Tratamientos	Variable medida	Frecuencias	Tratamientos	Variable medida	Frecuencias
GV3101	Movimiento	2	GV3101	Movimiento	3
GV3101	No Movimiento	18	GV3101	No Movimiento	17
CP TMV-trans	Movimiento	4	CP TMV-trans	Movimiento	8
CP TMV-trans	No Movimiento	16	CP TMV-trans	No Movimiento	12
CP TMV-cis	Movimiento	10	CP TMV-cis	Movimiento	11
CP TMV-cis	No Movimiento	10	CP TMV-cis	No Movimiento	9
8 dpi			8 dpi		
Tratamientos	Variable medida	Frecuencias	Tratamientos	Variable medida	Frecuencias
GV3101	Movimiento	4	GV3101	Movimiento	4
GV3101	No Movimiento	16	GV3101	No Movimiento	16
CP TMV-trans	Movimiento	12	CP TMV-trans	Movimiento	10
CP TMV-trans	No Movimiento	8	CP TMV-trans	No Movimiento	10
CP TMV-cis	Movimiento	16	CP TMV-cis	Movimiento	15
CP TMV-cis	No Movimiento	4	CP TMV-cis	No Movimiento	5
12 dpi			12 dpi		
Tratamientos	Variable medida	Frecuencias	Tratamientos	Variable medida	Frecuencias
GV3101	Movimiento	5	GV3101	Movimiento	5
GV3101	No Movimiento	15	GV3101	No Movimiento	15
CP TMV-trans	Movimiento	14	CP TMV-trans	Movimiento	15
CP TMV-trans	No Movimiento	6	CP TMV-trans	No Movimiento	5
CP TMV-cis	Movimiento	18	CP TMV-cis	Movimiento	19
CP TMV-cis	No Movimiento	2	CP TMV-cis	No Movimiento	1

Tratamiento con GAI y M5 e infección con TMV Δ CP-GFP

Ensayo 1: 20 plantas por tratamiento			Ensayo 2: 20 plantas por tratamiento		
7 dpi			7 dpi		
Tratamientos	Variable medida	Frecuencias	Tratamientos	Variable medida	Frecuencias
GV3101- Δ CP-GFP	movimiento	1	GV3101- Δ CP-GFP	movimiento	1
GV3101- Δ CP-GFP	no movimiento	19	GV3101- Δ CP-GFP	no movimiento	19
GAI- Δ CP-GFP	movimiento	10	GAI- Δ CP-GFP	movimiento	11
GAI- Δ CP-GFP	no movimiento	10	GAI- Δ CP-GFP	no movimiento	9
M5- Δ CP-GFP	movimiento	11	M5- Δ CP-GFP	movimiento	11
M5- Δ CP-GFP	no movimiento	9	M5- Δ CP-GFP	no movimiento	9
16 dpi			16 dpi		
Tratamientos	Variable medida	Frecuencias	Tratamientos	Variable medida	Frecuencias
GV3101- Δ CP-GFP	movimiento	7	GV3101- Δ CP-GFP	movimiento	6
GV3101- Δ CP-GFP	no movimiento	13	GV3101- Δ CP-GFP	no movimiento	14
GAI- Δ CP-GFP	movimiento	18	GAI- Δ CP-GFP	movimiento	19
GAI- Δ CP-GFP	no movimiento	2	GAI- Δ CP-GFP	no movimiento	1
M5- Δ CP-GFP	movimiento	18	M5- Δ CP-GFP	movimiento	18
M5- Δ CP-GFP	no movimiento	2	M5- Δ CP-GFP	no movimiento	2

Tratamiento con PAC e infección con TMVΔCP-GFP

Ensayo 1: 20 plantas por tratamiento			Ensayo 2: 20 plantas por tratamiento		
7 dpi			7 dpi		
Tratamientos	Variable medida	Frecuencias	Tratamientos	Variable medida	Frecuencias
No tratadas-ΔCPGFP	Movimiento	2	No tratadas-ΔCPGFP	movimiento	3
No tratadas-ΔCPGFP	No Movimiento	18	No tratadas-ΔCPGFP	no movimiento	17
Tratadas-ΔCPGFP	Movimiento	12	Tratadas-ΔCPGFP	movimiento	12
Tratadas-ΔCPGFP	No Movimiento	8	Tratadas-ΔCPGFP	no movimiento	8
16 días			12 días		
Tratamientos	Variable medida	Frecuencia	Tratamientos	Variable medida	Frecuencia
No tratadas-ΔCPGFP	Movimiento	4	No tratadas-ΔCPGFP	movimiento	5
No tratadas-ΔCPGFP	No Movimiento	16	No tratadas-ΔCPGFP	no movimiento	15
Tratadas-ΔCPGFP	Movimiento	18	Tratadas-ΔCPGFP	movimiento	18
Tratadas-ΔCPGFP	No Movimiento	2	Tratadas-ΔCPGFP	no movimiento	2

Tratamiento con *hp-NbNPR1* e infección con TMVΔCP-GFP:

Ensayo 1: 16 plantas por tratamiento			Ensayo 2: 16 plantas por tratamiento			Ensayo 3: 20 plantas por tratamiento			Ensayo 4: 12 plantas por tratamiento		
7 dpi											
Tratamientos	Variable medida	Frecuencias									
<i>hp-GUS</i>	movimiento	0	<i>hp-GUS</i>	movimiento	2	<i>hp-GUS</i>	movimiento	0	<i>hp-GUS</i>	movimiento	2
<i>hp-GUS</i>	no movimiento	16	<i>hp-GUS</i>	no movimiento	14	<i>hp-GUS</i>	no movimiento	20	<i>hp-GUS</i>	no movimiento	10
<i>hp-NbNPR1</i>	movimiento	8	<i>hp-NbNPR1</i>	movimiento	10	<i>hp-NbNP</i>	movimiento	10	<i>hp-NbNP</i>	movimiento	6
<i>hp-NbNPR1</i>	no movimiento	8	<i>hp-NbNPR1</i>	no movimiento	6	<i>hp-NbNP</i>	no movimiento	10	<i>hp-NbNP</i>	no movimiento	4
12 dpi			12 dpi			12 dpi			12 dpi		
Tratamientos	Variable medida	Frecuencias									
<i>hp-GUS</i>	movimiento	0	<i>hp-GUS</i>	movimiento	3	<i>hp-GUS</i>	movimiento	2	<i>hp-GUS</i>	movimiento	4
<i>hp-GUS</i>	no movimiento	16	<i>hp-GUS</i>	no movimiento	13	<i>hp-GUS</i>	no movimiento	18	<i>hp-GUS</i>	no movimiento	8
<i>hp-NbNPR1</i>	movimiento	13	<i>hp-NbNPR1</i>	movimiento	15	<i>hp-NbNP</i>	movimiento	18	<i>hp-NbNP</i>	movimiento	9
<i>hp-NbNPR1</i>	no movimiento	3	<i>hp-NbNPR1</i>	no movimiento	1	<i>hp-NbNP</i>	no movimiento	20	<i>hp-NbNP</i>	no movimiento	3

Tratamiento con *hp-NtTGA10* e infección con TMVΔCP-GFP:

Ensayo 1: 12 plantas por tratamiento			Ensayo 2: 12 plantas por tratamiento			Ensayo 3: 10 plantas por tratamiento		
7 dpi			7 dpi			7 dpi		
Tratamientos	Variable medida	Frecuencias	Tratamientos	Variable medida	Frecuencias	Tratamientos	Variable medida	Frecuencias
<i>hp-GUS</i>	movimiento	2	<i>hp-GUS</i>	movimiento	0	<i>hp-GUS</i>	movimiento	2
<i>hp-GUS</i>	no movimiento	10	<i>hp-GUS</i>	no movimiento	12	<i>hp-GUS</i>	no movimiento	8
<i>hp-NITGA10</i>	movimiento	5	<i>hp-NITGA10</i>	movimiento	6	<i>hp-NITGA10</i>	movimiento	5
<i>hp-NITGA10</i>	no movimiento	7	<i>hp-NITGA10</i>	no movimiento	6	<i>hp-NITGA10</i>	no movimiento	5
12 dpi			12 dpi			tiempo 12		
Tratamientos	Variable medida	Frecuencias	Tratamientos	Variable medida	Frecuencias	Tratamientos	Variable medida	Frecuencias
<i>hp-GUS</i>	movimiento	3	<i>hp-GUS</i>	movimiento	4	<i>hp-GUS</i>	movimiento	3
<i>hp-GUS</i>	no movimiento	9	<i>hp-GUS</i>	no movimiento	8	<i>hp-GUS</i>	no movimiento	7
<i>hp-NITGA10</i>	movimiento	10	<i>hp-NITGA10</i>	movimiento	12	<i>hp-NITGA10</i>	movimiento	9
<i>hp-NITGA10</i>	no movimiento	2	<i>hp-NITGA10</i>	no movimiento	0	<i>hp-NITGA10</i>	no movimiento	1
Ensayo 4: 20 plantas por tratamiento			Ensayo 5: 20 plantas por tratamiento			Ensayo 6: 10 plantas por tratamiento		
7 dpi			7 dpi			7 dpi		
Tratamientos	Variable medida	Frecuencias	Tratamientos	Variable medida	Frecuencias	Tratamientos	Variable medida	Frecuencias
<i>hp-GUS</i>	movimiento	4	<i>hp-GUS</i>	movimiento	2	<i>hp-GUS</i>	movimiento	2
<i>hp-GUS</i>	no movimiento	16	<i>hp-GUS</i>	no movimiento	18	<i>hp-GUS</i>	no movimiento	8
<i>hp-NITGA10</i>	movimiento	12	<i>hp-NITGA10</i>	movimiento	11	<i>hp-NITGA10</i>	movimiento	6
<i>hp-NITGA10</i>	no movimiento	8	<i>hp-NITGA10</i>	no movimiento	9	<i>hp-NITGA10</i>	no movimiento	4
12 dpi			12 dpi			12 dpi		
Tratamientos	Variable medida	Frecuencias	Tratamientos	Variable medida	Frecuencias	Tratamientos	Variable medida	Frecuencias
<i>hp-GUS</i>	movimiento	4	<i>hp-GUS</i>	movimiento	4	<i>hp-GUS</i>	movimiento	2
<i>hp-GUS</i>	no movimiento	12	<i>hp-GUS</i>	no movimiento	16	<i>hp-GUS</i>	no movimiento	8
<i>hp-NITGA10</i>	movimiento	16	<i>hp-NITGA10</i>	movimiento	18	<i>hp-NITGA10</i>	movimiento	8
<i>hp-NITGA10</i>	no movimiento	0	<i>hp-NITGA10</i>	no movimiento	2	<i>hp-NITGA10</i>	no movimiento	2

Infección con TMVΔCP-GFP en plantas *N.benthamiana* NahG

Ensayo 1: 25 plantas por tratamiento			Ensayo 2: 12 plantas por tratamiento		
7 dpi			7 dpi		
Tratamientos	Variable medida	Frecuencias	Tratamientos	Variable medida	Frecuencias
WT-ΔCPGFP	movimiento	0	WT-ΔCPGFP	movimiento	1
WT-ΔCPGFP	no movimiento	25	WT-ΔCPGFP	no movimiento	11
Nahg-ΔCPGFP	movimiento	13	Nahg-ΔCPGFP	movimiento	9
Nahg-ΔCPGFP	no movimiento	12	Nahg-ΔCPGFP	no movimiento	3
12 dpi			12 dpi		
Tratamientos	Variable medida	Frecuencias	Tratamientos	Variable medida	Frecuencias
WT-ΔCPGFP	movimiento	5	WT-ΔCPGFP	movimiento	2
WT-ΔCPGFP	no movimiento	20	WT-ΔCPGFP	no movimiento	10
Nahg-ΔCPGFP	movimiento	17	Nahg-ΔCPGFP	movimiento	9
Nahg-ΔCPGFP	no movimiento	10	Nahg-ΔCPGFP	no movimiento	3

Infección con TMVΔCP-GFP en plantas *N.tabacum* NahG

Ensayo 1: 20 plantas por tratamiento			Ensayo 2: 20 plantas por tratamiento		
7 dpi			7 dpi		
WT-ΔCPGFP	movimiento	0	WT-ΔCPGFP	movimiento	0
WT-ΔCPGFP	no movimiento	25	WT-ΔCPGFP	no movimiento	20
Nahg-ΔCPGFP	movimiento	4	Nahg-ΔCPGFP	movimiento	4
Nahg-ΔCPGFP	no movimiento	16	Nahg-ΔCPGFP	no movimiento	16
12 dpi			12 dpi		
WT-ΔCPGFP	movimiento	1	WT-ΔCPGFP	movimiento	0
WT-ΔCPGFP	no movimiento	19	WT-ΔCPGFP	no movimiento	20
Nahg-ΔCPGFP	movimiento	5	Nahg-ΔCPGFP	movimiento	4
Nahg-ΔCPGFP	no movimiento	15	Nahg-ΔCPGFP	no movimiento	16

Tratamiento con *hp-NbEDS1* e infección con TMVΔCP-GFP:

Ensayo 1: 20 plantas por tratamiento			Ensayo 2: 20 plantas por tratamiento			Ensayo 3: 12 plantas por tratamiento		
7 dpi			7 dpi			7 dpi		
Tratamientos	Variable medida	Frecuencias	Tratamientos	Variable medida	Frecuencias	Tratamientos	Variable medida	Frecuencias
<i>hp-GUS</i>	movimiento	4	<i>hp-GUS</i>	movimiento	0	<i>hp-GUS</i>	movimiento	2
<i>hp-GUS</i>	no movimiento	16	<i>hp-GUS</i>	no movimiento	20	<i>hp-GUS</i>	no movimiento	10
<i>hp-NbEDS1</i>	movimiento	4	<i>hp-NbEDS1</i>	movimiento	4	<i>hp-NbEDS1</i>	movimiento	4
<i>hp-NbEDS1</i>	no movimiento	16	<i>hp-NbEDS1</i>	no movimiento	16	<i>hp-NbEDS1</i>	no movimiento	8
12 dpi			12 dpi			12 dpi		
Tratamientos	Variable medida	Frecuencias	Tratamientos	Variable medida	Frecuencias	Tratamientos	Variable medida	Frecuencias
<i>hp-GUS</i>	movimiento	4	<i>hp-GUS</i>	movimiento	2	<i>hp-GUS</i>	movimiento	4
<i>hp-GUS</i>	no movimiento	12	<i>hp-GUS</i>	no movimiento	18	<i>hp-GUS</i>	no movimiento	8
<i>hp-NbEDS1</i>	movimiento	8	<i>hp-NbEDS1</i>	movimiento	10	<i>hp-NbEDS1</i>	movimiento	6
<i>hp-NbEDS1</i>	no movimiento	8	<i>hp-NbEDS1</i>	no movimiento	10	<i>hp-NbEDS1</i>	no movimiento	4

Tratamiento con *hp-NbRAR1* e infección con TMVΔCP-GFP:

Ensayo 1: 10 plantas por tratamiento			Ensayo 2: 12 plantas por tratamiento		
7 dpi			7 dpi		
Tratamientos	Variable medida	Frecuencias	Tratamientos	Variable medida	Frecuencias
<i>hp-GUS</i>	Movimiento	1	<i>hp-GUS</i>	movimiento	0
<i>hp-GUS</i>	No Movimiento	9	<i>hp-GUS</i>	no movimiento	12
<i>hp-NbRAR1</i>	Movimiento	0	<i>hp-NbRAR1</i>	movimiento	0
<i>hp-NbRAR1</i>	No Movimiento	10	<i>hp-NbRAR1</i>	no movimiento	12
12 días			12 días		
Tratamientos	Variable medida	Frecuencia	Tratamientos	Variable medida	Frecuencia
<i>hp-GUS</i>	Movimiento	2	<i>hp-GUS</i>	movimiento	4
<i>hp-GUS</i>	No Movimiento	8	<i>hp-GUS</i>	no movimiento	8
<i>hp-NbRAR1</i>	Movimiento	2	<i>hp-NbRAR1</i>	movimiento	4
<i>hp-NbRAR1</i>	No Movimiento	8	<i>hp-NbRAR1</i>	no movimiento	8

Tratamiento con *hp-CNI1-LIKE* e infección con TMVΔCP-GFP:

Ensayo 1: 20 plantas por tratamiento			Ensayo 2: 12 plantas por tratamiento			Ensayo 3: 20 plantas por tratamiento			Ensayo 4: 10 plantas por tratamiento		
7 dpi											
Tratamientos	Variable medida	Frecuencias									
<i>hp-GUS</i>	movimiento	0	<i>hp-GUS</i>	movimiento	2	<i>hp-GUS</i>	movimiento	2	<i>hp-GUS</i>	movimiento	2
<i>hp-GUS</i>	no movimiento	20	<i>hp-GUS</i>	no movimie	10	<i>hp-GUS</i>	no movimie	18	<i>hp-GUS</i>	no movimie	2
<i>hp-CNI1-LIKE</i>	movimiento	8	<i>hp-CNI1-LIKE</i>	movimiento	4	<i>hp-CNI1-LIKE</i>	movimiento	7	<i>hp-CNI1-LIKE</i>	movimiento	8
<i>hp-CNI1-LIKE</i>	no movimiento	12	<i>hp-CNI1-LIKE</i>	no movimie	8	<i>hp-CNI1-LIKE</i>	no movimie	15	<i>hp-CNI1-LIKE</i>	no movimie	3
12 dpi			12 dpi			12 dpi			12 dpi		
Tratamientos	Variable medida	Frecuencias									
<i>hp-GUS</i>	movimiento	2	<i>hp-GUS</i>	movimiento	3	<i>hp-GUS</i>	movimiento	4	<i>hp-GUS</i>	movimiento	2
<i>hp-GUS</i>	no movimiento	18	<i>hp-GUS</i>	no movimie	8	<i>hp-GUS</i>	no movimie	16	<i>hp-GUS</i>	no movimie	2
<i>hp-CNI1-LIKE</i>	movimiento	8	<i>hp-CNI1-LIKE</i>	movimiento	6	<i>hp-CNI1-LIKE</i>	movimiento	13	<i>hp-CNI1-LIKE</i>	movimiento	8
<i>hp-CNI1-LIKE</i>	no movimiento	12	<i>hp-CNI1-LIKE</i>	no movimie	4	<i>hp-CNI1-LIKE</i>	no movimie	7	<i>hp-CNI1-LIKE</i>	no movimie	6

Tratamiento con *hp-ERF6-LIKE* e infección con TMVΔCP-GFP:

Ensayo 1: 20 plantas por tratamiento			Ensayo 2: 12 plantas por tratamiento			Ensayo 3: 20 plantas por tratamiento			Ensayo 4: 10 plantas por tratamiento		
7 dpi											
Tratamientos	Variable medida	Frecuencias									
<i>hp-GUS</i>	movimiento	0	<i>hp-GUS</i>	movimiento	2	<i>hp-GUS</i>	movimiento	2	<i>hp-GUS</i>	movimiento	2
<i>hp-GUS</i>	no movimie	20	<i>hp-GUS</i>	no movimie	10	<i>hp-GUS</i>	no movimie	18	<i>hp-GUS</i>	no movimie	8
<i>hp-ERF6-LIKE</i>	movimiento	0	<i>hp-ERF6-LIKE</i>	movimiento	2	<i>hp-ERF6-LIKE</i>	movimiento	2	<i>hp-ERF6-LIKE</i>	movimiento	2
<i>hp-ERF6-LIKE</i>	no movimie	20	<i>hp-ERF6-LIKE</i>	no movimie	10	<i>hp-ERF6-LIKE</i>	no movimie	18	<i>hp-ERF6-LIKE</i>	no movimie	8
12 dpi			12 dpi			12 dpi			12 dpi		
Tratamientos	Variable medida	Frecuencias									
<i>hp-GUS</i>	movimiento	2	<i>hp-GUS</i>	movimiento	4	<i>hp-GUS</i>	movimiento	4	<i>hp-GUS</i>	movimiento	2
<i>hp-GUS</i>	no movimie	18	<i>hp-GUS</i>	no movimie	8	<i>hp-GUS</i>	no movimie	16	<i>hp-GUS</i>	no movimie	8
<i>hp-ERF6-LIKE</i>	movimiento	0	<i>hp-ERF6-LIKE</i>	movimiento	3	<i>hp-ERF6-LIKE</i>	movimiento	2	<i>hp-ERF6-LIKE</i>	movimiento	2
<i>hp-ERF6-LIKE</i>	no movimie	20	<i>hp-ERF6-LIKE</i>	no movimie	7	<i>hp-ERF6-LIKE</i>	no movimie	18	<i>hp-ERF6-LIKE</i>	no movimie	8

Tratamiento con *hp-NbWRKY8* e infección con TMVΔCP-GFP:

Ensayo 1: 12 plantas por tratamiento			Ensayo 2: 12 plantas por tratamiento			Ensayo 3: 20 plantas por tratamiento			Ensayo 4: 10 plantas por tratamiento		
7 dpi											
Tratamientos	Variable medida	Frecuencias									
<i>hp-GUS</i>	movimiento	2	<i>hp-NbWRKY8</i>	movimiento	2	<i>hp-GUS</i>	movimiento	2	<i>hp-GUS</i>	movimiento	2
<i>hp-GUS</i>	no movimiento	10	<i>hp-NbWRKY8</i>	no movimiento	10	<i>hp-GUS</i>	no movimiento	18	<i>hp-GUS</i>	no movimiento	8
<i>hp-NbWRKY8</i>	movimiento	4	<i>hp-GUS</i>	movimiento	0	<i>hp-NbWRKY8</i>	movimiento	6	<i>hp-NbWRKY8</i>	movimiento	3
<i>hp-NbWRKY8</i>	no movimiento	8	<i>hp-GUS</i>	no movimiento	12	<i>hp-NbWRKY8</i>	no movimiento	14	<i>hp-NbWRKY8</i>	no movimiento	7
12 dpi			12 dpi			12 dpi			12 dpi		
<i>hp-GUS</i>	movimiento	3	<i>hp-GUS</i>	movimiento	4	<i>hp-GUS</i>	movimiento	4	<i>hp-GUS</i>	movimiento	2
<i>hp-GUS</i>	no movimiento	9	<i>hp-GUS</i>	no movimiento	8	<i>hp-GUS</i>	no movimiento	16	<i>hp-GUS</i>	no movimiento	8
<i>hp-NbWRKY8</i>	movimiento	6	<i>hp-NbWRKY8</i>	movimiento	7	<i>hp-NbWRKY8</i>	movimiento	11	<i>hp-NbWRKY8</i>	movimiento	4
<i>hp-NbWRKY8</i>	no movimiento	6	<i>hp-NbWRKY8</i>	no movimiento	5	<i>hp-NbWRKY8</i>	no movimiento	9	<i>hp-NbWRKY8</i>	no movimiento	6

Tratamiento con CP de TMV o CP de CLRV, e infección con TMVΔCP-GFP

Ensayo 1: 20 plantas por tratamiento			Ensayo 2: 20 plantas por tratamiento		
7 dpi			7 dpi		
Tratamientos	Variable medida	Frecuencias	Tratamientos	Variable medida	Frecuencias
GV3101	Movimiento	2	GV3101	Movimiento	3
GV3101	No Movimiento	18	GV3101	No Movimiento	17
CP TMV-trans	Movimiento	4	CP TMV-trans	Movimiento	8
CP TMV-trans	No Movimiento	16	CP TMV-trans	No Movimiento	12
CP CLRV-trans	Movimiento	2	CP CLRV-trans	Movimiento	3
CP CLRV-trans	No Movimiento	18	CP CLRV-trans	No Movimiento	17
8 dpi			8 dpi		
GV3101	Movimiento	4	GV3101	Movimiento	4
GV3101	No Movimiento	16	GV3101	No Movimiento	16
CP TMV-trans	Movimiento	12	CP TMV-trans	Movimiento	10
CP TMV-trans	No Movimiento	8	CP TMV-trans	No Movimiento	10
CP CLRV-trans	Movimiento	4	CP CLRV-trans	Movimiento	6
CP CLRV-trans	No Movimiento	16	CP CLRV-trans	No Movimiento	14
10 dpi			10 dpi		
GV3101	Movimiento	4	GV3101	Movimiento	5
GV3101	No Movimiento	16	GV3101	No Movimiento	15
CP TMV-trans	Movimiento	14	CP TMV-trans	Movimiento	15
CP TMV-trans	No Movimiento	6	CP TMV-trans	No Movimiento	5
CP TMV-cis	Movimiento	8	CP CLRV-trans	Movimiento	10
CP TMV-cis	No Movimiento	12	CP CLRV-trans	No Movimiento	10
12 dpi			12 dpi		
GV3101	Movimiento	5	GV3101	Movimiento	5
GV3101	No Movimiento	15	GV3101	No Movimiento	15
CP TMV-trans	Movimiento	14	CP TMV-trans	Movimiento	15
CP TMV-trans	No Movimiento	6	CP TMV-trans	No Movimiento	5
CP CLRV-trans	Movimiento	10	CP CLRV-trans	Movimiento	10
CP CLRV-trans	No Movimiento	10	CP CLRV-trans	No Movimiento	10

