



ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN Y EFECTO SINÉRGICO DE LA PROTEÍNA SUPRESORA DE SILENCIAMIENTO p22 DEL CRINIVIRUS *Tomato chlorosis virus*

Yazmín Landeo Ríos

**Directores: Dra. M. Carmen Cañizares
Prof. Enrique Moriones**



**Universidad de Málaga
2016**



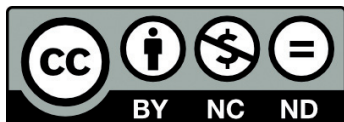


UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Yazmín Mónica Landeo Ríos

 <http://orcid.org/0000-0001-5391-7005>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOTECNOLOGÍA AVANZADA

Tesis Doctoral

**Estudio del mecanismo de acción y efecto sinérgico de la proteína
supresora de silenciamiento p22 del crinivirus *Tomato chlorosis virus***

Memoria de Tesis Doctoral presentada por la Licenciada en Agricultura

Yazmín Mónica Landeo Ríos

para otorgar al grado de

Doctora en Biología por la Universidad de Málaga

Directores:

Dra. M^a Carmen Cañizares Nolasco

Prof. Inv. Enrique Moriones Alonso

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”

(IHSM-UMA-CSIC)

Málaga, Noviembre de 2015



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora"
29750 Algarrobo-Costa, Málaga (SPAIN)
Tel/ (+34)952548990 (ext. 132); Fax (+34)952552677
email: moriones@eelm.csic.es

[http:// www.eelm.csic.es](http://www.eelm.csic.es)

Doña **M. CARMEN CAÑIZARES NOLASCO**, Doctora en Ciencias Biológicas, Investigadora Postdoctoral del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas).

Don **ENRIQUE MORIONES ALONSO**, Doctor Ingeniero Agrónomo, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas).

CERTIFICAN: que Doña Yasmín Mónica Landeo Ríos, Licenciada en Agricultura, ha realizado en el Laboratorio de Virología del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), bajo su dirección, el trabajo que con título "Estudio del mecanismo de acción y efecto sinérgico de la proteína supresora de silenciamiento p22 del crinivirus *Tomato chlorosis virus*" presenta para optar al grado de Doctora en Biología.

Y que para que así conste y produzca los efectos oportunos donde proceda, firman el presente certificado en Algarrobo-Costa (Málaga) a 13 de noviembre de 2015.

Fdo. Dra. M. Carmen Cañizares Nolasco

Fdo. Prof. Inv. Enrique Moriones Alonso



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Doña **CARMEN BEUZÓN LÓPEZ**, Profesora titular de genética del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga,

RATIFICA: que Doña Yazmín Mónica Landeo Ríos ha realizado en el Laboratorio de Virología del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM-UMA-CSIC), el trabajo que con título “Estudio del mecanismo de acción y efecto sinérgico de la proteína supresora de silenciamiento p22 del crinivirus *Tomato chlorosis virus*” presenta para optar al grado de Doctora en Biología.

Y que para que así conste y produzca los efectos oportunos donde proceda, firman el presente certificado en Algarrobo-Costa (Málaga) a 13 de noviembre de 2015.

Fdo. Dra. Carmen Beuzón López



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Este trabajo se ha llevado a cabo en el Laboratorio de Virología del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (Universidad de Málaga – Consejo Superior de Investigaciones Científicas, IHSM-UMA-CSIC) gracias a una beca predoctoral MAEC/AECID del Ministerios de Asuntos Exteriores y de Cooperación de España, asociada al proyecto AGL2010-22287-C02-01/AGR y AGL2013-48913-C2-1-R del Ministerio de Economía y Competitividad de España, co-financiado por FEDER-FSE.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral se incluyen en los siguientes artículos publicados en revistas científicas recogidas en el **SCI**:

Landeo-Ríos, Y.M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Cañizares, M.C., 2015. Genetic diversity and silencing suppression activity of the p22 protein of *Tomato chlorosis virus* isolates from tomato and sweet pepper. *Virus Genes* 51: 283-289.

Landeo-Ríos, Y.M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Cañizares, M.C., 2016. The p22 RNA silencing suppressor of the crinivirus *Tomato chlorosis virus* preferentially binds long dsRNA preventing them from cleavage. *Virology* 488: 129-136.

Y presentados en las reuniones científicas:

XVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología, Málaga, 2012.

XII Congreso Nacional de Virología, Burgos, 2013.

XVII Congreso Latinoamericano y XXII Congreso Peruano de Fitopatología, Lambayeque, 2013, Perú.

Y otorgado el siguiente reconocimiento:

Premio SEF 2013 por el trabajo: “Papel de la proteína supresora p22 del crinivirus *Tomato chlorosis virus* durante el proceso de infección viral y efecto sinérgico”, durante el Congreso Latinoamericano y XXII Congreso Peruano de Fitopatología, Lambayeque, 2013, Perú. (Boletín SEF nº84, pág. 34, Diciembre 2013).



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

*A mis padres,
a mi hermana y a su esposo.*



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Agradecimientos

Para escribir éstas líneas he esperado hasta el último momento. Los que me conocen bien saben que soy poco de sentimentalismos. He llegado hasta aquí por casualidades de la vida, gracias a decisiones que tomé y a gente que se cruzó en mi camino, algunas para ayudarme, otras para enseñarme y otras para compartir. Ha sido toda una experiencia haber podido llegar hasta aquí con toda la gente que se ha cruzado en mi camino en estos años, porque uno no recorre el camino solo. Quiero agradecer en primer lugar a Carmen y a Enrique, las personas que apostaron por mí, primero para echar la beca, gracias Enrique, a pesar de todo, nos aprobaron las dos que pedimos. Gracias Carmen, por toda la dedicación, el esfuerzo, la paciencia, pero sobre todo, por toda la enseñanza, he aprendido cosas que jamás hubiera imaginado tener la oportunidad de aprender. Nunca tendré palabras para agradecerles a ambos por todo, siempre me he sentido apoyada, ha sido un lujo haber estado dirigida por ustedes. En segundo lugar quiero agradecer a Jesús, gracias por toda la ayuda, la orientación y las recomendaciones tan acertadas (sobre todo con el último artículo), gracias. Anelise, Irene, Celia, mis grandes amigas, vivimos momentos increíbles, creo que jamás he vuelto a encontrar un grupo en el cual me haya sentido tan cómoda como con ustedes. Gracias por seguir estando conmigo en las buenas y en las malas, aún en la distancia, nunca olvidaré la última vez que nos vimos en Madrid un día inolvidable, espero poder verlas pronto. Mariavi, que puedo decir que no hayan dicho ya todos los becarios que han pasado por este laboratorio de ti, eres maravillosa, he tenido mucha suerte haber podido compartir contigo dentro y fuera del lab, gracias por los buenos consejos, por el apoyo, por el cariño. Mi Reme, que bueno que siempre te he tenido a mi lado en el lab (literalmente), me has transmitido mucha tranquilidad y siempre has estado allí cuando me ha hecho falta, gracias, sabes que te quiero un montón. La Mari, siempre a mi derecha, compitiendo a ver quién hacía más extracciones de RNA en un día, quemándonos los dedos con el nitrógeno, se sufre pero se llega a la meta, gracias por todo Mari, la próxima eres tú. Ada, gracias por siempre estar ahí, eres una gran amiga, hemos compartido muchas cosas y, aunque nuestros caminos se separaron, sigues siempre ahí, gracias por esas largas conversaciones, por siempre darme ánimos, gracias Adita. Isa, fuiste la primera en recibirme cuando llegué, gracias por todo, me ayudaste un montón. Gracias a la gente del lab que ya no está, Belén, Elena, Patri y Willie, gracias por los buenos momentos. Gracias a la gente que sigue aún, Sonia, Juan, Elvira,

Paco, Anabel, de todos he aprendido un poco, pero sobre todo hemos compartido buenos momentos. Gracias a los que han estado de paso, Ishtiaq, Leo, Nevine, Pedro, Alejandro, Pierre, con todos ustedes he compartido buenos momentos en el lab y en la residencia y hasta de viaje nos hemos ido. No olvidaré el viaje a Portugal, ni la guitarra de Pedro, ni la marcha del francés. Por mi cuartito han pasado varias chicas, Loudi, Pao, Lidia, Camila, cuantas cosas vividas, cuantas risas, cafés, estrés, agobios, ha sido un gusto haber compartido sitio con ustedes. Gracias Pao por siempre darme ánimos, eres increíble, siempre preocupándote por mi, gracias. Lidia, aunque ya no estás, has dejado un gran vacío, te echamos de menos y te esperamos de vuelta. Camila, siempre con una sonrisa, con optimismo, gracias por los buenos momentos, ya sabes que siempre me tendrás como amiga para lo que necesites. Gracias a la nueva gente que se queda, Elisa, Edu, Happiness. Gracias Eli, una tía estupenda, en poco tiempo te has hecho querer, espero que sigamos en contacto. Gracias a mi gente de la resi, Jorge siempre estás en las buenas y en las malas, te voy a echar de menos, nunca olvidaré lo mucho que me has ayudado. Gracias Rida por compartir tantas cosas, Amanda eres un encanto, que pena que hayamos compartido solo unos de meses, espero nos volvamos a ver pronto, gracias Quique por siempre echarnos una mano cuando hace falta. Gracias a Ro, a Xavi, ¡¿cómo olvidar las rutas de senderismo?!, gracias. Nerea y Vero, gracias por compartir conmigo y por escucharme, por los paseos perrunos y las conversaciones. Gracias Vero por tu compañía, al final nuestros perros se han hecho grandes amigos, y nosotras también gracias a ellos. Olaya, gracias por toda la ayuda en el trabajo, siempre acudes a mis llamados de desesperación cuando algo no funciona, gracias, pero sobre todo por todos los momentos compartidos. Gracias a Carlitos, que ahora está en México y a Liz, grandes amigos, Ares y yo les echamos de menos, nos lo hemos pasado muy bien con ustedes. Gracias Jota, siempre venías a echar unas risas al cuartito, espero que estés bien por esas tierras gauchas. Gracias Antonio por toda la ayuda prestada.

La portada de esta tesis ha sido cortesía de mi gran amiga Cris, gracias Cris, me ha encantado. Mis chicas de Lima, que en la distancia siempre están, Lili y Andreita, gracias por los karaokes tan liberadores. Gracias a mi amiga Maricarmen, que siempre me ha apoyado incondicionalmente, gracias tía, eres una gran amiga.

Gracias mamá, gracias papá, han estado siempre apoyándome, aconsejándome y aguantándome, gracias por ayudarme a cumplir mis metas. Gracias Susan, eres la mejor hermana del mundo, me has apoyado desde que tengo memoria y sigue siendo así,

gracias Arturo. Gracias a mis sobrinos, alegran mis días con su cariño, mis hermanos Iván y Omar y por supuesto, gracias a mi perro, que me obliga a caminar cada día, a respirar aire puro, pero sobre todo me obliga a sonreír, me ha cambiado la vida. Gracias familia, son lo mejor que tengo. Hugo no puedes faltar, ¿qué hubiera hecho yo sin ti? no hubiera llegado hasta el final. Has estado “detrás de cámaras” apoyándome, éstas breves líneas te las dedico, es lo mínimo que puedo hacer por alguien que ha hecho tanto por mi.

Discúlpenme si me olvido de alguien, espero que no, todos de alguna manera u otra han formado parte de esta etapa. Gracias por compartirla conmigo.

“Puede que lo que hacemos no traiga siempre la felicidad, pero si no hacemos nada, no habrá felicidad” . Albert Camus.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE

ACRÓNIMOS	1
RESUMEN	9
SUMMARY	15
INTRODUCCIÓN	21
1. Los virus de plantas	23
1.1. Características generales	23
1.2. Ciclo infeccioso de los virus de plantas	25
1.3. Mecanismo de defensa antiviral en plantas	27
2. Silenciamiento por RNA	30
2.1. Aspectos generales y breve historia	30
2.2. Mecanismos moleculares del silenciamiento por RNA en plantas	31
2.3. Silenciamiento por RNA como mecanismo de defensa antiviral en plantas	34
2.4. Supresión viral del silenciamiento	36
2.4.1. Características generales	36
2.4.2. Mecanismos moleculares de supresión del silenciamiento	37
2.4.3. Supresores virales como determinantes de patogenicidad. Sinergismo viral	48
3. Familia <i>Closteroviridae</i>	51
3.1. Características generales	51
3.2. Organización genómica	54
3.3. Mecanismo de expresión génica	59
3.4. Ciclo de infección de los closterovirus	61
3.5. Escenario evolutivo de la familia <i>Closteroviridae</i>	62
3.6. Supresores del silenciamiento génico en la familia <i>Closteroviridae</i>	63
4. Tomato chlorosis virus (ToCV)	66
4.1. Propiedades biológicas y modo de inoculación	66
4.2. Organización genómica	68
4.3. Diversidad genética de ToCV	70
OBJETIVOS	73
CAPÍTULO I. Genetic diversity and silencing suppression activity of the p22 protein of <i>Tomato chlorosis virus</i> isolates from tomato and sweet pepper	77



CAPÍTULO II. The p22 RNA silencing suppressor of the crinivirus <i>Tomato chlorosis virus</i> preferentially binds long dsRNAs preventing them from cleavage	105
CAPÍTULO III. The p22 RNA silencing suppressor of the crinivirus <i>Tomato chlorosis virus</i> is dispensable for local viral replication but important for counteracting an antiviral RDR6-mediated response during systemic infection	135
CAPÍTULO IV. The heterologous expression of the p22 RNA silencing suppressor of the crinivirus <i>Tomato chlorosis virus</i> from TRV and PVX induces a drastic synergistic effect but does not complement suppressor defective mutant viruses	155
DISCUSIÓN GENERAL	179
CONCLUSIONES	193
BIBLIOGRAFÍA	197

ACRÓNIMOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Acrónimos de virus

ACLSV:	<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>
AgMV:	<i>Agropyron mosaic virus</i>
AV-2:	<i>Asparagus virus 2</i>
AV3:	<i>Asparagus virus 3</i>
BdMoV:	<i>Burdock mottle virus</i>
BMV:	<i>Beet mild yellowing virus</i>
BNYVV:	<i>Beet necrotic yellow vein virus</i>
BPYV:	<i>Beet pseudoyellows virus</i>
BSBMV:	<i>Beet soil-borne mosaic virus</i>
BSMV:	<i>Barley stripe mosaic virus</i>
BuYV:	<i>Burdock yellows virus</i>
BWYV:	<i>Beet western yellows virus</i>
BYDV:	<i>Bean yellow disorder virus</i>
BYSV:	<i>Beet yellow stunt virus</i>
BYV:	<i>Beet yellows virus</i>
BYVaV:	<i>Blackberry yellow vein-associated virus</i>
CABMV:	<i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i>
CABYV:	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>
CaMV:	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
CCYV:	<i>Cucurbit chlorotic yellows virus</i>
CfMV:	<i>Cocksfoot mottle virus</i>
CGMMV:	<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i>
CIRV:	<i>Carnation italian ringspot virus</i>
CLRDV:	<i>Cotton leafroll dwarf virus</i>
CMV:	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CNFV:	<i>Carnation necrotic fleck virus</i>
CNV:	<i>Cucumber necrosis virus</i>
CPMV:	<i>Cowpea mosaic virus</i>
Cr-TMV:	<i>Crucifer-infecting tobacco mosaic virus</i>
CSDV:	<i>Citrus sudden death-associated virus</i>
CTV:	<i>Citrus tristeza virus</i>
CVB:	<i>Chrysanthemum virus B</i>

CVYV:	<i>Cucumber vein yellowing virus</i>
CYDV:	<i>Cereal yellow dwarf virus</i>
CYLV:	<i>Carrot yellow leaf virus</i>
CymRSV:	<i>Cymbidium ringspot virus</i>
CYSDV:	<i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i>
CWMV:	<i>Chinese wheat mosaic virus</i>
DVCV:	<i>Diodia vein chlorosis virus</i>
GBNV:	<i>Groundnut bud necrosis virus</i>
GLRaV-1:	<i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i>
GLRaV-11:	<i>Grapevine leafroll-associated virus 11</i>
GLRaV-2:	<i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i>
GLRaV-3:	<i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i>
GLRaV-5:	<i>Grapevine leafroll-associated virus 5</i>
GVA:	<i>Grapevine virus A</i>
HCRSV:	<i>Hibiscus chlorotic ringspot virus</i>
HoMV:	<i>Hordeum mosaic virus</i>
LCV:	<i>Lettuce chlorosis virus</i>
LIYV:	<i>Lettuce infectious yellows virus</i>
MABYV:	<i>Melon aphid-borne yellows virus</i>
MNSV:	<i>Melon necrotic spot virus</i>
MRFV:	<i>Maize rayado fino virus</i>
MV-1:	<i>Mint yellow leaf virus</i>
ONMW:	<i>Oat necrotic mottle virus</i>
PCV:	<i>Peanut clump virus</i>
PEBV:	<i>Pea early browning virus</i>
PEMV-1:	<i>Enation pea mosaic virus</i>
PepMV:	<i>Pepino mosaic virus</i>
PepMoV:	<i>Pepper mottle virus</i>
PepRSV:	<i>Pepper ringspot virus</i>
PIAMV:	<i>Plantago asiatica mosaic virus</i>
PFVB:	<i>Pelargonium flower break virus</i>
PLPV:	<i>Pelargonium line pattern virus</i>
PLRV:	<i>Potato leafroll virus</i>
PMWaV-1:	<i>Pineapple mealybug wilt-associated virus 1</i>

PoLV:	<i>Photos latent virus</i>
PPV:	<i>Plum Pox virus</i>
PRSV:	<i>Papaya ringspot virus</i>
PSLV:	<i>Poa semilatifolia virus</i>
PVA:	<i>Potato virus A</i>
PVM:	<i>Potato virus M</i>
PVX:	<i>Potato virus X</i>
PVY:	<i>Potato virus Y</i>
PYVV:	<i>Potato yellow vein virus</i>
RCNMV:	<i>Red clover necrotic mosaic virus</i>
RDV:	<i>Rice dwarf virus</i>
RHBV:	<i>Rice hoja blanca virus</i>
RSV:	<i>Rice stripe virus</i>
RYMV:	<i>Rice yellow mottle virus</i>
SBWMV:	<i>Soil-borne wheat mosaic virus</i>
SCMV:	<i>Sugarcane mosaic virus</i>
SCSMV:	<i>Sugarcane strake mosaic virus</i>
ScYLV:	<i>Sugarcane yellow leaf virus</i>
SpaV:	<i>Strawberry pallidosis-associated virus</i>
SPCFV:	<i>Sweet Potato Chlorotic Fleck Virus</i>
SPCSV:	<i>Sweet potato chlorotic stunt virus</i>
SPMMV:	<i>Sweet potato mild mottle virus</i>
TAV:	<i>Tomato aspermy virus</i>
TBSV:	<i>Tomato bushy stunt virus</i>
TCV:	<i>Turnip crinkle virus</i>
TEV:	<i>Tobacco etch virus</i>
TICV:	<i>Tomato infectious chlorosis virus</i>
TMV:	<i>Tobacco mosaic virus</i>
ToCV:	<i>Tomato chlorosis virus</i>
ToMV:	<i>Tomato mosaic virus</i>
ToRSV:	<i>Tomato ringspot virus</i>
ToTV:	<i>Tomato torrado virus</i>
TriMV:	<i>Triticum mosaic virus</i>
TRV:	<i>Tobacco rattle virus</i>

Acrónimos

TSWV:	<i>Tomato spotted wild virus</i>
TuMV:	<i>Turnip mosaic virus</i>
TuYV:	<i>Turnip yellows virus</i>
TVMV:	<i>Tobacco vein mottling virus</i>
TVX:	<i>Tulip virus X</i>
TYLCCNV:	<i>Tomato yellow leaf curl China virus</i>
TYLCV:	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>
TYMV:	<i>Turnip yellow mosaic virus</i>
WcLMV:	<i>White clover mosaic virus</i>
WSMV:	<i>Wheat streak mosaic virus</i>
WYLV:	<i>Wheat yellow leaf virus</i>
YoMV:	<i>Youcai mosaic virus</i>
ZYMV:	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>

Otros acrónimos

AAP:	Periodo de adquisición
ADK:	Adenosina quinasa
AGO:	Proteína Argonauta
<i>avr</i> :	Avirulencia
CP:	Proteína de cubierta
CPm:	Proteína menor de la cápsida
CRP:	Proteínas ricas en cisteínas
DCL:	Dicer-like
DdDp:	DNA polimerasa dependiente de DNA
DIG:	Digoxigenina
DRB:	Proteína de unión a RNA de cadena doble
DRB4:	Proteína de unión a RNA de cadena doble
DRM2:	DNA metiltransferasa
dsDNA:	DNA de cadena doble
dsRNA:	RNA de cadena doble
eIF4E:	Factor de iniciación de traducción
GW/WG:	Glicina/tritófano
HCPPro:	Proteasa del componente ayudante viral
HEL:	RNA helicasa
HIP2:	Proteína asociada al microtúbulo
HR:	Respuesta hipersensible
Hsp70:	Proteína de choque térmico de 70 kDa
Hsp70h:	Proteína homóloga de choque térmico de 70 kDa
JA:	Ácido jasmónico
kDa:	Kilo Dalton
Mcs:	Sitio de clonación múltiple
MET:	RNA metiltransferasa
MIR:	Gen que codifica para un RNA primario
miRNA:	Micro RNA
MP:	Proteína de movimiento
mRNA:	RNA mensajero
NBS-LRR:	Gen de resistencia

nm:	Nanómetro
nt:	Nucleótidos
ORF:	Pauta abierta de lectura
pb:	Pares de bases
PRO:	Poliproteína con dominios proteasa
PTGS:	Silenciamiento génico post-transcripcional
QGB:	Bloque de cinco genes
<i>R</i> :	Genes de resistencia
RAV2:	Factor transcripcional inducible por etileno
RdDM:	Metilación del DNA mediada por RNA
RdDp:	DNA polimerasa dependiente de RNA
RDR:	RNA polimerasa dependiente de RNA
RdRp:	RNA polimerasa dependiente de RNA
rgsCaM:	Proteína celular relacionada con la calmodulina
RISC:	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
rRNA:	RNA ribosomal
SA:	Ácido salicílico
SAHH:	S-adenosil homocisteina hidrolasa
SAR:	Resistencia sistémica adquirida
sRNA:	Pequeño RNA
siRNA:	Pequeño RNA interferente
ssDNA:	DNA de cadena sencilla
ssRNA:	RNA de cadena sencilla
tasiRNA:	Pequeño RNA interferente con actividad en trans
TGB:	Bloque de tres genes
TGS:	Silenciamiento génico transcripcional
UTR:	Región no codificante
vsiRNA:	Pequeño RNA interferente viral

RESUMEN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Tomato chlorosis virus (ToCV) pertenece al género *Crinivirus* dentro de la familia *Closteroviridae* donde se engloban los virus de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva de mayor tamaño y complejidad entre los virus de RNA de plantas. ToCV posee un genoma bipartito, donde el RNA1 codifica las proteínas implicadas en replicación viral y el RNA2 las implicadas en encapsidación, movimiento y transmisión. Aunque ambos RNAs son necesarios para obtener una infección productiva en planta, el RNA1 puede replicarse independientemente. Por su parte, el RNA2 es completamente dependiente de las proteínas codificadas en el RNA1 para su replicación. Como ha sido descrito para otros miembros de esta familia, ToCV codifica en su genoma hasta tres proteínas con actividad supresora del silenciamiento por RNA. Así, mientras que en el RNA2 esta función se lleva a cabo por las proteínas estructurales CP y CPm, en el RNA1 esta actividad es realizada por una proteína que parece específicamente dedicada a ello, la proteína p22. Esta proteína está codificada en el extremo 3' del RNA1 de ToCV y ha sido descrita como una de las proteínas cuya actividad supresora del silenciamiento por RNA es de las más duraderas a lo largo del tiempo en ensayos de expresión transitoria en planta (Cañizares, *et al.*, 2008). En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de la proteína p22, donde la finalidad última ha sido conocer el modo en que, por su mediación, ToCV es capaz de hacer frente a una respuesta defensiva de la planta basada en el silenciamiento por RNA, estando interesados en conocer también el papel de p22 cuando se expresa a partir de virus heterólogos.

Para todo ello, y dado que en este grupo de virus la región del genoma donde se localiza p22 tiene implicaciones evolutivas, en primer lugar hemos realizado un estudio de la variabilidad genética de la región del RNA1 que codifica p22 en aislados de ToCV de tomate y pimiento. Los resultados obtenidos han mostrado que se trata de una región muy conservada, en donde la poca variabilidad existente se concentra en la región carboxilo terminal de la proteína. Aunque altamente conservadas, el análisis filogenético mostró una clara separación de las secuencias de p22 en dos grupos denominados tipo I y tipo II. Ensayos de supresión de silenciamiento realizados con proteínas p22 pertenecientes a cada uno de estos grupos, mostraron que ambas proteínas poseían una actividad supresora de silenciamiento duradera a lo largo del tiempo. Parece, por tanto, que la presencia de un supresor de silenciamiento con actividad supresora de larga duración es una característica conservada entre los aislados de ToCV.

Una vez confirmado que codificar una proteína con actividad supresora de larga duración parece ser importante para las poblaciones de ToCV, el siguiente objetivo consistió en conocer el posible mecanismo de acción responsable de la misma. Así, la realización de ensayos de unión *in vitro* mostró que p22 une preferentemente RNAs de doble hebra (dsRNAs) de tamaño largo, interfiriendo con la acción de corte de Dicer, inhibiéndose de este modo la generación de RNAs pequeños (sRNAs). La actuación de p22 en este punto temprano de la cascada de silenciamiento, podría ser una de las razones de esta actividad supresora de larga duración, ya que se bloquearía desde un primer momento la generación de sRNAs. Estos resultados *in vitro* se correlacionaron con los obtenidos en ensayos de supresión de silenciamiento inducidos por construcciones en horquilla *in planta*.

Una vez conocido uno de los posibles mecanismos de acción de p22 cuando ésta se encontraba aislada de su contexto viral, el siguiente objetivo consistió en conocer cómo p22 podía mediar frente a una respuesta defensiva de la planta basada en el silenciamiento por RNA durante el ciclo de infección viral. Ya que, entre los componentes de la cascada de silenciamiento, RDR6 juega un papel fundamental en defensa antiviral, se comenzó estudiando si RDR6 tenía algún papel en defensa frente a ToCV. El incremento notable en los niveles de acumulación de ToCV observado en plantas de *Nicotiana benthamiana* defectivas para la expresión de RDR6 (plantas RDR6i), comparado con los de plantas silvestres, indicaba la importancia de este factor en la defensa de la planta frente a la infección viral. Para conocer si durante el proceso de infección viral, p22 tenía algún papel frente a este componente de la cascada de silenciamiento, se creó un mutante de delección de p22 de ToCV (ToCV Δ p22). Así, en primer lugar se pasó a estudiar el papel de p22 durante el ciclo de infección viral en ensayos a nivel local. Curiosamente, los resultados mostraron que la ausencia de p22, además de no afectar a la replicación del RNA1, estaba asociada con la desregulación del ratio de cadenas positivas y negativas del virus, aumentando estas últimas, no teniendo RDR6 ningún efecto apreciable a este nivel. En el caso de ToCV Δ p22 el incremento en cadenas negativas correspondientes al RNA1, que resulta en un aumento de los niveles de acumulación de cadenas positivas a partir de las cuales las proteínas requeridas para la replicación podrían traducirse, no se correlacionó con un incremento en los niveles de acumulación del RNA2. Por otra parte, a nivel sistémico se observó que aunque el mutante ToCV Δ p22 tenía reducida la capacidad de infectar plantas de *N.*

benthamiana silvestres, esta capacidad era rescatada en plantas RDR6i, lo que indicaba la existencia de una conexión entre p22 y RDR6.

Por último, y ya que las proteínas supresoras de silenciamiento están frecuentemente asociadas a interacciones de tipo sinérgico, el último objetivo de esta tesis consistió en estudiar el efecto de la expresión heteróloga de p22 a partir de los virus *Tobacco rattle virus* (TRV) y *Potato virus X* (PVX). Los resultados mostraron que, aunque se produjo un fuerte sinergismo en síntomas que conducía a la muerte de la planta cuando p22 se expresaba a partir de ambos virus, sólo en el caso de TRV, éste iba acompañado de un aumento en los niveles de acumulación viral. La expresión heteróloga de p22 no era capaz, sin embargo, de complementar a mutantes de virus defectivos en la expresión de proteínas con actividad supresora del silenciamiento.

SUMMARY





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Tomato chlorosis virus (ToCV; genus *Crinivirus*) is a member of the complex family *Closteroviridae*, in which the largest RNA genomes among plant viruses are found. ToCV has a bipartite single stranded, positive-sense RNA genome with RNA1-encoding proteins involved in viral replication and RNA2-encoding proteins involved in encapsidation, movement, and host transmission. Although both RNAs are required for the effective infection of plants, RNA1 can replicate independently, whereas RNA2 depends on RNA1 for its replication. Similar to other members of the family *Closteroviridae*, ToCV adopts the strategy of encoding multiple RNA silencing suppressors. Thus, while ToCV RNA2 has delegated its suppressor function to the structural proteins CP and CPm, RNA1 encodes a dedicated suppressor protein at its 3'-proximal end, p22, which exhibits no apparent homology to any other reported protein. It has been shown that p22 suppresses very efficiently local RNA silencing induced either by sense RNA or by dsRNA, having one of the longest lasting local suppression activities when assayed in *Nicotiana benthamiana* plants. Thus, the p22 protein is the focus of our work, where the final goal is to know how ToCV, by mediation of this protein, confront a plant defense response based on RNA silencing, also being interested in knowing the effect of the expression of ToCV p22 from heterologous viruses.

First of all, since the 3'-end of RNA1 in bipartite crinivirus where the p22 silencing suppressor of ToCV is located, has evolutionary implications, we have undertaken a study to evaluate the genetic diversity of this gene in ToCV isolates collected in Spain from tomato and sweet pepper. These results have shown that the p22 amino acid sequences are highly conserved having few variable positions mainly located at the C-terminal part of the protein. Although highly conserved, phylogenetic analyses of the p22 amino acid sequences clearly showed two separated groups, called type I and type II. Comparison of the silencing suppression activities of both ToCV p22 protein types showed a similar lasting local suppression activity. Thus, our findings provide experimental evidence that the presence of a "strong" silencing suppressor at the 3'-end of the RNA1, is an important and conserved feature for ToCV isolates.

Once confirmed that the presence of a "strong" silencing suppressor is important for ToCV populations, the next objective consisted in knowing its mechanism of action. Thus, by performing *in vitro* binding assays we showed that p22 very efficiently binds long dsRNA molecules preventing their cleavage into sRNAs by RNase III Dicer

homologue. The blocking of the silencing process at early steps by hindering the generation of sRNAs could be one of the reasons of the long lasting silencing suppression activity observed. The efficient ability of p22 to suppress RNA silencing, triggered by hairpin transcripts transiently expressed *in planta*, supports the relationship between its ability to bind dsRNA *in vitro* and its ability to inhibit RNA silencing *in vivo*.

After knowing the p22 mechanism of action when isolated from the viral context, the next objective was to determine how ToCV, by mediation of p22, counteracted a plant defense response based on RNA silencing. Among the RNA silencing components, RDR6 has a relevant role in virus defense. Therefore, we started studying if RDR6 played an antiviral role in plant defense against ToCV. The significant increase in ToCV RNA accumulation levels in plants where RDR6 was constitutively silenced (RDR6i plants) compared with wild type plants, showed that this was the case. To know if during the viral infection process, p22 had a role counteracting this component of the RNA silencing pathway, we created a p22-deficient ToCV infectious mutant clone (ToCV Δ p22). First of all, we studied the p22 role during the viral infection cycle in local assays. These results showed that although p22 does not appear to be necessary for local RNA1 replication, it may influence the equilibrium between the positive and negative strands of the virus during the infection process. In the case of ToCV Δ p22, the increased accumulation of negative strands which might result in increased accumulation of positive strands from which the replication associated proteins are translated, did not correlate with increased RNA2 accumulation. On the other hand, the finding that ToCV Δ p22 systemic accumulation was impaired in wild type *N. benthamiana* but not in NbrDR6i plants suggests a role for p22 in counteracting an RDR6-mediated antiviral response of the plant during systemic infection.

Finally, since suppression of RNA silencing and the ability to induce a synergistic response are closely associated, we analyzed the effect of the expressing p22 from the heterologous viruses *Tobacco rattle virus* (TRV) and *Potato virus X* (PVX). These results showed that although a drastic disease synergism leading to plant death was observed when ToCV p22 was expressed from both viruses, only in the case of TRV this was linked to an increase in the viral accumulation levels. The heterologous

expression of ToCV p22, however, could not complement suppressor defective mutant viruses.

INTRODUCCIÓN



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

1. Los virus de plantas

1.1. Características generales

Los virus son parásitos obligados intracelulares con una limitada capacidad codificadora que dependen del huésped para su supervivencia. Básicamente están compuestos de una o más moléculas de ácido nucleico protegidas por una cubierta proteica, la cápsida, que a su vez puede tener una envoltura adicional lipoproteica. Para poder completar su ciclo de vida, los virus de plantas deben ser capaces de replicarse, moverse de célula a célula y a larga distancia, y ser capaces de evadir una respuesta defensiva por parte de su huésped (Maule *et al.*, 2002). La infección viral, en general, induce un complejo patrón de cambios moleculares en la planta que altera el funcionamiento celular normal, pudiendo resultar en anomalías del desarrollo (Pallás y García, 2011; García y Pallás, 2015). Así, la presencia viral puede ir asociada al desarrollo de síntomas de enfermedad (Figura 1), y ocasionar una disminución en el rendimiento y la calidad de los cultivos.



Figura 1: Síntomas causados por distintos tipos de virus. (A) *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV; género *Tobamovirus*, familia *Virgaviridae*), (B) *Tomato torrado virus* (ToTV; género *Torradovirus*, familia *Secoviridae*), (C) y (D) *Tomato spotted wilt virus* (TSWV; género *Tospovirus*, familia *Bunyaviridae*).

Los genomas de los virus de plantas están constituidos por una o más moléculas de DNA o RNA de cadena sencilla (ss) o doble (ds) de polaridad positiva (+) o negativa (-), aunque la mayoría de ellos poseen RNA de cadena sencilla y polaridad positiva. La gran diversidad de virus ha llevado al establecimiento de un sistema universal de clasificación y, en la actualidad, el “Comité Internacional de Taxonomía de Virus” (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) reconoce un total de 21 familias y 108 géneros de virus de plantas (King, *et al.*, 2012) (Figura 2). Entre los criterios para su clasificación destacan el tipo de ácido nucleico, la organización genómica y estrategia de replicación, la forma y tamaño del virión, las propiedades

antigénicas y las propiedades biológicas como la categoría taxonómica del huésped, la patogenicidad y el modo de transmisión.

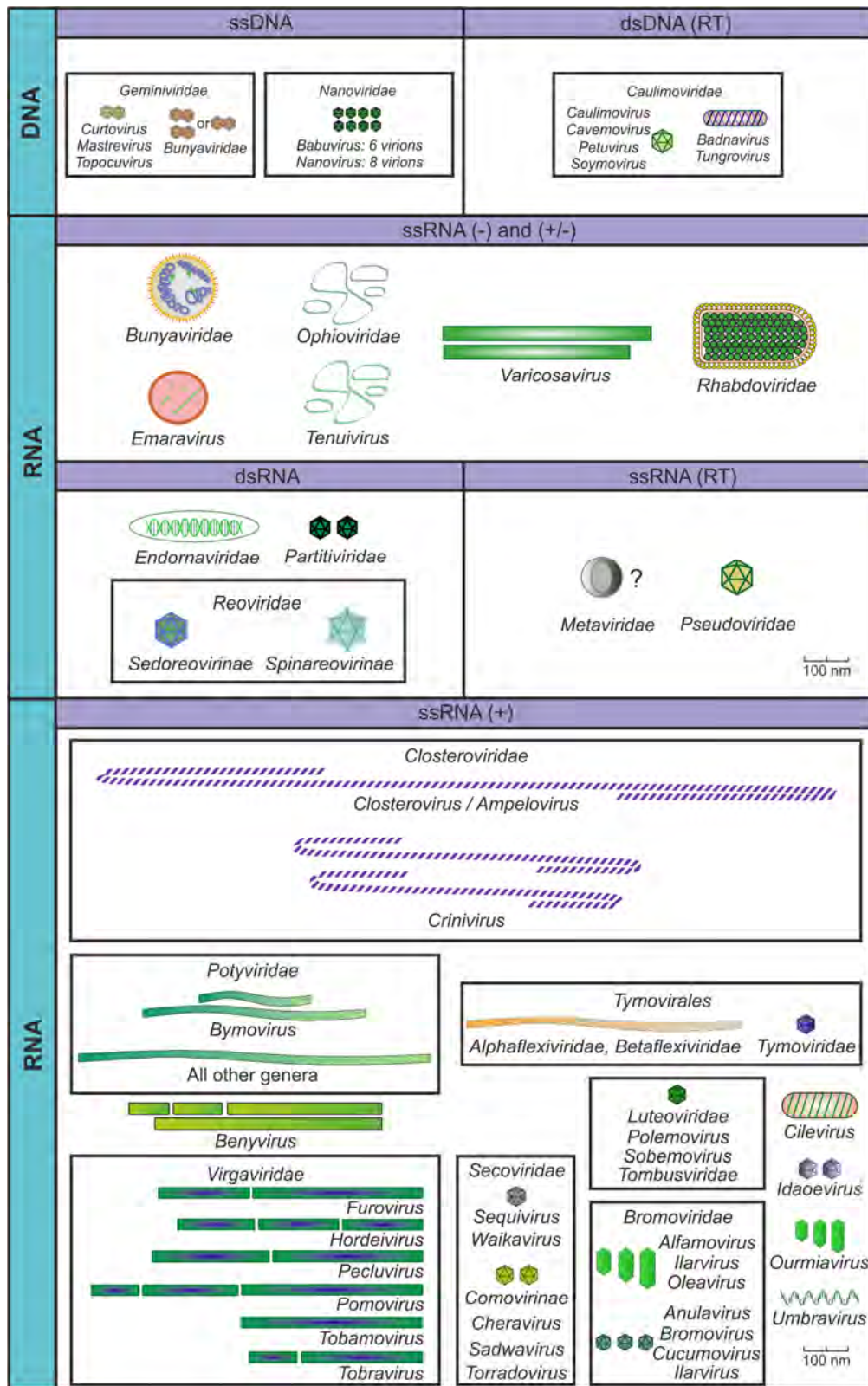


Figura 2: Taxonomía de los virus que infectan a plantas (adaptado de Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses) (King *et al.*, 2012).

1.2. Ciclo infeccioso de los virus de plantas

De modo general, el ciclo infeccioso de los virus de plantas constaría de las siguientes etapas:

Entrada del virus en la célula huésped

El virus inicia su ciclo infeccioso a partir de la entrada en la célula vegetal que se produce de forma pasiva a través de heridas o, en la mayoría de los casos, a través de vectores biológicos como insectos, nematodos y hongos (Gray y Gildow, 2003). Los insectos pertenecientes al orden *Hemiptera*, como áfidos y moscas blancas, transmiten el mayor número de especies de virus de plantas (Ng y Falk, 2006; Hogenhout *et al.*, 2008). Aunque menos frecuente, los virus que no disponen de un vector para su transmisión, pueden ser transmitidos por polen y semillas (Miller y Whitham, 2013). En condiciones experimentales es frecuente que los virus puedan ser transmitidos por inoculación mecánica y por injerto (Hull, 2002).

Desencapsidación y traducción de proteínas virales

Una vez en el interior de la célula se produce el desensamblaje de la cubierta proteica. Mientras los virus de RNA permanecen en el citoplasma, donde utilizan la maquinaria proteica, los virus de DNA entran en el núcleo donde se generan RNAs mensajeros (mRNA) virales por la mediación de RNAs polimerasas del huésped (Saxena y Lomonosoff, 2014). La reducida capacidad para expresar proteínas que los genomas de los virus presentan, ha hecho que hayan desarrollado estrategias eficientes de expresión de sus genes, que les confieren ventajas con respecto a los genes celulares. Entre estas estrategias encontramos: a) la organización multipartita del genoma, b) la síntesis de RNAs subgenómicos (subgenomic RNAs, sgRNAs), c) el procesamiento proteolítico de poliproteínas, d) el solapamiento de pautas abiertas de lectura (open reading frames, ORFs), o la síntesis de proteínas de mayor tamaño bien e) obviando codones de parada (“read-through”) o d) mediante el desplazamiento de la pauta de lectura (frameshift).

Replicación viral

En los virus de ssRNA (+) donde el RNA viral actúa directamente como mRNA, se traduce la RNA polimerasa dependiente de RNA (RNA dependent RNA polymerase, RdRp) viral. Esta proteína sintetizará hebras de polaridad negativa complementarias al RNA viral que servirán de molde para la síntesis de nuevos ssRNA (+). En los virus de

RNA de cadena sencilla y polaridad negativa [ssRNA(-)], se sintetiza en primer lugar la hebra de polaridad positiva mediante la RdRp encapsidada en el propio virión, que servirá como mRNA para la traducción de las proteínas virales, y como molde para la síntesis de nuevas cadenas negativas que constituirán el genoma de la progenie. En el caso de los virus de RNA de doble cadena (double-stranded RNA, dsRNA) la RdRp, también encapsidada, llevará a cabo la síntesis de los mRNA de las proteínas virales y de los dsRNAs. En el caso de los virus de DNA de cadena sencilla (single-stranded DNA, ssDNA) la replicación tiene lugar en el núcleo, mediada por la DNA polimerasa dependiente de DNA del huésped (DNA-dependent DNA polymerase, DdDp). En el caso de los virus de DNA de doble hebra (double-stranded DNA, dsDNA), se generan nuevos genomas de dsDNA a partir del mRNA viral mediante retrotranscripción mediada por una DNA polimerasa dependiente de RNA (RNA-dependent DNA polymerase, RdDp) viral.

Encapsidación de nuevas partículas virales

Las subunidades de proteínas de cubierta (coat proteins, CP) codificadas por el genoma viral reconocen las moléculas de DNA o RNA virales y se ensamblan formando nuevas partículas virales que contienen y/o protegen el genoma del virus.

Movimiento y dispersión viral

El virus se propaga dentro de la planta mediante un movimiento a corta distancia o célula a célula a través de los plasmodesmos, y un movimiento a larga distancia o sistémico a través del tejido vascular. El movimiento célula a célula está mediado por proteínas virales de movimiento que actúan modificando el tamaño del plasmodesmo (Niehl y Heinlein, 2011). En el movimiento a larga distancia se produce normalmente a través de los tubos cribosos del floema que se alcanzan tras un pase sucesivo a través de los haces vasculares, las células del parénquima vascular y las células acompañantes. Una vez transportado a zonas distales de la planta, el virus debe ser capaz de salir de los elementos cribosos para iniciar nuevos focos de infección y así propagarse por toda la planta (Hipper *et al.*, 2013) (Figura 3). La dispersión a otras plantas se producirá a través de vectores biológicos, polen o material de propagación vegetativa, o por el contacto físico entre plantas.

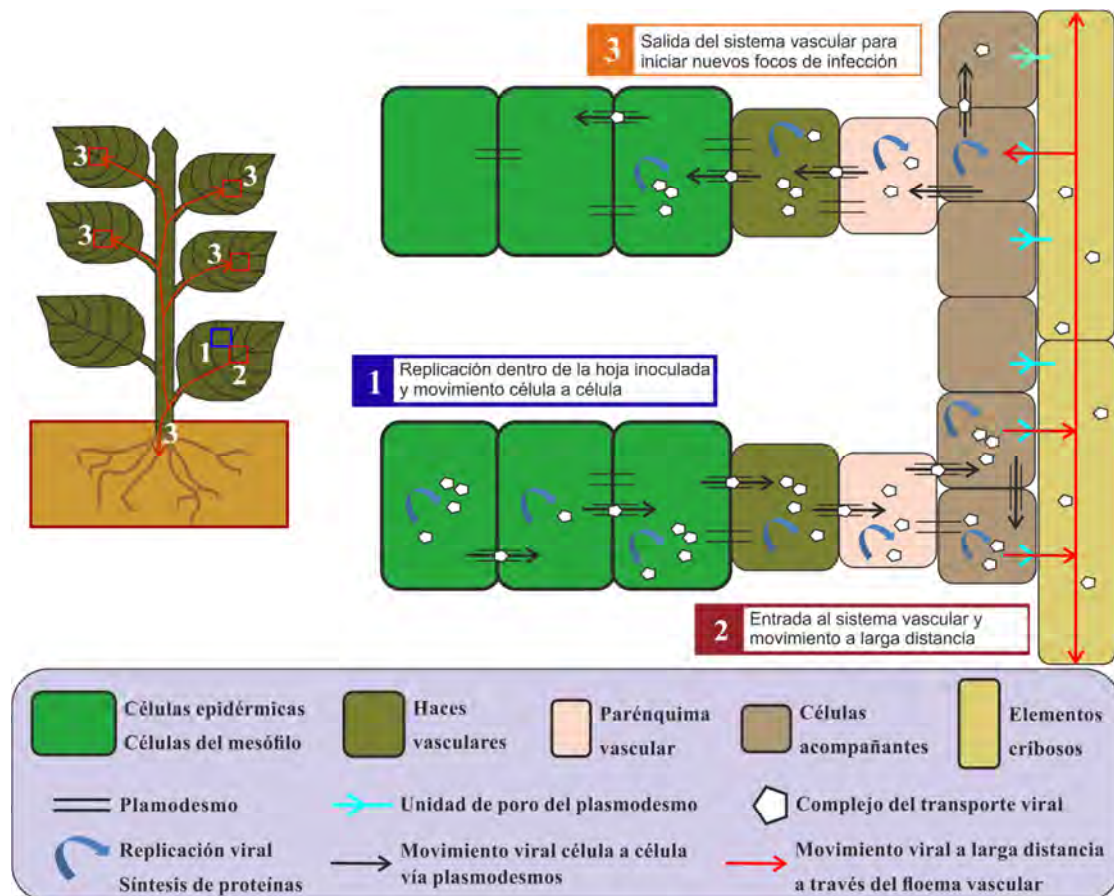


Figura 3: Movimiento viral célula a célula y a larga distancia a través de los tejidos vegetales (adaptado de Hipper *et al.*, 2013).

1.3. Mecanismos de defensa antiviral en plantas

Frente a las infecciones virales, las plantas se defienden estableciendo varias líneas de resistencia que se pueden clasificar en: resistencia dominante, resistencia recesiva, resistencia basada en el silenciamiento por RNA y resistencia mediada por hormonas (Nicaise, 2014).

Resistencia dominante. La mayoría de los genes de resistencia dominante (genes *R*) identificados en las interacciones virus-planta pertenecen a la clase NBS-LRR (nucleotide binding site-leucine rich repeat class), que reconocen de manera específica un factor de avirulencia (*avr*) del virus, a través del establecimiento de la llamada interacción “gen a gen”. Aunque inicialmente se había sugerido una interacción directa entre los productos génicos *avr* y *R*, actualmente se considera como más probable que el reconocimiento se produzca según el modelo de la “hipótesis de guardia” (Soosaar *et al.*, 2005). Tras el reconocimiento específico *avr-R*, se inicia una cascada de señales de

transducción a nivel local (Loebenstein, 2009; Carr *et al.*, 2010) mediante la cual la planta puede limitar la multiplicación y dispersión del patógeno. Esta respuesta suele estar asociada a un tipo de muerte celular programada, denominada respuesta hipersensible (hypersensitive response, HR) (Hammond-Kosack y Jones, 1997). Estudios recientes indican que el proceso de resistencia y la activación de una HR son rutas fisiológicas distintas, aunque ambas pueden trabajar juntas (Bendahmane *et al.*, 1999; Bai *et al.*, 2012). Los genes *R* también pueden inducir otro tipo de resistencia denominada resistencia sistémica adquirida (systemic acquired resistance, SAR), que a diferencia de la HR, proporciona una resistencia que se transmite a tejidos distales no infectados y es efectiva frente a posteriores ataques del patógeno y a varios patógenos al mismo tiempo (Carr *et al.*, 2010).

Resistencia recesiva. Aproximadamente la mitad de los 200 genes de resistencia conocidos que tienen como diana los virus de plantas, se heredan de forma recesiva (Díaz-Pendón *et al.*, 2004), lo que sugiere que esta forma de resistencia es más común frente a virus que frente a otros patógenos de plantas. La resistencia recesiva puede ser el resultado de la ausencia de un factor del huésped necesario para que el virus complete su ciclo de vida. Un gran número de los genes de resistencia recesiva clonados codifican factores de iniciación de la traducción. Entre ellos, el factor de iniciación de la traducción 4E (eIF4E) es de especial interés en el caso de virus de la familia *Potyviridae*, aunque mutaciones de genes de este grupo también confiere resistencia frente a otros grupos de virus (Robaglia y Caranta, 2006).

Resistencia basada en el silenciamiento por RNA. Este mecanismo de defensa se induce por la presencia de moléculas de doble hebra, activándose una cascada de procesos enzimáticos que tiene como consecuencia la inhibición o supresión de moléculas de ácidos nucleicos a través de interacciones específicas. Para contrarrestar este mecanismo de defensa los virus codifican en su genoma proteínas supresoras del silenciamiento (Voinnet, 2005). En los siguientes apartados explicaremos más en detalle este proceso.

Resistencia mediada por hormonas. Las hormonas vegetales juegan un papel importante en la regulación de la red de señalización implicada en la defensa de la planta. Como hemos visto, durante la activación de la resistencia mediada por genes *R*, las respuestas celulares iniciadas en el sitio de infección son emitidas a tejidos distales

no infectados de la planta, dando como resultado una respuesta o estado reducido de susceptibilidad que puede permanecer de manera eficiente durante varias semanas (Fu y Dong, 2013) o SAR. No está claro cómo la SAR se mantiene durante tanto tiempo, pero parecen fundamentales modificaciones epigenéticas como la metilación del DNA y la remodelación de la cromatina, para mantener esta señal (Spoel y Dong, 2012). Además, durante una infección viral, esta resistencia a las enfermedades a lo largo del tiempo y de amplio espectro requiere la acumulación endógena de ácido salicílico (salicylic acid, SA), lo que resulta en la reprogramación de una batería de genes que codifican proteínas relacionadas con la patogenicidad (Tsuda *et al.*, 2008; Yi *et al.*, 2014). La señal emitida desde el foco de infección para proteger los tejidos no infectados contra la invasión del virus, podría circular como un heterocomplejo, donde el metil-SA se uniría a derivados de lípidos y proteínas transportadoras de lípidos, moviéndose a través del floema al resto de la planta. El ácido jasmónico (jasmonic acid, JA) está también fuertemente implicado en defensa de la planta frente a virus. Así, la respuesta HR iniciada en las interacciones *avr-R* resulta en una modulación de SA y JA. Aunque el SA actúa como un regulador positivo de la resistencia de la planta frente a virus, el papel del JA es controvertido y aún no se ha aclarado completamente. Por ejemplo, el JA, parece ser un regulador negativo de la resistencia a nivel local de *Tobacco mosaic virus* (TMV) en plantas de tabaco (Oka *et al.*, 2013), pero es esencial para la resistencia sistémica a TMV en plantas de *Nicotiana benthamiana* (Zhu *et al.*, 2014). Es probable que el equilibrio entre JA y SA juegue un papel clave en la determinación del grado de resistencia de manera similar a lo observado en patosistemas que implican a patógenos no virales de planta (Thaler *et al.*, 2012). Curiosamente, los virus de plantas han evolucionado interviniendo en rutas hormonales, a menudo aprovechándose de las interacciones antagónicas entre las rutas del SA y JA (Kazan y Lyons, 2014). Aunque, su función en las interacciones virus-planta sigue siendo poco comprendida, estudios recientes indican que otras hormonas vegetales pueden modular los mecanismos de resistencia antiviral, especialmente el ácido abscísico (Chen *et al.*, 2013; Alazem *et al.*, 2014; Seo *et al.*, 2014), el etileno (Fischer y Dröge-Laser, 2004; Love *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2013) y los brasinosteroides (Ali *et al.*, 2014).

2. Silenciamiento por RNA

2.1. Aspectos generales y breve historia

El silenciamiento por RNA es un sistema de regulación mediado por RNAs pequeños que causan la inhibición o supresión de moléculas de ácidos nucleicos a través de interacciones específicas. Este proceso está altamente conservado en organismos eucariotas, donde además de en plantas está presente en hongos y animales (Wang y Metzlaff, 2005).

Este fenómeno fue descubierto en plantas transgénicas de petunia, donde la introducción de una copia foránea de un gen endógeno que se quería sobreexpresar resultó en la co-supresión de ambos, el transgén y el gen endógeno (Napoli *et al.*, 1990; van der Krol *et al.*, 1990). Posteriormente en diferentes sistemas virales se demostró que, en contra del modelo propuesto, no era necesaria la expresión de proteínas virales para obtener resistencia frente a virus sino que era suficiente con una secuencia viral no traducible (Lindbo *et al.*, 1992; van der Vlugt *et al.*, 1992). La observación de que un transgén GUS silenciado podía prevenir la acumulación viral de *Potato virus X* (PVX) portador de una secuencia GUS, indicaba que se trataba de un mecanismo de defensa antiviral específico de secuencia (English *et al.*, 1996). Otra evidencia que indicaba que se trataba de un mecanismo general de respuesta de la planta frente a la infección viral, fue el hallazgo de que en planta no sólo se encontrara resistencia frente a un virus inoculado inicialmente, sino también frente a otros virus que portaran secuencias homólogas (Ratcliff *et al.*, 1997). La prueba inequívoca que explicaba la extrema especificidad de secuencia del proceso de silenciamiento por RNA fue el hallazgo de que en plantas que contenían un transgén silenciado, se acumularan RNAs pequeños de aproximadamente 24 nt de tamaño con secuencias idénticas a la del transgén (Hamilton y Baulcombe, 1999). El posterior descubrimiento de que los genomas virales codificaban proteínas supresoras de silenciamiento, capaces de bloquear o interferir con este proceso de silenciamiento por RNA, confirmó su implicación en defensa antiviral (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Brigneti *et al.*, 1998; Kasschau y Carrington, 1998).

2.2. Mecanismos moleculares del silenciamiento por RNA en plantas

En plantas, el silenciamiento por RNA engloba una serie de procesos que pueden actuar a nivel transcripcional (transcriptional gene silencing, TGS) o post-transcripcional (post-transcriptional gene silencing, PTGS). Ambos procesos tienen en común el reconocimiento específico de secuencias de DNA o RNA por pequeñas moléculas de RNA. Este mecanismo está implicado en procesos, tales como el mantenimiento de la integridad del genoma, la regulación de procesos del desarrollo y/o la defensa frente a ácidos nucleicos invasores, tales como transgenes, transposones y virus (Voinnet, 2001; Vaucheret, 2006; Ruiz-Ferrer y Voinnet, 2009).

El silenciamiento por RNA se induce por la presencia de moléculas de dsRNA que podrían derivar de la replicación viral, de repeticiones invertidas, de la transcripción convergente de transgenes y transposones, de locis endógenos con una alta estructura secundaria, o bien generarse por la acción de RNAs polimerasas dependientes de RNA (RDR) a partir de ssRNA. Estas moléculas son procesadas por RNasas de tipo III denominadas en planta DCLs (Dicer-like), en pequeños RNAs (small RNAs, sRNAs) de doble hebra de entre 19 y 25 nt que presentan 2 o 3 nt protuberantes en el extremo 3' de ambas cadenas (Elbashir *et al.*, 2001). DCL requiere de la acción de DRB (dsRNA binding protein), para que el procesamiento del dsRNA se produzca de un modo preciso y eficiente (Hiraguri *et al.*, 2005; Eamens *et al.*, 2012 a, b). La metilación de los sRNAs generados mediada por la metil transferasa HEN1 (Boutet *et al.*, 2003), los protege de la degradación. Una de las hebras del sRNA es incorporada a un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RNA induced-silencing complex, RISC) que contiene, entre otros componentes, una endonucleasa llamada Argonauta (AGO). Una vez ensamblado, en el caso del PTGS, este complejo es guiado por el sRNA hasta un mRNA diana de secuencia complementaria al que se une induciendo la inhibición de su traducción o su degradación. En el TGS, este complejo es guiado hasta un DNA de secuencia complementaria al que se une, induciendo su metilación y bloqueando su transcripción. Existe un proceso de amplificación de la señal de silenciamiento mediado por RNAs polimerasas dependientes de RNA (RDR), que resulta en la generación de nuevas moléculas de dsRNA que son procesadas en sRNAs secundarios (Figura 4).

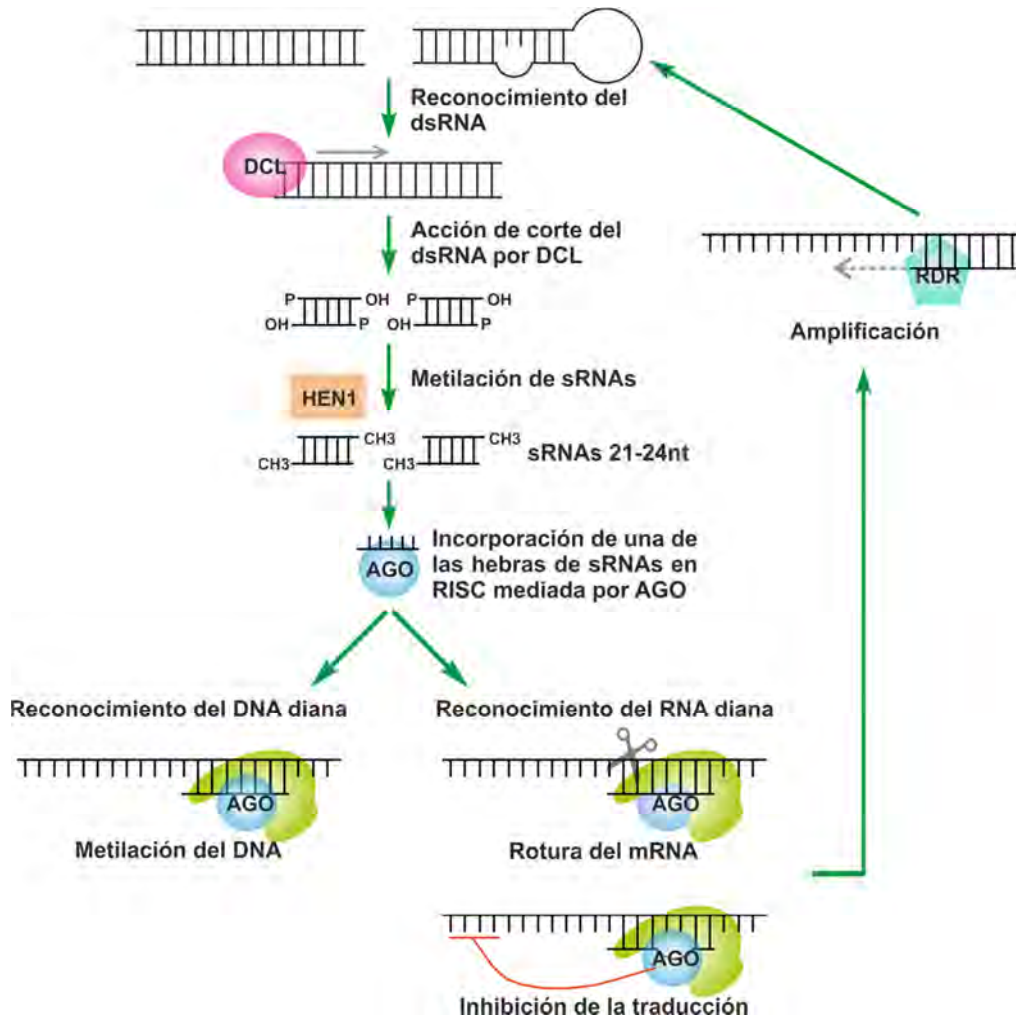


Figura 4: Ruta del silenciamiento por RNA en plantas. La molécula de dsRNA es reconocida y procesada por DCL, generando dúplex de sRNAs que serán metilados por la acción de HEN1. Una de las hebras del sRNA es incorporada en el complejo RISC cuyo componente principal es AGO, llevándose a cabo a continuación la degradación de los RNAs diana. Las RNA polimerasas dependientes de RNA (RDR) generan nuevas moléculas de dsRNA que serán nuevamente procesados por DCL, dando lugar a la formación de sRNAs secundarios.

En plantas, existen tres rutas básicas del silenciamiento por RNA: i) la ruta de los microRNA (miRNA), ii) la ruta de degradación mediada por pequeños RNAs interferentes (small interfering RNAs, siRNAs), y iii) la ruta de metilación del DNA mediada por RNA (RNA-directed DNA methylation, RdDM). En la ruta de los miRNAs, la transcripción de los genes MIR da lugar a un miRNA primario, que forma una estructura secundaria parcialmente plegada, que es procesada por DCL1, una de las cuatro proteínas DCL de *Arabidopsis thaliana*, para dar lugar a una estructura precursora tipo horquilla de la que serán escindidos los dúplex de miRNA de 21 a 24 nt (Kim *et al.*, 2005). Otros factores, como la proteína en dedo de zinc SERRATE y las

proteínas de unión a dsRNA DRB1 o HYL1, también están implicadas en la biogénesis de los miRNAs. Los miRNAs juegan un papel crítico en el control del desarrollo de la planta, reprimiendo o controlando la expresión de genes reguladores tales como los factores de transcripción. Los miRNAs de planta tienen principalmente como diana las regiones codificantes de los mRNAs y, aunque funcionan predominantemente mediante la acción de corte del RNA, se ha visto que también pueden actuar mediante represión traduccional (Brodersen *et al.*, 2008). En la ruta de degradación mediada por siRNAs, dsRNAs de tamaño largo endógenos o exógenos, o estructuras en horquilla son procesados por DCL4 y DCL2 en siRNAs de 21 y 22 nt, respectivamente. El dsRNA largo endógeno precursor de esos siRNAs es sintetizado por la RNA polimerasa dependiente de RNA 6 (RDR6), una de las seis RDRs de *A. thaliana*, usando ssRNA como molde. Los siRNAs endógenos conocidos como trans-acting siRNAs (tasiRNAs) juegan un papel muy importante durante el desarrollo de la planta y en las respuestas a estrés. Sin embargo, parece que una de las funciones principales de esta ruta es la defensa antiviral de la planta (ver el siguiente apartado). Por su parte, la ruta RdDM juega un importante papel en el silenciamiento de transposones y elementos de DNA repetitivos manteniendo así la estabilidad e integridad del genoma (Matzke *et al.*, 2009; Haag y Pikaard 2011). Esta ruta también parece tener un papel importante en la defensa de la planta frente a virus de DNA. Los siRNAs de 24 nt implicados en esta ruta son procesados por DCL3 a partir del dsRNA sintetizado por la RNA polimerasa IV dependiente de DNA (Pol IV) y RDR2 (Xie *et al.*, 2004; Henderson *et al.*, 2006). Aunque los detalles moleculares de la RdDM no están del todo claros, como resultado de su actuación, se produce la metilación *de novo* del DNA por mediación de la DNA metiltransferasa DRM2 (Cao y Jacobsen, 2002; Henderson *et al.*, 2010), inhibiéndose de este modo la transcripción.

En plantas, la activación del silenciamiento en una célula induce el silenciamiento de la misma secuencia en células adyacentes y en tejidos distales. Así, se han descrito tres tipos de movimiento de la señal de silenciamiento que ocasionarían un silenciamiento a corta distancia, un silenciamiento local extensivo y un silenciamiento sistémico (Kalantidis *et al.*, 2008; Dunoyer *et al.*, 2010). El movimiento de la señal de silenciamiento a través de la planta presenta un patrón similar al del movimiento viral, moviéndose célula a célula a través de los plasmodesmos, y a larga distancia a través del floema desde tejidos fuente a tejidos sumidero (Voinnet, 2008). Aunque no se conoce la naturaleza exacta de la señal de silenciamiento, los datos disponibles indican que se

trata de un ácido nucleico (Dunoyer *et al.*, 2010; Molnár *et al.*, 2010), habiéndose propuesto posibles modelos de como ocurre el mismo. Así, mientras la proteína RDR6 parece jugar un papel crucial en la amplificación de la señal y su movimiento a largas distancias (Schwach *et al.*, 2005), DCL4, en las células acompañantes, estaría implicada en la generación de sRNAs de 21 nt que son capaces de moverse 10-15 células más allá del límite del floema (Dunoyer *et al.*, 2005). Estudios recientes han demostrado que tanto siRNAs como miRNAs tienen la capacidad de moverse de una célula a otra y alcanzar el tejido vascular (Melnyk *et al.*, 2011).

2.3. Silenciamiento por RNA como mecanismo de defensa antiviral en plantas

En plantas, el silenciamiento por RNA también funciona como mecanismo de defensa antiviral (Baulcombe, 2004; Burguán y Havelda, 2011). Las infecciones virales en planta están asociadas con la acumulación de siRNAs virales (viral small interfering RNAs, vsiRNAs) que pueden, a su vez, actuar silenciando el propio genoma viral. Por esta razón, los virus son tanto inductores como dianas del silenciamiento por RNA. Mientras que en virus de DNA, los vsiRNAs podrían provenir de dsRNAs generados durante la transcripción bidireccional de sus genomas (Chellappan *et al.*, 2004), en virus de RNA, los vsiRNAs podrían generarse a partir de dsRNAs generados durante el proceso de replicación viral. En este último caso se ha propuesto también que la presencia de regiones del genoma altamente estructuradas, podría constituir una fuente de generación de vsiRNAs (Molnár *et al.*, 2005). Sin embargo, estudios recientes han mostrado que la mayor parte de los vsiRNAs se generarían por la acción de RDR celulares, siendo por tanto su biogénesis similar a la descrita para los siRNAs endógenos (Díaz-Pendón *et al.*, 2007; Donaire *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2009; García-Ruiz *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010).

En *A. thaliana*, las cuatro proteínas DCL identificadas están involucradas en la biogénesis de vsiRNAs. En el caso de virus RNA, el papel esencial en defensa antiviral lo tienen DCL4 y DCL2 (Ding y Voinnet, 2007) generando vsiRNAs de 21 y 22 nt, respectivamente. De las dos, DCL4 parece tener un papel dominante, ya que los vsiRNAs de 21 nt son generalmente más abundantes que los de 22 nt. Esta predominancia de DCL4 sobre DCL2 podría también ser debida a un efecto más potente en silenciamiento antiviral de los vsiRNAs de 21 nt con respecto a los de 22 (Wang *et al.*, 2011). En el caso de DCL3, aunque hay indicaciones que sugieren que puede

contribuir en defensa antiviral, especialmente si DCL4 es inactivada (Díaz-Pendón *et al.*, 2007; Qu *et al.*, 2008; Donaire *et al.*, 2008; García-Ruiz *et al.*, 2010) esta contribución parece no ser muy relevante (Deleris *et al.*, 2006; García-Ruiz *et al.*, 2010). También la contribución de DCL1 a la generación de vsiRNAs parece ser minoritaria (Dunoyer *et al.*, 2005; Deleris *et al.*, 2006; García-Ruiz *et al.*, 2010). En el caso de virus DNA, las cuatro proteínas DCL están implicadas en la biogénesis de vsiRNAs (Blevins *et al.*, 2006; Moissiard y Voinnet, 2006).

Los vsiRNAs generados se asocian con el complejo antiviral RISC del que AGO forma parte, produciéndose el reconocimiento de las dianas virales y su corte. De entre los 10 miembros de AGO identificadas en *A. thaliana*, AGO1 parece ser el más importante en defensa antiviral, aunque también se ha descrito la participación de AGO2, AGO3, AGO4, AGO5 y AGO7 (Morel *et al.*, 2002; Qu *et al.*, 2008; Chiu *et al.*, 2010; Jaubert *et al.*, 2011; Brosseau and Moffett, 2015). Se ha propuesto que AGO1 formaría parte de una primera línea de defensa antiviral, mientras que otras proteínas AGO actuarían en una segunda fase (Harvey *et al.*, 2011; Qu *et al.*, 2008).

De los vsiRNAs producidos durante el proceso de silenciamiento, sólo una pequeña fracción resulta de la acción de corte de DCL sobre la diana inicial. Existe un proceso de amplificación de la señal de silenciamiento mediado por RDR, que resulta en la generación de vsiRNAs secundarios (Voinnet, 2008). De las seis proteínas RDR identificadas en *A. thaliana*, RDR1, RDR2 y RDR6 parecen estar implicadas en respuesta antiviral (Dalmay *et al.*, 2000; Mourrain *et al.*, 2000; Díaz-Pendón *et al.*, 2007; García-Ruiz *et al.*, 2010; Qu *et al.*, 2008; Donaire *et al.*, 2008). Entre ellas, el papel de RDR6 es especialmente importante, ya que se ha observado que una disminución en la actividad de esta enzima, hace que aumente la susceptibilidad a un gran número de virus (Mourrain *et al.*, 2000; Qu *et al.*, 2005; Schwach *et al.*, 2005).

En plantas, el silenciamiento inducido en una célula puede moverse célula a célula y a largas distancias alcanzando tejidos distales. Así, si la señal de silenciamiento se propaga de un modo más rápido del que lo hace el virus, los tejidos distales estarán alertados y de este modo tendrán la capacidad de resistir a la invasión viral (Ding y Voinnet, 2007). El silenciamiento sistémico, cuya amplificación está mediada por RDR6, juega un papel muy importante en defensa antiviral, ya que previene la invasión viral del meristemo (Schwach *et al.*, 2005). Esta exclusión del meristemo es especialmente importante en defensa antiviral, ya que puede facilitar tanto la recuperación de la planta como prevenir la transmisión por semillas.

2.4. Supresión viral del silenciamiento

2.4.1. Características generales

Para contrarrestar el silenciamiento por RNA, los virus han evolucionado codificando en su genoma proteínas supresoras del silenciamiento. El primer supresor de silenciamiento viral descrito fue la proteína HCPro de potyvirus (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Brigneti *et al.*, 1998; Kasschau y Carrington, 1998). Desde entonces distintas aproximaciones han permitido identificar un gran número de supresores virales (Tabla 1). Así, se ha propuesto que los virus de plantas codifican en su genoma al menos un supresor del silenciamiento, aunque en algunos casos codifican más de uno como ocurre en los géneros *Closterovirus*, *Crinivirus* y *Begomovirus* (Díaz-Pendón y Ding, 2008; Csorba *et al.*, 2015). Los supresores del silenciamiento, incluso dentro de la misma familia o grupo viral, son muy diversos tanto en secuencia como en estructura. Esta alta diversidad sugiere que han evolucionado de manera independiente y que son el resultado de recientes procesos evolutivos (Ding y Voinnet, 2007). Muchas de estas proteínas supresoras son multifuncionales, es decir además de cumplir con las funciones del ciclo viral, interfieren con la ruta de silenciamiento del huésped (Voinnet, 2005), aunque también han sido descritas proteínas supresoras cuya única función es la supresión del silenciamiento. Los mecanismos de acción de los supresores son tan diversos que pueden interferir con cualquier etapa de la ruta de silenciamiento. Así mismo, cada vez existen más casos en que se describe que un mismo supresor viral es capaz de interferir en distintas etapas de la ruta de silenciamiento, acentuando de este modo la efectividad de la supresión. Otra estrategia usada por los virus de planta para suprimir de un modo más efectivo el silenciamiento por RNA es, como hemos comentado más arriba, la producción de varias proteínas supresoras que podrían actuar en distintos puntos de la ruta de silenciamiento complementándose entre sí. Esta última estrategia es la adoptada por el virus objeto de este estudio, el crinivirus (género *Crinivirus*, familia *Closteroviridae*) *Tomato chlorosis virus* (ToCV) (Cañizares *et al.*, 2008).

2.4.2. Mecanismos moleculares de supresión del silenciamiento

Los detalles de los mecanismos moleculares subyacentes a la actividad específica de los supresores virales se conocen en muy pocos casos. En general, contrarrestan el silenciamiento actuando sobre moléculas de RNA relacionadas con la ruta o interactuando con los componentes proteicos de ésta (Tabla 1).

Tabla 1. Los supresores más representativos codificados por virus de ssRNA de plantas

Familia	Género	Virus	Supresor	Otras funciones	Mecanismo de supresión	Referencia
<i>Benyviridae</i>	<i>Benyvirus</i>	BNYVV	p14	Movimiento a larga distancia del virus	Desconocido	Guilley <i>et al.</i> , 2009; Andika <i>et al.</i> , 2012; Chiba <i>et al.</i> , 2013
			p31	Transmisión por vectores	Desconocido	Rahim <i>et al.</i> , 2007
		BSBMV	p14	Desconocida	Desconocido	Chiba <i>et al.</i> , 2013
		BdMoV	p13	Desconocida	Desconocido	Guilley <i>et al.</i> , 2009; Andika <i>et al.</i> , 2012
<i>Bromoviridae</i>	<i>Cucumovirus</i>	CMV	2b	Especificidad de huésped, movimiento, interacción con Catalasa 3 en tejidos infectados	Unión a siRNAs y miRNAs, unión a AGO1 y AGO4, represión de la expresión de AGO1 por inducción transcripcional de miR168, represión de la expresión de AGOs y DCL1	Li <i>et al.</i> , 1999; Ji y Ding, 2001; Zhang <i>et al.</i> , 2006; Goto <i>et al.</i> , 2007; Díaz-Pendón <i>et al.</i> , 2007; Lewsey <i>et al.</i> , 2007; Ahn <i>et al.</i> , 2010; Inaba <i>et al.</i> , 2011; Ziebell <i>et al.</i> , 2011; González <i>et al.</i> , 2012; Duan <i>et al.</i> , 2012; Hamera <i>et al.</i> , 2012; Feng <i>et al.</i> , 2013; Várallyay y Havelda, 2013; Nemes <i>et al.</i> , 2014
						TAV
	<i>Ilarvirus</i>	AV-2	2b	Desconocida	Suprime el silenciamiento sistémico	Shimura <i>et al.</i> , 2013
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Tospovirus</i>	TSWV	NSs	Factor de avirulencia	Unión a dsRNAs de tamaño largo, unión a siRNAs y miRNAs	Schnettler <i>et al.</i> , 2010; Zhai <i>et al.</i> , 2014; Ronde <i>et al.</i> , 2014
		GBNV	NSs	Desconocida	Desconocido	Goswami <i>et al.</i> , 2012
<i>Closteroviridae</i>	<i>Closterovirus</i>	BYSV	p22	Desconocida	Desconocido	Reed <i>et al.</i> , 2003
		BYV	p21	Desconocida	Unión a siRNAs y miRNAs, bloquea la metilación mediada por HEN1	Reed <i>et al.</i> , 2003; Chapman <i>et al.</i> , 2004; Mérai <i>et al.</i> , 2006; Yu <i>et al.</i> , 2006; Lakatos <i>et al.</i> , 2006
		CTV	p20	Desconocida	Suprime el silenciamiento intracelular e intercelular	Lu <i>et al.</i> , 2004
			p23	Controla la acumulación asimétrica de cadenas de polaridad positiva y negativa del RNA viral	Suprime el silenciamiento intracelular	Lu <i>et al.</i> , 2004; Ruiz-Ruiz <i>et al.</i> , 2013
			CP	Proteína de la cápsida	Suprime el silenciamiento intercelular	Lu <i>et al.</i> , 2004.
		GLRaV-2	p24	Desconocida	Desconocido	Chiba <i>et al.</i> , 2006.
	<i>Ampelovirus</i>	GLRaV-3	p19.7	Desconocida	Interfiere en la ruta de los siRNAs y miRNAs	Gouveia y Nolasco, 2012; Gouveia <i>et al.</i> , 2012
	<i>Crinivirus</i>	CYSDV	p25	Desconocida	Actúa aguas abajo de la generación de siRNAs	Kataya <i>et al.</i> , 2009
		SPCSV	p22	Desconocida	Suprime el silenciamiento intracelular	Kreuze <i>et al.</i> , 2005
			RNasaIII	Desconocida	Degrada dsRNAs <i>in vitro</i>	Kreuze <i>et al.</i> , 2005; Cuellar <i>et al.</i> , 2009; Weinheimer <i>et al.</i> , 2015
		ToCV	p22	Controla la acumulación asimétrica de cadenas de polaridad positiva y negativa del RNA1 viral	Unión a dsRNAs de tamaño largo, bloqueando la acción de corte de Dicer	Cañizares <i>et al.</i> , 2008; Landeo-Ríos <i>et al.</i> , 2016; Landeo-Ríos <i>et al.</i> , sin publicar
			CP	Proteína de la cápsida, interacciona con SAHH	Desconocido	Cañizares <i>et al.</i> , 2008; Cañizares <i>et al.</i> , 2013
	CPm		Proteína de la cápsida menor	Desconocido	Cañizares <i>et al.</i> , 2008	
LCV	p23	Desconocida	Desconocido	Kubota y Ng, sin publicar		

Familia	Género	Virus	Supresor	Otras funciones	Mecanismo de supresión	Referencia
Flexiviridae	Carlavirus	SPCFV	NaBp	Desconocida	Suprime el silenciamiento a nivel local y sistémico	Deng <i>et al.</i> , 2015
		CVB	p12	Factor de transcripción	Desconocido	Lukhovitskaya <i>et al.</i> , 2014
		PVM	CRP	Desconocida	Suprime el silenciamiento a nivel local y sistémico	Senshu <i>et al.</i> , 2011
			TGBp1	Movimiento	Suprime el silenciamiento a nivel sistémico	
	Potexvirus	PVX	p25	Movimiento	Suprime el silenciamiento a nivel sistémico, degrada AGO1	Bayne <i>et al.</i> , 2005; Chiu <i>et al.</i> , 2010; Yan <i>et al.</i> , 2012
		PIAMV	TGBp1	Movimiento	Inhibe la síntesis del dsRNA dependiente de SGS3/RDR6	Senshu <i>et al.</i> , 2009; Okano <i>et al.</i> , 2014
		AV3	TGBp1	Movimiento	Desconocido	Senshu <i>et al.</i> , 2009
		WcIMV	TGBp1	Movimiento	Desconocido	
		TVX	TGBp1	Movimiento	Desconocido	
		PepMV	TGBp1	Movimiento, interacciona con Catalasa 1 en tomate	Desconocido	Mathioudakis <i>et al.</i> , 2013, 2014
	CP		Proteína de la cápsida	Bloquea la señal sistémica de silenciamiento	Mathioudakis <i>et al.</i> , 2014	
	Trichovirus	ACLSV	p50	Movimiento	Bloquea la señal sistémica de silenciamiento	Yaegashi <i>et al.</i> , 2007, 2008
	Vitivirus	GVA	p10	Movimiento	Unión a siRNAs	Chiba <i>et al.</i> , 2006; Zhou <i>et al.</i> , 2006
Luteoviridae	Polerovirus	PLRV	p0	Elicitor de HR	Suprime el silenciamiento a nivel local y sistémico, desestabilizando a AGO1	Fusaro <i>et al.</i> , 2012; Wang <i>et al.</i> , 2014
		CYDV	p0	Desconocida	Suprime el silenciamiento a nivel local y sistémico desestabilizando a AGO1	Fusaro <i>et al.</i> , 2012
		BWYV	p0	Desconocida	Desestabilización de AGO1	Baumberger <i>et al.</i> , 2007; Bortolamiol <i>et al.</i> , 2007; Hendelman <i>et al.</i> , 2013
		BMYV	p0	Desconocida	Suprime el silenciamiento a nivel local	Kozłowska-Makulska <i>et al.</i> , 2010.
		TuYV	p0	Elicitor de HR	Suprime el silenciamiento a nivel local	Kozłowska-Makulska <i>et al.</i> , 2010; Wang <i>et al.</i> , 2014
		MABYV	p0	Desconocida	Suprime el silenciamiento a nivel local	Han <i>et al.</i> , 2010
		SCYLV	p0	Desconocida	Suprime el silenciamiento a nivel local y sistémico	Mangwende <i>et al.</i> , 2009
		CLRDV	p0	Desconocida	Suprime el silenciamiento a nivel local, inhibe la generación de siRNAs secundarios	Delfosse <i>et al.</i> , 2014
		CABYV	p0	Elicitor de HR	Inhibe la producción de siRNAs secundarios, desestabiliza a AGO1	Pazhouhandeh <i>et al.</i> , 2006; Bortolamiol <i>et al.</i> , 2007; Wang <i>et al.</i> , 2014
	Enamovirus	PEMV-1	p0	Desconocida	Suprime el silenciamiento a nivel local y sistémico, desestabilizando a AGO1	Fusaro <i>et al.</i> , 2012

Familia	Género	Virus	Supresor	Otras funciones	Mecanismo de supresión	Referencia
<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	TEV	HCPro	Transmisión por pulgones, movimiento, proteinasa	Unión a siRNAs, bloqueo de la metiltransferasa HEN1, represión de la expresión de AGO1 por inducción transcripcional de miR168, bloqueo de la biogénesis de siRNAs primarios a través de la interacción con el factor de transcripción RAV2	Anandalakshmi <i>et al.</i> , 1998; Kasschau y Carrington, 1998; Llave <i>et al.</i> , 2000; Mallory <i>et al.</i> , 2001; Lakatos <i>et al.</i> , 2006; Mérai <i>et al.</i> , 2006; Torres-Barceló <i>et al.</i> , 2008, 2010; Lozsa <i>et al.</i> , 2008; Endres <i>et al.</i> , 2010; Várallyay y Havelda, 2013
		SCMV	HCPro	Transmisión por pulgones, movimiento, proteinasa, interacción con ferredoxina-5	Represión de la expresión de RDR6, inhibición de la génesis de siRNAs 3' secundarios	Zhang <i>et al.</i> , 2008; Cheng <i>et al.</i> , 2008
		ZYMV	HCPro	Transmisión por pulgones, movimiento, proteinasa	Unión a siRNAs, unión a HEN1, inhibición de HEN1	Shiboletch <i>et al.</i> , 2007; Jamous <i>et al.</i> , 2011
		TuMV	HCPro	Transmisión por pulgones, movimiento, proteinasa	Interfiere en la biogénesis de los siRNAs, bloquea la metilación mediada por HEN1	Dunoyer <i>et al.</i> , 2004; Chapman <i>et al.</i> , 2004; Kasschau <i>et al.</i> , 2003; Yu <i>et al.</i> , 2006; García-Ruiz <i>et al.</i> , 2010
		PRSV	HCPro	Transmisión por pulgones, movimiento, proteinasa, interacción con calreticulina	Unión a sRNAs	Shen <i>et al.</i> , 2010; Sahana <i>et al.</i> , 2014
		PVA	HCPro	Transmisión por pulgones, movimiento, proteinasa	Interacción con HIP2	Haikonen <i>et al.</i> , 2013b
		PVY	HCPro	Transmisión por pulgones, movimiento, proteinasa, interacción con el factor relacionado con la división del cloroplasto NtMinD, interacción con SAHH	Unión a siRNAs	Brigneti <i>et al.</i> , 1998; Canto <i>et al.</i> , 2002; Jin <i>et al.</i> , 2007; Cañizares <i>et al.</i> , 2013
		PPV	HCPro-P1	Transmisión por pulgones, movimiento, proteinasa	Desconocido	Valli <i>et al.</i> , 2006
	PVA	VPg	Transmisión por pulgones, movimiento, proteinasa	Interacción con SGS3	Rajamaki y Valkonen, 2009; Rajamaki <i>et al.</i> , 2014	
	<i>Ipomovirus</i>	SPMMV	P1	Proteinasa	Unión a AGO1	Giner <i>et al.</i> , 2010; Szabo <i>et al.</i> , 2012
		CVYV	P1b	Proteinasa	Unión a siRNAs	Valli <i>et al.</i> , 2008; Valli <i>et al.</i> , 2011
	<i>Rymovirus</i>	AgMV	HCPro	Transmisión por pulgones, movimiento, proteinasa	Desconocido	Young <i>et al.</i> , 2012
		HoMV	HCPro	Transmisión por pulgones, movimiento, proteinasa	Desconocido	
	<i>Tritimovirus</i>	ONMW	P1	Proteinasa	Desconocido	
		WSMV	P1	Proteinasa	Desconocido	
	<i>Poacevirus</i>	TriMV	P1	Proteinasa	Desconocido	Tatineni <i>et al.</i> , 2012
SCSMV		P1	Proteinasa	Desconocido		



Familia	Género	Virus	Supresor	Otras funciones	Mecanismo de supresión	Referencia
<i>Secoviridae</i>	<i>Comovirus</i>	CPMV	S-CP	Proteína de la cápsida	Actúa aguas abajo de la generación de siRNAs	Liu <i>et al.</i> , 2004; Cañizares <i>et al.</i> , 2004
	<i>Nepovirus</i>	ToRSV	CP	Proteína de la cápsida	Interviene en la degradación de AGO1	Karran y Sanfaçon, 2014
<i>Tombusviridae</i>	<i>Tombusvirus</i>	CIRV	p19	Movimiento	Unión a siRNAs, represión de la expresión de AGO1 por inducción transcripcional de miR168, interfiere en la generación de siRNAs secundarios	Vargason <i>et al.</i> , 2003; Koukiekoloa <i>et al.</i> , 2007; Lózsza <i>et al.</i> , 2008; Cheng <i>et al.</i> , 2009; Xia <i>et al.</i> , 2009; Rawlings <i>et al.</i> , 2011; Law <i>et al.</i> , 2013; Várallyay <i>et al.</i> , 2014
		TBSV	p19	Movimiento, elicitor de HR, interacción con proteínas ALY	Unión a siRNAs, interferencia con la metilación del extremo 3' de miRNAs	Voinnet <i>et al.</i> , 1999; Omarov <i>et al.</i> , 2006; Dunoyer <i>et al.</i> , 2004; Ye <i>et al.</i> , 2003; Yu <i>et al.</i> , 2006; Chapman <i>et al.</i> , 2004; Ángel y Schoelz, 2013; Hsieh <i>et al.</i> , 2009; Park <i>et al.</i> , 2004; Uhrig <i>et al.</i> , 2004
		CymRSV	p19	Movimiento	Represión de la expresión de AGO1 por inducción transcripcional de miR168	Silhavy <i>et al.</i> , 2002; Mérai <i>et al.</i> , 2006; Lakatos <i>et al.</i> , 2006; Havelda <i>et al.</i> , 2005; Várallyay <i>et al.</i> , 2010; Várallyay y Halveda, 2013
		CNV	p20	Desconocida	Desconocido	Hao <i>et al.</i> , 2011
	<i>Carmovirus</i>	TCV	p38	Proteína de la cápsida, elicitor de HR, interacción con TIP	Unión a AGO1 y 2, unión a dsRNAs de tamaño largo y corto, boqueo de la biogénesis de siRNAs primarios a través de la interacción con el factor de transcripción RAV2, inhibición de la metilación de sRNAs, interferencia con DCL4, represión de la expresión de AGO1 por inducción transcripcional de miR168	Ren <i>et al.</i> , 2000; Thomas <i>et al.</i> , 2003; Qu <i>et al.</i> , 2003; Mérai <i>et al.</i> , 2006; Deleris <i>et al.</i> , 2006; Jeong <i>et al.</i> , 2008; Jin y Zhu, 2010; Endres <i>et al.</i> , 2010; Azevedo <i>et al.</i> , 2010; Zhang <i>et al.</i> , 2012; Várallyay y Havelda, 2013; Zhu <i>et al.</i> , 2013, 2014; Donze <i>et al.</i> , 2014; Pérez-Cañamás y Hernández, 2015
		HCRSV	CP	Proteína de la cápsida	Reduce la acumulación de siRNAs	Meng <i>et al.</i> , 2006, 2008
		PFVB	CP	Proteína de la cápsida	Unión a siRNAs	Martínez-Turiño y Hernández, 2009
		MNSV	p7b	Movimiento	Desconocido	Genovés <i>et al.</i> , 2006, 2011
		MNSV	p42	Proteína de la cápsida	Desconocido	Genovés <i>et al.</i> , 2006
	<i>Dianthovirus</i>	RCNMV	p27/p88	Replicación	Incorporación de DCL en el complejo de replicación	Takeda <i>et al.</i> , 2005
		RCNMV	MP	Movimiento	Desconocido	Powers <i>et al.</i> , 2008
	<i>Aureusvirus</i>	PoLV	p14	Desconocida	Unión a dsRNAs de tamaño largo y corto	Mérai <i>et al.</i> , 2005, 2006
	No asignado	PLPV	CP	Proteína de la cápsida	Unión a sRNAs	Pérez-Cañamás y Hernández, 2015

Familia	Género	Virus	Supresor	Otras funciones	Mecanismo de supresión	Referencia
Tymoviridae	<i>Tymovirus</i>	TYMV	p69	Movimiento	Inhibe la metilación del DNA, induce la expresión de miRNAs y DCL1	Chen <i>et al.</i> , 2004
	<i>Marafivirus</i>	MRFV	CP	Proteína de la cápsida	Desconocido	Hammond y Hammond, 2013
Virgaviridae	<i>Furovirus</i>	SBWMV	19K	Desconocida	Desconocido	Te <i>et al.</i> , 2005
		CWMV	19K	Desconocida	Desconocido	Sun <i>et al.</i> , 2013a, b
	<i>Pecluvirus</i>	PCV	p15	Desconocida	Unión a siRNAs	Dunoyer <i>et al.</i> , 2002, 2004; Mérai <i>et al.</i> , 2006
	<i>Hordeivirus</i>	BSMV	$\gamma\beta$	Desconocida	Unión a siRNAs	Yelina <i>et al.</i> , 2002; Mérai <i>et al.</i> , 2006
		PSLV	$\gamma\beta$	Desconocida	Desconocido	Yelina <i>et al.</i> , 2002
	<i>Tobamovirus</i>	TMV	p126	Replicación	Interfiere con la metilación de siRNAs mediada por HEN1	Ding <i>et al.</i> , 2004; ; Vogler <i>et al.</i> , 2007; Harries <i>et al.</i> , 2008; Wang <i>et al.</i> , 2012
			p122	Replicación	Unión a siRNAs y miRNAs, represión de la expresión de AGO1 por inducción transcripcional de miR168	Csorba <i>et al.</i> , 2007; Várallyay y Havelda, 2013
		YoMV	p126	Replicación	Interfiere con la metilación de siRNAs mediada por HEN1	Vogler <i>et al.</i> , 2007; Hu <i>et al.</i> , 2011
		ToMV	p130	Replicación	Unión a siRNAs	Kubota <i>et al.</i> , 2003
	<i>Tobravirus</i>	TRV	16K	Permite la entrada transitoria del virus al meristemo del huésped	Actúa aguas abajo de la generación de siRNAs	Martín-Hernández y Baulcombe, 2008; Martínez-Priego <i>et al.</i> , 2008; Andika <i>et al.</i> , 2012
			29K	Movimiento	Desconocido	Deng <i>et al.</i> , 2013
		PepRSV	12K	Desconocida	Desconocido	Jaubert <i>et al.</i> , 2011
No asignada	<i>Sobemovirus</i>	CfMV	p1	Desconocida	Suprime el silenciamiento local y sistémico	Sarmiento <i>et al.</i> , 2007
			CP	Proteína de la cápsida	Desconocido	Olsper <i>et al.</i> , 2010, 2014
		RYMV	P1	Desconocida	Reduce la acumulación de siRNAs de 21-24nt	Lacombe <i>et al.</i> , 2010; Weinheimer <i>et al.</i> , 2010; Gillet <i>et al.</i> , 2013
No asignada	<i>Tenuivirus</i>	RHBV	NS3	Desconocida	Unión a siRNAs y miRNAs	Hemmes <i>et al.</i> , 2007
		RSV	NS3	Desconocida	Unión a dsRNAs de tamaño largo y corto	Xiong <i>et al.</i> , 2009; Shen <i>et al.</i> , 2010
			P2	Desconocida	Interacciona con SGS3	Du <i>et al.</i> , 2011

Entre los distintos mecanismos de acción descritos para supresores virales de silenciamiento encontramos:

Unión a dsRNA

Dado el papel clave que los dsRNAs juegan en la ruta de silenciamiento, es esperable que cualquier mecanismo que impida su actuación, comprometa la efectividad de la misma. De este modo, uno de los mecanismos de acción más comunes de los supresores de silenciamiento es la unión a dsRNAs (Lakatos *et al.*, 2006; Mérai *et al.*, 2006). Dependiendo de si se unen a dsRNAs de tamaño largo o de tamaño corto, se afectarán distintas etapas de la ruta. Así, si el supresor se une a dsRNAs de tamaño largo, la enzima Dicer no podrá acceder a su sustrato, y la digestión del mismo se verá afectada. Por otra parte, la unión a dsRNAs pequeños (siRNAs) puede impedir que éstos se carguen al complejo RISC, inhibiendo por tanto esta etapa de la ruta. Entre el grupo de supresores que unen dsRNAs de tamaño largo encontramos la proteína P14 del aureusvirus (género *Aureusvirus*, familia *Tombusviridae*) *Photos latent virus* (PoLV), la proteína P38 del carmovirus (género *Carmovirus*, familia *Tombusviridae*) *Turnip crinkle virus* (TCV) (Mérai *et al.*, 2006), y la proteína NS_s del tospovirus (género *Tospovirus*, familia *Bunyaviridae*) *Tomato spotted wilt virus* (Schnettler *et al.*, 2010). Estos supresores también son capaces de unir siRNAs, siendo ésta la estrategia más comúnmente utilizada por las proteínas supresoras de silenciamiento de los virus de plantas (Chapman *et al.*, 2004; Mérai *et al.*, 2006; Csorba *et al.*, 2007; Goto *et al.*, 2007; Kurihara *et al.*, 2007; Martínez-Turiño y Hernández, 2009; Schnettler *et al.*, 2010). Entre las evidencias experimentales que apoyan que esta unión a siRNAs interferiría con su carga en el complejo RISC, encontramos las descritas para las proteínas p19 de tombusvirus (género *Tombusvirus*, familia *Tombusviridae*), p21 de closterovirus (género *Closterovirus*, familia *Closteroviridae*), NS3 de tenuivirus (género *Tenuivirus*), HCPro de potyvirus (género *Potyvirus*, familia *Potyviridae*) y P122 de tobamovirus (género *Tobamovirus*, familia *Virgaviridae*) (Lakatos *et al.*, 2006; Csorba *et al.*, 2007; Hemmes *et al.*, 2007). Como consecuencia de la unión del supresor a siRNAs, se interferiría en la metilación de los mismos por parte de la enzima HEN1, afectándose así su estabilidad (Vogler *et al.*, 2007; Csorba *et al.*, 2007; Lózsa *et al.*, 2008). Probablemente, el supresor mejor caracterizado entre los que unen siRNAs es la proteína p19 de tombusvirus (Silhavy *et al.*, 2002). Estudios cristalográficos han mostrado que p19 forma un homodímero que selecciona específicamente siRNAs de 21

y 22 nt de tamaño (Vargason *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2003). El secuestro de siRNAs por parte de p19, bloquearía la formación de complejos RISC activos (Lakatos *et al.*, 2006), e interferiría en el movimiento sistémico de la señal de silenciamiento (Dunoyer *et al.*, 2010; Molnár *et al.*, 2010). Una estrategia totalmente distinta a la unión a siRNAs, aunque con el mismo resultado, es llevada a cabo por la proteína supresora RNasa III del crinivirus *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV). Así, el corte de los siRNAs virales de 21 a 24 nt en productos de 14 nt mediado por la actividad endonucleasa de la proteína RNasa III, hace que éstos sean inactivos no pudiendo ser incorporados en el complejo RISC (Cuellar *et al.*, 2009).

Interferencia con DCL

Los supresores virales que actúen directamente inhibiendo la maquinaria enzimática implicada en el procesamiento de dsRNAs, actuarán afectando la eficiencia de corte de DCL. Así, el factor DRB4 (dsRNA binding protein 4), que se requiere para el procesamiento de vsiRNAs mediado por DCL4, constituye la diana de varios supresores virales que se unen a él, inhibiéndolo. Como consecuencia de la interacción con este factor auxiliar de DCL4, se inhibe la formación de vsiRNAs de 21 nt (Hiraguri *et al.*, 2005; Deleris *et al.*, 2006; Haas *et al.*, 2008; Qu *et al.*, 2008; Shivaprasad *et al.*, 2008). Otra estrategia que también resultaría en la interferencia de la acción de corte de DCL, es la utilizada por el dianthovirus (género *Dianthovirus*, familia *Tombusviridae*) *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV). Así, la incorporación de DCL en el complejo de replicación de RCNMV conduciría a su inhibición (Takeda *et al.*, 2005).

Interacción con proteínas AGO

El bloqueo de complejos RISC funcionales puede llevarse a cabo por medio de la unión directa a la unidad catalítica AGO (Zhang *et al.*, 2006), su desestabilización o degradación (Pazhouhandeh *et al.*, 2006; Baumberger *et al.*, 2007; Bortolamiol *et al.*, 2007). La primera proteína supresora en la que se describió la unión a AGO1 y AGO4 *in vivo* fue la proteína 2b del cucumovirus (género *Cucumovirus*, familia *Bromoviridae*) *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Zhang *et al.*, 2006; González *et al.*, 2010; Hamera *et al.*, 2012). Así, el que la interacción con AGO1 resulte en la inhibición de la actividad de corte de AGO1 (Zhang *et al.*, 2006), sugiere que podría estar implicada en la prevención de la amplificación y dispersión de vsiRNAs (Zhang *et al.*, 2006; Goto *et al.*, 2007). Por su parte, la interacción con AGO4 que actúa uniendo siRNAs de 24-nt de origen endógeno que participan en RdDM, reduciría el acceso de los siRNAs a su diana

endógena, modulándose de este modo la transcripción de genes del huésped en beneficio del virus (Hamera *et al.*, 2012). Por otra parte, la proteína supresora P0 de polerovirus (género *Polerovirus*, familia *Luteoviridae*), contiene un dominio tipo F-box, típico de factores celulares relacionados con la ubiquitinación y la degradación de proteínas, que tiene como diana AGO1 y cuyo papel sería promover su degradación (Pazhouhandeh *et al.*, 2006; Baumberger *et al.*, 2007; Bortolamiol *et al.*, 2007; Csorba *et al.*, 2010). En el caso del nepovirus (género *Nepovirus*, familia *Secoviridae*) *Tomato ringspot virus* (ToRSV), la proteína supresora CP se uniría a AGO1 promoviendo su degradación por autofagia (Karran y Sanfacon, 2014) y como consecuencia suprimiendo su actividad inhibidora durante la traducción. Por su parte, la proteína p25 del potexvirus (género *Potexvirus*, familia *Flexiviridae*) PVX también interacciona físicamente con AGO (AGO1, 2, 3, y 4), promoviendo su degradación a través de una ruta dependiente del proteosoma (Chiu *et al.*, 2010). Estudios recientes han puesto de manifiesto la existencia de un nuevo tipo de interacción con AGO1 a través de repeticiones aminoacídicas del tipo GW/WG (glicina/triptófano). Este tipo de repeticiones son típicas de proteínas celulares que intervienen en el ensamblaje y/o funcionamiento de los complejos RISC (Karlowski *et al.*, 2010), y los supresores que las contienen pueden interferir por competencia en la formación *de novo* de RISC o en su actividad (Azevedo *et al.*, 2010; Giner *et al.*, 2010). Además de estos dos primeros casos descritos para la proteína p38 del carmovirus TCV y la proteína P1 del ipomovirus (género *Ipomovirus*, familia *Potyviridae*) *Sweet potato mild mottle virus* (SPMMV), se ha descrito que esta estrategia es utilizada también por la proteína p37 del carmovirus *Pelargonium line pattern virus* (PLPV). En este caso, se ha demostrado que estos dominios GW además de implicados en la unión a AGO1, también lo están en la unión a siRNAs, siendo esenciales ambas actividades para que p37 pueda ejercer su actividad supresora (Pérez-Cañamás y Hernández, 2015). Resultados de este mismo trabajo también muestran que los dominios GW/WG de TCV p38, aparte de implicados en la interacción con AGO1 son necesarios para que se mantengan sus propiedades de unión tanto a siRNAs como a dsRNAs de tamaño largo. Estos resultados sugieren que ambas funciones podrían actuar de modo cooperativo; durante la interacción del supresor con AGO se incrementaría el secuestro de dúplex de siRNAs, interfiriendo de este modo con la actividad de RISC.

Modulación de la homeostasis de AGO1

Aunque recientemente descrito, este mecanismo de acción basado en la modulación de la expresión génica del huésped a nivel transcripcional, podría ser una estrategia ubicua en las interacciones virus-planta. AGO1, como se ha comentado anteriormente, es uno de los componentes más importantes de la ruta de silenciamiento implicado en defensa antiviral, cuya homeostasis depende de la expresión de miR168 (Rhoades *et al.*, 2002). Resultados recientes muestran que durante la infección por toombusvirus se produce una inducción de la transcripción de AGO1 como parte del arsenal de respuestas antivirales de la planta. Para contrarrestar un mecanismo de defensa basado en AGO1, el supresor p19 promueve la inducción transcripcional de miR168, que resulta en la disminución de los niveles de expresión de AGO1 (Várallyay *et al.*, 2010). Además de en la infección por toombusvirus, este fenómeno ha sido observado en el caso de otras infecciones virales (Du *et al.*, 2011; Várallyay y Havelda, 2013).

Interferencia en la amplificación de siRNA secundarios

Las proteínas RDR del huésped, en especial RDR1 y RDR6, están implicadas en la amplificación del silenciamiento y en la dispersión de la señal sistémica del mismo mediante la síntesis de vsiRNAs (Schwach *et al.*, 2005). Por tanto, la supresión de la actividad RDR puede constituir un punto clave donde actuar para el supresor, ya que interfiriendo en la amplificación del silenciamiento, la replicación y dispersión viral se verían favorecidas. Entre las proteínas supresoras que actúan en este punto encontramos la proteína V2 del geminivirus (género *Begomovirus*, familia *Geminiviridae*) *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), que interacciona directamente con SGS3, el cofactor de RDR6, bloqueando de este modo la amplificación del silenciamiento (Glick *et al.*, 2008). Estudios *in vitro* realizados con este mismo supresor han mostrado que V2 compete con SGS3 por dsRNAs que contengan extremos 5' protuberantes, que podría constituir un intermediario de RDR6/SGS3 en la amplificación de vsiRNAs (Fukunaga y Doudna, 2009; Kumakura *et al.*, 2009). De igual modo, la proteína TGBp1 de potexvirus inhibe la síntesis de dsRNA dependiente de RDR6/SGS3 (Okano *et al.*, 2014). También, el supresor β C1, codificado por el DNA satélite de *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCNV) interacciona con el supresor endógeno rgsCaM, una proteína celular relacionada con la calmodulina, en *N. benhamiana*, reprimiendo la expresión de RDR6 y por tanto la producción de siRNAs secundarios (Li *et al.*, 2014).

Ensayos de expresión transitoria en *N. benthamiana* mostraron que los supresores HCPro del potivirus *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) y 2b del cucumovirus *Tomato aspermy virus* (TAV), están implicados en la reducción de los niveles de acumulación de mRNA de RDR6 (Zhang *et al.*, 2008). Del mismo modo, el supresor Pns10 del phytoreovirus (género *Phytoreovirus*, familia *Reoviridae*) *Rice dwarf phytoreovirus* (RDV) reduce los niveles de expresión de RDR6, favoreciendo la invasión viral de los ápices (Ren *et al.*, 2010). También la proteína 2b de cucumovirus previene la dispersión de la señal de silenciamiento a larga distancia (Guo y Ding, 2002), inhibiendo la producción de siRNAs secundarios (Wang *et al.*, 2010). Vemos por tanto que una actividad supresora centrada en RDR6, es una estrategia ampliamente utilizada por distintos virus que bloquea de un modo efectivo el silenciamiento antiviral. Como veremos más adelante, esta estrategia también parece ser utilizada por el supresor objeto de este estudio, la proteína p22 de ToCV.

Interacción con reguladores endógenos de la ruta de silenciamiento

Algunos supresores modulan una respuesta defensiva por parte de la planta basada en el silenciamiento por RNA, actuando sobre reguladores endógenos de la ruta de silenciamiento. Entre ellos encontramos a la proteína AL2 de geminivirus que inhibe a la enzima ADK (Adenosina kinase) (Wang *et al.*, 2003), implicada en procesos de metilación. Ya que una parte de la respuesta defensiva contra estos virus implica la metilación de sus genomas, la inhibición de ADK, indirectamente, conseguiría bloquear el proceso de metilación (Wang *et al.*, 2005). Ya que para este grupo de virus de DNA es muy importante evitar la metilación de sus genomas, la interacción e inhibición de otra enzima implicada en el ciclo de metilación como SAHH (S-adenosyl homocysteine hydrolase), sería el factor endógeno sobre el que actuaría el supresor β C1 codificado por el DNA satélite de *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCNV) (Yang *et al.*, 2011). De manera interesante, la proteína de geminivirus mencionada en primer lugar, AL2, también actúa induciendo la expresión e interaccionando con la proteína celular rgs-CaM (Chung *et al.*, 2014). Otro ejemplo de factor endógeno que parece ser diana de diversos supresores no relacionados, es el factor transcripcional inducible por etileno (RAV2) (Endres *et al.*, 2010). En el caso del *Papaya ringspot virus* (PRSV) la proteína supresora HCPro interacciona con calreticulina modulando de este modo la respuesta defensiva antiviral a través de la ruta de señalización del calcio (Shen *et al.*, 2010). Por su parte la proteína HCPro de los potyvirus *Potato virus A* (PVA), *Potato virus Y* (PVY)

y *Tobacco etch virus* (TEV) interacciona con una proteína asociada al microtúbulo (HIP2), a través de su región altamente variable (HVR). Así, mientras que la reducción de HIP2 está asociada con una disminución de los niveles de acumulación viral, mutaciones en el dominio HVR de HCPro provocan una inducción sistémica mediada por etileno y ácido jasmónico de genes de defensa de la planta y necrosis (Haikonen *et al.*, 2013a,b).

2.4.3. Supresores virales como determinantes de patogenicidad. Sinergismo viral

El que un virus sea capaz de replicarse en un huésped, no necesariamente va unido al hecho de que sea patogénico. La patogénesis tiene lugar cuando una infección viral afecta a la fisiología del huésped causando alteraciones en el desarrollo y otras manifestaciones fenotípicas, que son consideradas como síntomas de la enfermedad (Culver y Padmanabhan, 2007; Pallás y García, 2011; Mandadi y Scholthof, 2013; García y Pallás, 2015). Como hemos visto, los virus, para infectar con éxito una planta, deben hacer frente a una respuesta defensiva basada en el silenciamiento por RNA, proceso que además de funcionar como defensa antiviral está implicado en la regulación de diversos procesos celulares. Para ello, la estrategia más comúnmente utilizada es la de codificar en su genoma proteínas supresoras del silenciamiento (Li y Ding, 2006). Estos supresores, además de funcionar en defensa antiviral, pueden interferir en procesos fisiológicos de la planta que dependen del silenciamiento por RNA, y esta interferencia contribuir a la patogénesis. Así, muchos supresores virales suelen ser considerados como los principales determinantes de patogenicidad tanto en infecciones simples como en infecciones mixtas sinérgicas.

Una de las rutas endógenas de silenciamiento por RNA en planta que más frecuentemente se ve afectada es la de los miRNAs. Como hemos visto, los miRNAs regulan negativamente mRNAs que codifican importantes factores reguladores implicados en procesos de desarrollo, homeostasis de nutrientes y respuestas a estrés (Pasquinelli y Ruvkun, 2002; Carrington y Ambrós, 2003; Zhang *et al.*, 2010). Es por tanto concebible que los supresores puedan ocasionar alteraciones en el desarrollo de procesos, tales como la división celular, la formación de hojas y el desarrollo de la flor, mediante la interferencia en la expresión y la función de los miRNAs, y que estas interferencias puedan resultar en el desarrollo de síntomas de enfermedad (Kasschau *et al.*, 2003). De acuerdo con esto, plantas transgénicas que expresan proteínas supresoras

de silenciamiento, a menudo muestran fenotipos similares a los síntomas virales (Chapman *et al.*, 2004; Chellapan *et al.*, 2005; Jay *et al.*, 2011). Muchos de los supresores de silenciamiento que actúan secuestrando vsiRNAs, pueden interferir en estas rutas endógenas inhibiendo su papel regulador. Como ejemplo encontramos el caso del miRNA167 que resulta en la alteración de la regulación de su diana AUXIN RESPONSE FACTOR 8, y que parece ser especialmente relevante, ya que es el principal factor implicado en la alteración del desarrollo causada por al menos tres proteínas supresoras, HCPro de potyvirus, p19 de tombusvirus y p15 de pecluvirus (género *Pecluvirus*, familia *Virgaviridae*) (Jay *et al.*, 2011). También los genes *R* del tipo NBS-LRR están regulados negativamente por miRNAs para evitar que una expresión incontrolada dispare reacciones autoinmunes deletéreas. Es posible, por tanto, que la inactivación de esos miRNAs por los supresores resulte en un aumento de los niveles de expresión de los genes *R* causando síntomas de enfermedad como la necrosis letal (Weber *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2012; Shivaprasad *et al.*, 2012). La unión e inactivación de otros componentes de la ruta de silenciamiento como las proteínas AGO, estrategia comúnmente utilizada por las proteínas supresoras, puede también producir alteraciones en el desarrollo, como es el caso de la proteína 2b de CMV (Zhang *et al.*, 2006) y de la proteína TGBp1 del carlavirus (género *Carlavirus*, familia *Flexiviridae*) *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) (Okano *et al.*, 2014).

Es importante remarcar que los supresores pueden producir efectos patogénicos que no dependen directamente de su capacidad para suprimir el silenciamiento (Du *et al.*, 2014). Como ejemplo podemos citar, en el caso de geminivirus, el de la proteína supresora β C1 codificada por el DNA satélite asociado con TYLCCV, y el de la proteína C2 que actúan inhibiendo la ruta del ácido jasmónico (Yang *et al.*, 2008; Lozano-Durán *et al.*, 2011). Otros ejemplos de interacción de supresores con factores del huésped que pueden tener un impacto en patogénesis viral son los propuestos para la interacción de la proteína supresora p6 del caulimovirus (género *Caulimovirus*, familia *Caulimoviridae*) *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) con componentes implicados en la ruta de señalización del etileno (Geri *et al.*, 2004), el de la interacción del supresor 2b de CMV con una catalasa del huésped (Inaba *et al.*, 2011) o el de la interacción del supresor HCPro de PVA con la proteína asociada al microtúbulo HIP2 (Haikonen *et al.*, 2013b). También, una función incorrecta del proteosoma como consecuencia de la interacción con el supresor HCPro podría considerarse como otro factor que contribuye

al incremento de la patogenicidad asociado a la actividad de una proteína supresora (Pacheco *et al.*, 2012).

Dada la importancia de la supresión del silenciamiento por RNA para la supervivencia viral, es razonable considerar que los supresores virales podrían ser diana de mecanismos de defensa alternativos que podrían causar importantes síntomas de enfermedad (Pallás y García, 2011; Wang *et al.*, 2012; García y Pallás, 2015). De hecho, algunos supresores como la proteína p6 de CaMV en *Nicotiana clevelandii*, (Kiraly *et al.*, 1999), la proteína p19 de TBSV (Chu *et al.*, 2000) y 2b de TAV (Li *et al.*, 1999) en tabaco, o la proteína CP de TCV en *A. thaliana* (Ren *et al.*, 2000), han sido descritas como inductoras de respuestas necróticas locales o sistémicas similares a las mediadas por los genes *R*. También la proteína HCPro de TEV induce una débil respuesta específica que estimula la resistencia de la planta frente a diversos patógenos (Pruss *et al.*, 2004). Aunque ninguna de estas respuestas es capaz de bloquear completamente la infección viral, son capaces de condicionar el desarrollo de síntomas.

Ya que diferentes supresores de silenciamiento actúan con mecanismos distintos afectando a diversas etapas de la ruta de silenciamiento por RNA, no es sorprendente que en infecciones donde virus de diferentes familias se mezclan se produzca una acentuación de la sintomatología, pudiendo alcanzarse mayores niveles de acumulación viral que en infecciones individuales. Este fenómeno es conocido como sinergismo viral. La mayoría de los estudios de sinergismo viral implican a un virus del género *Potyvirus*. Entre ellos, el caso mejor estudiado es el de la interacción PVX-PVY en *Nicotiana tabacum*, donde se produce tanto una acentuación de la sintomatología como un incremento en los niveles de acumulación de PVX (Vance *et al.*, 1991; Pruss *et al.*, 1997; González-Jara *et al.*, 2004). El incremento en la patogenicidad observado cuando el supresor HCPro fue expresado a partir de un virus heterólogo, mostró que ésta era la secuencia implicada en la interacción sinérgica (Pruss *et al.*, 1997). Sin embargo, cuando el huésped utilizado fue *N. benthamiana* no se observó un incremento en los niveles de acumulación de PVX en plantas co-infectadas con los potyvirus PVY, TEV o *Plum Pox virus* (PPV), a pesar de los severos síntomas observados, donde la aparición de lesiones necróticas sistémicas en hojas y tallos, acababa con la muerte de la planta (González-Jara *et al.*, 2004, 2005). Así, se ha sugerido que el sinergismo entre PVX y potyvirus es dependiente de huésped (González-Jara *et al.*, 2004). De hecho, un reciente estudio en este mismo sistema, ha propuesto cual podría ser el mecanismo implicado en esta interacción sinérgica. De este modo se ha visto que la presencia del potyvirus,

aunque no produce ningún efecto a nivel del RNA genómico de PVX, ayuda a la estabilización de los RNAs subgenómicos permitiendo que se alcance un nivel umbral de expresión de la proteína p25 de PVX, que sería de este modo reconocida por un posible gen *R* presente en *N. benthamiana*. Este reconocimiento es el que dispararía la respuesta que desencadenaría los síntomas observados de necrosis sistémica (Aguilar *et al.*, 2015). De modo general, en las múltiples interacciones sinérgicas descritas en las que un potyvirus está implicado, los niveles de acumulación de potyvirus tales como PVY, TEV, *Tobacco vein mottling virus* (TVMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Pepper mottle virus* (PepMoV) o *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), no se ven afectados, mientras que los del virus heterólogo aumentan (Vance *et al.*, 1995; Pruss *et al.*, 1997; Murphy y Bowen, 2006; Taiwo *et al.*, 2007; Zeng *et al.*, 2007; Fukuzawa *et al.*, 2010). La capacidad que tienen los virus de planta de causar infecciones sinérgicas en diferentes cultivos, tiene implicaciones biológicas, epidemiológicas y económicas. El incremento de la multiplicación de uno o ambos virus implicados, puede alterar la gama de huéspedes o la tasa de transmisión por vectores (Elena, 2011), con las impredecibles consecuencias que ello ocasionaría. Como ejemplo encontramos el caso de la rotura de resistencia observada en plantas de tomate co-infectadas con ToCV y el tospovirus *Tomato spotted wild virus* (TSWV) (García-Cano *et al.*, 2006), el de CMV en plantas de pepino co-infectadas con ZYMV (Wang *et al.*, 2004) y el de un número de virus de batata simultáneamente infectada con el crinivirus SPCSV (Karyeija *et al.*, 2000; Mukasa *et al.*, 2006; Untiveros *et al.*, 2007). A pesar de las serias implicaciones biológicas y epidemiológicas que tienen estas interacciones sinérgicas, los mecanismos moleculares implicados en las mismas apenas se conocen.

3. Familia *Closteroviridae*

3.1. Características generales

La familia *Closteroviridae* comprende virus filamentosos con genomas de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva que presentan el mayor tamaño y complejidad entre los virus de RNA de plantas. Los virus de esta familia están limitados principalmente a floema y solo en algunos casos pueden infectar el mesófilo y la epidermis (Esau, 1960; Esau y Hoefert, 1971; Medina *et al.*, 1998, 1999; Karasev, 2000). Esta limitación se ve reflejada en un bajo rendimiento en la purificación viral, lo

que unido al gran tamaño de su RNA y la incapacidad de la mayoría de ellos de ser transmitidos mecánicamente, ha limitado y retrasado su estudio.

Los miembros de la familia *Closteroviridae* son transmitidos de manera semipersistente por insectos pertenecientes a tres familias del orden *Hemiptera*: *Aphididae* (pulgones), *Aleyrodidae* (moscas blancas) y *Pseudococcidae* (cochinillas), que determinan los tres géneros que hasta la fecha existen en esta familia.

Los virus de esta familia infectan a cultivos de gran importancia económica como cítricos, remolacha, tomate, lechuga, patata, pimiento, batata, piña, cerezo, etc., así como plantas ornamentales y silvestres. Entre los síntomas de las enfermedades causadas por closterovirus se incluyen amarillos, amarotamientos, aclaramiento de las venas y en algunos casos reducción del crecimiento y marchitamiento, que en ocasiones puede dar lugar al colapso de la planta (Karasev, 2000).

Los viriones de los miembros de la familia *Closteroviridae* son grandes y flexuosos con un diámetro de 12 nm y una longitud de hasta 2000 nm aproximadamente. Están compuestos por al menos cinco proteínas que se ensamblan formando una estructura en “serpiente de cascabel” con un largo “cuerpo” de morfología uniforme constituido por la proteína de la cápsida (CP), y una “cola” corta y segmentada integrada por la proteína menor de la cápsida (CPm) como componente principal y otras proteínas como componentes menores (Figura 5) (Boyko *et al.*, 1992; Agranovsky *et al.*, 1995; Febres *et al.*, 1996; Tian *et al.*, 1999; Karasev, 2000; Peremyslov *et al.*, 2004a; Satyanarayana *et al.*, 2004; Rubio *et al.*, 2013). Los miembros de esta familia, exceptuando a *Beet yellow stunt virus*, presentan genomas de gran tamaño que varían entre los 15,5 y 19,5 kb.

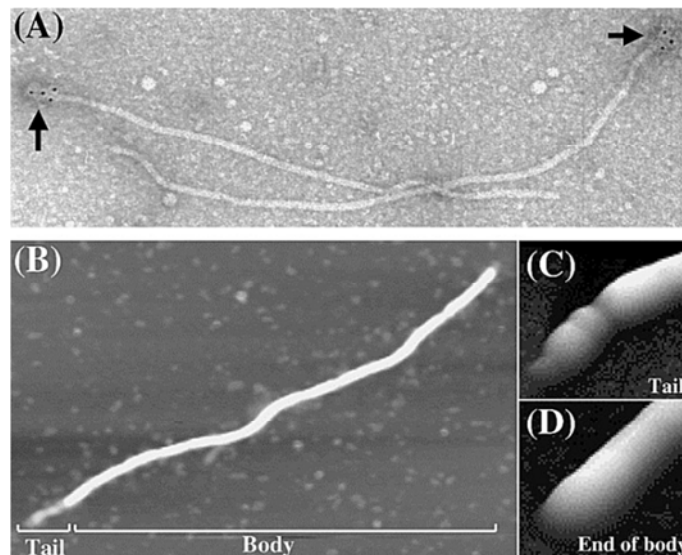


Figura 5. Morfología de los viriones de *Beet yellows virus* (BYV). **A:** Micrografía electrónica de dos viriones de BYV. Las colas de los viriones señaladas con flechas están marcadas mediante técnicas inmunológicas empleando un antisuero específico de la proteína CPm. **B:** Imagen de la partícula del virión de BYV obtenida mediante microscopía de fuerza atómica. **C** y **D:** Reconstrucción tridimensional de los extremos del virión obtenida por microscopía de fuerza atómica (adaptado de Dolja *et al.*, 2003).

Actualmente existen tres géneros aceptados en la familia *Closteroviridae* (Martelli *et al.*, 2012; Rubio *et al.*, 2013): *Ampelovirus*, *Closterovirus* y *Crinivirus*, habiendo sido propuesto un nuevo género llamado *Velarivirus* (Al Rwahnih *et al.*, 2012). Las características más importantes de cada uno de los géneros aceptados se describen a continuación.

Género *Closterovirus*. La mayoría de sus miembros presentan un genoma monopartito de entre 15,5 y 19,3 kb y son transmitidos exclusivamente por pulgones. Entre los miembros de este género encontramos: *Citrus tristeza virus* (CTV), *Beet yellow virus* (BYV), *Beet yellow stunt virus* (BYSV), *Burdock yellows virus* (BuYV), *Carnation necrotic fleck virus* (CNFV), *Carrot yellow leaf virus* (CYLV), *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2), *Mint yellow leaf virus* (MV-1), *Wheat yellow leaf virus* (WYLV).

Género *Ampelovirus*. Presentan un genoma monopartito de entre 16,9 y 19,5 kb y son transmitidos por cochinillas. Pertenecen a este género los virus: *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRaV-1), *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3), *Grapevine leafroll-associated virus 5* (GLRaV-5), *Grapevine leafroll-associated virus*

II (GLRaV-11) (miembro provisional) y *Pineapple mealybug wilt-associated virus I* (PMWaV-1).

Género *Crinivirus*. Presentan un genoma bipartito de entre 15,3 y 19 kb dividido en dos moléculas denominadas RNA1 y RNA2 que se encapsidan por separado. Existe un miembro con genoma tripartito, *Potato yellow vein virus* (PYVV) a cuya tercera molécula se le llama RNA3. Son transmitidos por tres especies de mosca blanca: *Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum* y *Trialeurodes abutilonea*. En el RNA1 se encuentran los genes que codifican las proteínas responsables de la replicación, mientras que en el RNA2 y en el RNA3 de PYVV, se encuentran los genes que codifican las proteínas implicadas en el movimiento viral, la protección del genoma y la interacción virus-vector. En este género encontramos los virus: *Bean yellow disorder virus* (BnYDV), *Beet pseudoyellows virus* (BPYV), *Blackberry yellow vein-associated virus* (BYVaV), *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV), *Lettuce chlorosis virus* (LCV), *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV), *Potato yellow vein virus* (PYVV), *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV), *Strawberry pallidosis-associated virus* (SpaV), *Diodia vein chlorosis virus* (DVCV), *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV), *Tomato chlorosis virus* (ToCV) y *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) (Rubio *et al.*, 2013).

3.2. Organización genómica

El hecho de tener uno de los genomas más grandes de entre los virus de plantas hace que los miembros de esta familia presenten una mayor complejidad estructural y variación genética. Aunque la organización genómica entre los géneros y especies de esta familia es distinta, se distinguen en todos los casos dos bloques principales de genes, uno donde se encuentran los genes implicados en la replicación, y otro donde se encuentran los genes implicados en el ensamblaje del virión, y por tanto en la interacción con el vector, y en el movimiento viral, denominado “Bloque de cinco genes” (QGB) (Dolja *et al.*, 2006).

El bloque de genes implicados en la replicación se localiza en la mitad 5' del genoma de los miembros monopartitos (géneros *Closterovirus* y *Ampelovirus*), y en el RNA1 de los miembros del género *Crinivirus*. El producto del ORF situado más cercano al extremo 5', denominado ORF1a, codifica una poliproteína que posee los

dominios proteasa (PRO), RNA metiltransferasa (MET) y RNA helicasa (HEL). La RdRp está codificada por el siguiente ORF, denominado ORF1b, y probablemente se expresa mediante el desplazamiento de la pauta de lectura del ribosoma un nucleótido (Agranovsky *et al.*, 1994; Karasev *et al.*, 1995). Así, la traducción de RNA genómico daría lugar a dos proteínas de gran tamaño, una que abarca los dominios MET-HEL y otra que incluiría además el dominio RdRp. Esta última de mayor tamaño se produce en menor cantidad debido a la baja frecuencia del desplazamiento del ribosoma (Agranovsky, 1996). El módulo MET-HEL-RdRp está conservado universalmente en toda la superfamilia de virus α , en la que se incluyen los virus con genoma de RNA de polaridad positiva (Koonin y Dolja, 1993; Dolja *et al.*, 2006).

El bloque de cinco genes, característico de los miembros de esta familia, se localiza en la mitad 3' del genoma de los miembros monopartitos (géneros *Closterovirus* y *Ampelovirus*) y en el RNA2 (y RNA3) de los miembros del género *Crinivirus*. (Dolja *et al.*, 2006). En este bloque se incluyen los genes que codifican una proteína hidrofóbica de unos 6-kDa (p6), una proteína homóloga a las de la familia Hsp70 de eucariotas (Hsp70h), una proteína de unos 60-kDa (p60), la proteína menor de la cápsida (CPm) y la proteína de la cápsida (CP). La proteína p6 posee un dominio transmembrana, se localiza en el retículo endoplasmático y estaría implicada en las funciones del movimiento célula a célula del virus (Alzhanova *et al.*, 2000; Peremyslov *et al.*, 2004b). Ya que la proteína p6 no es necesaria para la replicación o el ensamblaje del virus, podría ser considerada una proteína convencional de movimiento (MP) (Alzhanova *et al.*, 2001; Peremyslov *et al.*, 1998) (Figura 6). La proteína de la cápsida recubre aproximadamente el 95% del RNA viral, formando el cuerpo helicoidal de los viriones filamentosos y flexuosos. La cola, que ocuparía el 5% restante, está integrada por las proteínas CPm, como componente principal, y p60 y Hsp70h, como componentes menores. En el caso de BYV, la proteína p20 también forma parte de la cola del virión (unida a Hsp70h) y es necesaria para el transporte sistémico del virus a través del floema (Prokhnovsky *et al.*, 2002). En el caso de LIYV, la proteína CPm está implicada en el movimiento célula a célula, en la formación de la cola de virión y en la transmisión de las partículas virales por *B. tabaci* (Tian *et al.*, 1999; Alzhanova *et al.*, 2001, 2007). La proteína Hsp70h, cuyo origen es eucariota, es homóloga a las chaperonas celulares de la familia de choque térmico Hsp70. En esta proteína se distinguen dos regiones, una amino-terminal y otra carboxilo-terminal. En la primera de ellas se encuentra un dominio ATPasa altamente conservado, mientras que la segunda

presenta un dominio de unión a sustrato con menor grado de conservación (Agranovsky *et al.*, 1991; Boorstein *et al.*, 1994). Ambos dominios están implicados en el ensamblaje del virión (Alzhanova *et al.*, 2001, 2007). Esta proteína ejerce un papel fundamental en la translocación intracelular del virión anclándose a los plasmodesmos en asociación con el citoesqueleto de actina de la célula (Medina *et al.*, 1999; Prokhnevsky *et al.*, 2005). En BYV, la proteína Hsp70h actúa de manera cooperativa con la proteína p64 (homóloga a p59 de crinivirus), que actuaría como cochaperona, para facilitar la incorporación de la proteína CPm e interviene en la definición de la longitud apropiada de la cola que encapsida aproximadamente unos 700 nt de la región 5' terminal del RNA genómico, donde deben localizarse señales reconocidas por la proteína CPm (Peremyslov *et al.* 2004a; Satyanarayana *et al.*, 2004; Alzhanova *et al.*, 2007). Se ha propuesto que la cola del virión es un dispositivo que se originó y evolucionó para facilitar el movimiento de los genomas de gran tamaño de los closterovirus, tanto célula a célula como de manera sistémica (Alzhanova *et al.*, 2001; Prokhnevsky *et al.*, 2002, 2005; Dolja, 2003).

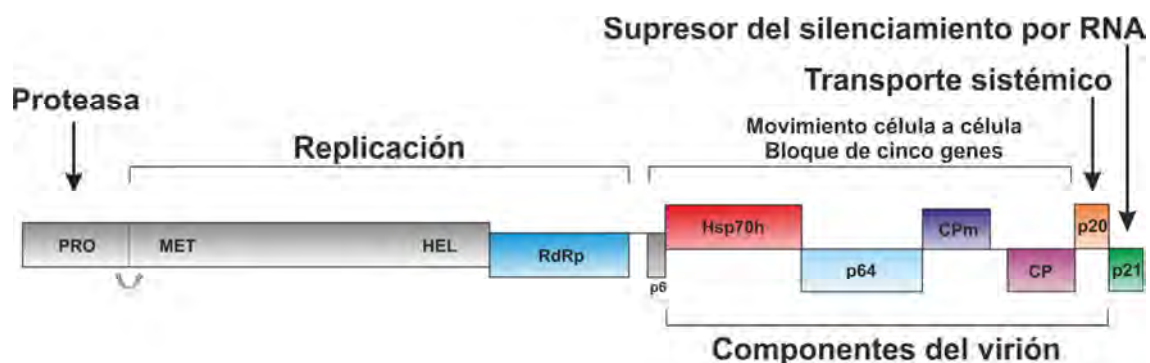


Figura 6: Representación de la organización genómica de *Beet yellows virus* (BYV). Los ORFs están representados como cajas indicando las proteínas codificadas. PRO, dominio proteasa; MET, dominio metiltransferasa; HEL, dominio helicasa; RdRp, RNA polimerasa dependiente de RNA; p6, proteína de 6kDa; Hsp70h, proteína homóloga de la familia Hsp70; p64, proteína de 64 kDa; CP, proteína de la cápsida, CPm, proteína de la cápsida menor; p20, proteína implicada en el transporte sistémico; p21, proteína supresora del silenciamiento por RNA. (adaptado de Dolja *et al.*, 2006).

A pesar de que este bloque de genes está conservado en toda la familia, no ocurre lo mismo con el orden de los distintos genes. En los géneros *Ampelovirus* y *Crinivirus*, el ORF CPm se sitúa en dirección 3' respecto al ORF CP, mientras que en el género *Closterovirus* el orden es inverso y su tamaño es significativamente menor.

Además de las funciones ya descritas, los miembros de la familia *Closteroviridae* codifican en sus genomas proteínas supresoras del silenciamiento génico. Estas

proteínas en su mayoría se localizan en el extremo 3' del genoma de los miembros de los géneros monopartitos y en el extremo 3' del RNA1 del genoma de los miembros de los géneros con más de una molécula de RNA (Figura 7). Así, encontramos en el género *Closterovirus* la proteína p21 de BYV (Reed *et al.*, 2003; Ye y Patel, 2005; Chiba *et al.*, 2006), la proteína p22 de BYSV (Reed *et al.*, 2003), la proteína p24 de GLRaV-2 (Chiba *et al.*, 2006) y las proteínas p20, p23 y CP de CTV (Lu *et al.*, 2004), en el género *Ampelovirus* la proteína p19.7 de GLRaV-3 (Gouveia *et al.*, 2012), y en el género *Crinivirus* la proteína p25 de CYSDV (Kataya *et al.*, 2009), las proteínas p22 y RNasa III de SPCSV (Kreuze *et al.*, 2005), las proteínas p22, CP y CPM de ToCV (Cañizares *et al.*, 2008) y la proteína p23 de LCV (Chen *et al.*, 2012, Kubota y Ng, sin publicar).

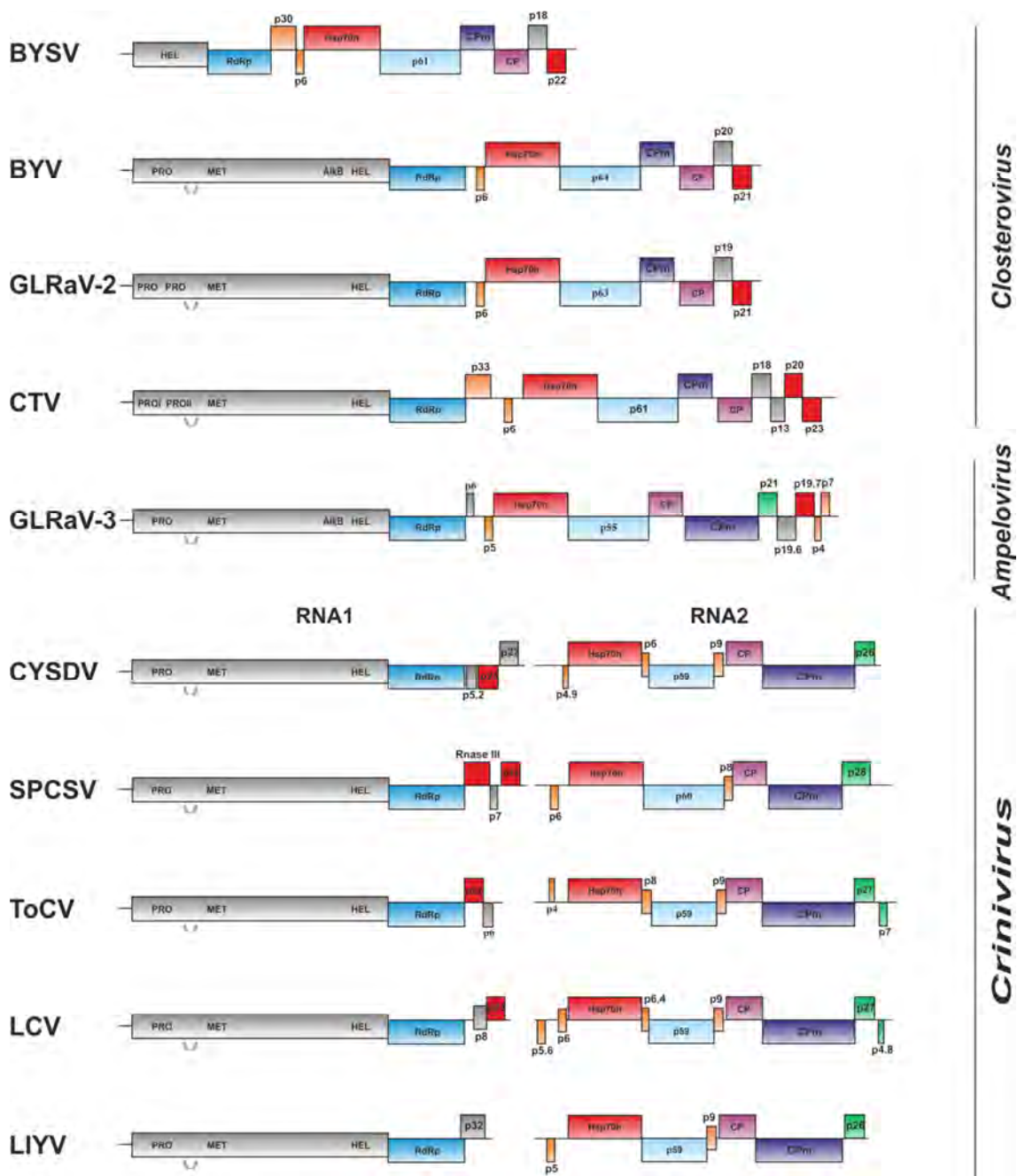


Figura 7. Organización genómica de los miembros de los géneros de la familia *Closteroviridae*, en los cuales han sido descritos supresores de silenciamiento. BYSV, *Beet yellow stunt virus*; BYV, *Beet yellows virus*; GLRaV-2, *Grapevine leafroll-associated virus-2K*; CTV, *Citrus tristeza virus*; GLRaV-3, *Grapevine leafroll-associated virus-3K*; CYSDV, *Cucurbit chlorotic yellows virus*; SPCSV, *Sweet potato chlorotic stunt virus*; ToCV, *Tomato chlorosis virus*; LCV, *Lettuce chlorosis virus*; LIYV, *Lettuce infectious yellows virus* (adaptado de Dolja *et al.*, 2006).

Las secuencias de los extremos 5' y 3' no codificantes (untranslated regions, UTRs) contienen elementos reguladores que actúan en *cis*, implicados en el inicio de la síntesis de las cadena negativas y positivas genómicas y de los RNAs subgenómicos. También controlan el inicio de la traducción, el ensamblaje del virión, la regulación de

la expresión génica, el movimiento dentro del huésped (Duggal *et al.*, 1994; Buck, 1996; Turner y Buck, 1999; Miller y Koev, 2000; Dreher y Miller, 2006).

La región del extremo 3'-UTR está implicada en el inicio de la replicación del RNA viral, conteniendo los motivos y estructuras implicados en distintas funciones relacionadas con la síntesis de la cadena de polaridad negativa (Dreher, 1999). A diferencia de otros virus de plantas, en el extremo 3' de los miembros de la familia *Closteroviridae* no se han identificado estructuras similares a las presentes en mRNAs eucariotas, como son las colas poli-A o plegamientos semejantes a los que adoptan los RNAs transferentes. En el caso de CTV, esta región está altamente conservada en todos los genotipos caracterizados y se han identificado una serie de estructuras en horquilla implicadas en la replicación (López *et al.*, 1998; Satyanarayana *et al.*, 2002a). En la mayoría de los crinivirus caracterizados se han descrito estructuras similares en el extremo 3'-UTR consistentes en cuatro estructuras en horquilla y uno o dos pseudonudos (Kreuze *et al.*, 2002; Livieratos *et al.*, 2004; Lozano, 2007). Este extremo estaría implicado, además de en el inicio de la síntesis de la cadena negativa, en la estabilidad, ensamblaje y traducción del RNA (Dreher, 1999).

Aunque las secuencias de los extremos 5'-UTR están implicadas en distintos procesos del ciclo viral, la información disponible sobre los elementos reguladores es escasa. Por analogía con los elementos descritos en el extremo 3' de la cadena positiva, las estructuras del extremo 3' de la cadena negativa (complementaria al extremo 5' de la positiva) deben actuar como promotores de la síntesis de la cadena positiva (Guan *et al.*, 1997; Sivakumaran y Kao, 1999; Nagy y Pogani, 2000; Panavas y Nagy, 2003; Panavas *et al.*, 2003). En CTV se ha demostrado la implicación de las estructuras secundarias predichas en este extremo en la replicación y se ha sugerido que contengan señales para el inicio del ensamblaje del virión (Gowda *et al.*, 2003a; López *et al.*, 1998).

3.3. Mecanismo de expresión génica

Los genomas de virus de RNA de cadena sencilla, lineal y polaridad positiva, pueden ser utilizados directamente como mRNA y a su vez servir como moldes para la síntesis de la cadena de polaridad negativa que se genera como intermediario durante la replicación viral. Los closterovirus utilizan principalmente tres mecanismos para regular su expresión génica: i) procesamiento proteolítico para la expresión de la poliproteína codificada por el ORF1a, ii) desplazamiento de la pauta de lectura del ribosoma en un

nucleótido (+1 *ribosomal frameshift*) para la expresión de la RdRp codificada por el ORF1b, y iii) producción de sgRNAs 3' co-terminales para la expresión de los genes que se encuentran en la mitad 3' del genoma de closterovirus y ampelovirus o en el RNA2 (y RNA3) de crinivirus (Dolja *et al.*, 2006; Dolja, 2003). Esta combinación tan compleja de estrategias no se ha descrito en ningún otro grupo de virus de plantas (Koonin y Dolja, 1993).

El ciclo de replicación se inicia con la traducción de los ORFs 1a y 1ba partir del gRNA en dos poliptoteínas, una que contiene los dominios MET y HEL y otra que posee además función RNA polimerasa dependiente de RNA (Agranovsky *et al.*, 1994; Karasev *et al.*, 1995). A continuación se sintetizará una cadena de RNA complementaria de polaridad negativa que será utilizada como molde para generar tanto las nuevas moléculas de RNA de polaridad positiva que constituyen el genoma viral, como los sgRNAs 3' co-terminales. En el caso de CTV se ha demostrado que la producción de los sgRNAs permite la regulación de la expresión de cada gen de forma independiente, tanto en tiempo como en cantidad (Navas-Castillo *et al.*, 1997). Además, se han localizado en el RNA genómico las secuencias reguladoras (elementos controladores) de la expresión de cada sgRNA en posición 5' con respecto a su inicio de transcripción (Gowda *et al.*, 2001; Ayllón *et al.*, 2003). Se ha propuesto que los elementos controladores podrían funcionar como promotores internos durante la generación de cadenas de polaridad positiva, usando como molde el RNA genómico de polaridad negativa y/o actuar como terminadores durante la síntesis de cadenas de polaridad negativa del RNA genómico. Además de las cadenas de polaridad positiva y negativa de los sgRNAs 3' co-terminales, los elementos controladores correspondientes a cada uno de los ORFs, genera un reducido set de sgRNAs 5' co-terminales de polaridad positiva (Gowda *et al.*, 2001). En células infectadas con CTV, además de este set de RNAs se han detectado RNAs de tamaño pequeño de cadena sencilla y polaridad positiva (*low molecular-weight tristeza*, LMTs), de alrededor de 850 (LMT1) y (LMT2) nucleótidos, correspondientes al extremo 5' del RNA viral y cuya función biológica es desconocida (Che *et al.*, 2001; Gowda *et al.*, 2003b, 2009). Por tanto, como resultado del proceso de replicación, CTV produce una gran cantidad de especies de RNAs virales en la célula infectada. La proporción de cadenas positivas y negativas correspondientes al RNA total (RNA genómico y sgRNAs) es aproximadamente de 40 o 50 a 1, estando dentro del rango encontrado para la mayoría de virus de RNA de polaridad positiva (Satyanarayana *et al.*, 2002b). Sin embargo, durante la replicación de CTV la

proporción de cadenas positivas y negativas de RNA genómico es sólo de entre 10 y 20 veces mayor, un valor bajo comparado con las proporciones observadas durante la replicación de otros virus de RNA. Esta acumulación asimétrica está controlada por la proteína p23 (Satyanarayana *et al.*, 2002b). La expresión del genoma de CTV, donde potencialmente se producen hasta 19 proteínas virales distintas, es similar a la descrita para los coronavirus (Karasev *et al.*, 1997).

3.4. Ciclo de infección de los closterovirus

La mayoría de los virus de esta familia son inoculados en planta mediante un insecto vector (Karasev, 2000). El inicio del ciclo de replicación requiere la desencapsidación de la partícula viral, seguido de la traducción del genoma viral. La poliproteína traducida es procesada suministrando los componentes proteasa y replicasa que formarán los complejos de replicación asociados a las membranas del retículo endoplasmático. A continuación se sintetizará la cadena negativa del RNA genómico que será utilizada para la síntesis tanto de las cadenas positivas del genoma como de los sgRNAs. La producción de sgRNAs está regulada de un modo preciso para optimizar los distintos eventos del ciclo de infección viral. Así, los sgRNAs que codifican para proteínas supresoras de silenciamiento génico son producidos tempranamente para poder contrarrestar una respuesta defensiva por parte de la planta. La traducción de los genomas sintetizados resultará en la proliferación de los complejos de replicación e irán acoplados al ensamblaje de los viriones al acumularse las proteínas estructurales (Dolja *et al.*, 2006). Los viriones realizan el movimiento célula a célula a través de los plasmodesmos y el sistémico a través del floema. El movimiento de los viriones dentro de la célula se realizaría gracias a la capacidad de la proteína Hsp70h, presente en la cola, de interactuar con los microfilamentos de actina y transportar a los viriones hacia los plasmodesmos, de manera que este movimiento sería direccional, quedando las colas insertadas en los canales de los plasmodesmos (Medina *et al.*, 1999); Prokhnevsky *et al.*, 2005). Se ha propuesto que los viriones se desencapsidan al atravesar estos canales, lo que permite que los ribosomas se unan a los extremos 5' desnudos al entrar en la nueva célula, comenzando así inmediatamente el proceso de traducción (Dolja *et al.*, 2006).

El ciclo de expresión génica y replicación, ensamblaje del virión y movimiento célula a célula dura aproximadamente un día (Dolja *et al.*, 2006) y se repite hasta que la

infección alcanza las células acompañantes que tienen conexión a través de los plasmodesmos con los elementos cribosos, lo que permite al virus ser transportado gracias a la corriente del floema a largas distancias hasta llegar a los órganos sumidero (tallos, hojas y raíces). El establecimiento de la infección sistémica supone al menos dos semanas para las especies que infectan plantas herbáceas y hasta varios meses para las de huéspedes leñosos (Dolja *et al.*, 2006).

El secuestro masivo del retículo endoplasmático suele causar citotoxicidad, que se manifiesta como aclaramiento de las venas, amarilleo y enrollado de las hojas, y marchitamiento (Dolja *et al.*, 2006). Los supresores de silenciamiento génico codificados por el genoma viral también contribuyen al fenotipo de la enfermedad al interferir con procesos del desarrollo de la planta (Dolja *et al.*, 2006).

3.5. Escenario evolutivo de la familia *Closteroviridae*

Se ha postulado que la línea monofilética de los closterovirus desciende de un virus vegetal perteneciente a la superfamilia de virus α cuyo genoma codificaba una proteína con actividad replicasa típica con los dominios MET-HEL-RdRp, una pequeña proteína hidrofóbica de movimiento y una única proteína CP formadora de cápsidas filamentosas (Dolja *et al.*, 2006). Este progenitor dio lugar al último ancestro común de los closterovirus al adquirir varios genes nuevos, como el dominio PRO y el tramo situado entre los dominios HEL y MET. A su vez, la proteína Hsp70h pudo ser incorporada mediante recombinación con un RNA mensajero celular y la proteína p59 se originaría por duplicación del gen CP. La co-evolución de Hsp70h y p59 dio como resultado a un prototipo de cola en el virión que favorecía el movimiento célula a célula en este genoma expandido a partir del closterovirus ancestral. Ya que todos los closterovirus son transmitidos por insectos, parece razonable pensar que el ancestro de los closterovirus probablemente sería también transmitido por insectos. Las tres líneas actuales de closterovirus evolucionaron por adaptación a los distintos tipos de insectos vectores (Karasev, 2000). Las proteínas CPM se originaron en este momento a partir de la duplicación y divergencia de la CP. El hecho de que el orden de los genes CP y CPM sea diferente en el género *Closterovirus* versus los géneros *Ampelovirus* y *Crinivirus* es compatible con este escenario. Los dos últimos géneros podrían haberse generado independientemente a partir del ancestro común de la familia. Alternativamente, los crinivirus podrían haber evolucionado a partir de la división en dos segmentos del

genoma monopartito de un ampelovirus. El mismo orden de los genes CP y CPm y el mayor tamaño de la CPm en ampelovirus y crinivirus comparado con los closterovirus son compatibles con este último escenario. Seguidamente, se incorporaron algunos genes adicionales específicos y conservados dentro de cada género. Un ejemplo es el del gen que codifica la proteína p21 supresora de silenciamiento génico en los virus del género *Closterovirus*. Otro ejemplo es el de los genes que codifican las proteínas p9 y p26 en el género *Crinivirus*. El género *Ampelovirus* es el que presenta la mayor variación genética dentro de la familia. Aunque los módulos de replicación y de ensamblaje y movimiento están presentes en todos los miembros de este género, es frecuente encontrar genes adicionales únicos o cambios en el orden de los genes (Theilmann *et al.*, 2002). De igual manera, algunas de las especies virales adquirieron nuevos genes únicos. Por ejemplo, los genes de CTV que codifican las proteínas p33, p18, p13 y p23 no tienen homólogos en BYV o ningún otro miembro del género (Pappu *et al.*, 1994). Parece que la inusual plasticidad genética de los closterovirus, frente a la mayor conservación del genoma de virus de RNA más pequeño, está condicionada por la expansión de su genoma, lo que les permite una mayor capacidad de adaptación a nuevos nichos, ya sean huéspedes, vectores o condiciones medioambientales cambiantes.

3.6. Supresores del silenciamiento génico en la familia *Closteroviridae*

En los genomas de miembros de los tres géneros de la familia *Closteroviridae* se han identificado genes que codifican proteínas supresoras de silenciamiento (Figura 6). Los miembros del género *Closterovirus* BYV, BYSV y GLRaV-2 codifican en el extremo 3' de sus genomas proteínas tipo p21 (p21-like) que presentan una actividad supresora similar (Reed *et al.*, 2003; Chiba *et al.*, 2006). En el caso de BYV, se ha demostrado que la proteína supresora p21 une miRNAs y siRNAs de doble hebra (Chapman *et al.*, 2004). El mecanismo de acción de p21 sería similar al descrito para la proteína supresora p19 del tomosvirus *Tomato bushy stunt virus* (Silhavy y Burgyan, 2004); ambas proteínas secuestrarían siRNAs y/o miRNAs previniendo su incorporación al complejo RISC. Ya que estos supresores no pueden discriminar entre vsiRNAs y siRNAs y miRNAs endógenos implicados en la regulación del desarrollo de la planta, la acumulación de p21 y p19 induce anomalías que se asemejan a los síntomas de la infección viral (Chapman *et al.*, 2004). CTV, miembro del género

Closterovirus, codifica en el extremo 3' de su genoma hasta tres proteínas con actividad supresora que presentan distintos mecanismos de acción, la p20, la CP y la p23 (Lu *et al.*, 2004). p23 aunque es un fuerte supresor a nivel intracelular, no es capaz de prevenir el silenciamiento a nivel intercelular (Lu *et al.*, 2004). El análisis de secuencia de la proteína p23 muestra la existencia de una posible estructura en dedo de Zinc, que además contiene el dominio de unión a RNA de esta proteína (López *et al.*, 2000). La proteína p23 controla la acumulación asimétrica de los RNAs de CTV, dando lugar a una disminución de los niveles de acumulación de moléculas de RNA de polaridad negativa, y facilitando indirectamente la expresión de los genes codificados en el extremo 3' del genoma (Satyanarayana *et al.*, 2002b). Por otra parte, mientras que la proteína CP es un fuerte supresor de silenciamiento a nivel intercelular, la proteína p20 suprime el silenciamiento tanto a nivel intracelular como intercelular (Lu *et al.*, 2004). Por tanto vemos que, probablemente debido al largo tamaño y/o complejidad del genoma, CTV ha desarrollado un complejo sistema de supresión de silenciamiento con tres componentes que tienen como diana distintos puntos de la cascada de silenciamiento (Dolja *et al.*, 2006).

En el caso del género *Ampelovirus*, se ha descrito función supresora del silenciamiento para la proteína p19.7 de GLRaV-3, codificada en el extremo 3' del genoma viral (Gouveia *et al.*, 2012). p19.7 comparte algunas propiedades con las proteínas supresoras tipo p21 de la familia *Closteroviridae*, tal como la habilidad de suprimir el silenciamiento inducido por inductores fuertes (Reed *et al.*, 2003; Chiba *et al.*, 2006). Sin embargo, al contrario de lo observado con la proteína p21 de BYV, la presencia de p19.7 está asociada con una clara disminución de los niveles de acumulación de siRNAs, lo que sugiere que actúa antes o en el punto de acción de corte mediado por Dicer. p19.7 también suprime el silenciamiento sistémico (Gouveia *et al.*, 2012). Estudios comparativos de la actividad supresora de variantes de la proteína p19.7 de aislados de GLRaV-3 provenientes de distintos grupos filogenéticos mostraron que la actividad supresora difería entre grupos. El análisis de las secuencias de p19.7 mostró que estas diferencias en la actividad supresora podrían estar asociadas a ciertos cambios aminoacídicos (Gouveia y Nolasco, 2012).

En el género *Crinivirus*, SPCSV dispone de un sistema único de supresión del silenciamiento, en el que dos proteínas independientes funcionan de forma cooperativa. Estas dos proteínas, codificadas en el extremo 3' del RNA1 viral, son una endonucleasa específica de RNA de doble hebra, la RNasa III, y la proteína p22 (Kreuze *et al.*, 2005).

Así, aunque p22 suprime de un modo eficiente el silenciamiento inducido por RNA de doble hebra, su acción supresora se ve incrementada de forma acusada en presencia de RNasa III (Kreuze *et al.*, 2005). La proteína RNasa III es similar a las proteínas homólogas de planta y probablemente fue adquirida mediante un proceso de recombinación con los genes del huésped. Esta proteína, para ejercer su actividad supresora requiere su actividad endonucleasa intacta (Kreuze *et al.*, 2005; Cuellar *et al.*, 2009), llevando a cabo la degradación de RNAs de doble hebra *in vitro* tanto de tamaño largo como corto (Weinheimer *et al.*, 2015). Curiosamente, trabajos posteriores a la descripción de la presencia de ambos supresores en SPCSV, mostraron que la mayoría de los aislados de este virus carecían del gen que codifica la proteína p22 (Cuellar *et al.*, 2008). Este hecho parece indicar que la adquisición del gen p22 probablemente ha sido reciente. Los genomas de los crinivirus CYSDV y LCV también codifican proteínas con actividad supresora en el extremo 3' del RNA1, las proteínas p25 y p23, respectivamente (Kataya *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2012). Así, la proteína p25 de CYSDV suprime el silenciamiento a nivel local inducido tanto por RNA de cadena sencilla como doble, pero no es capaz de suprimir el movimiento de la señal de silenciamiento, mientras que la proteína p23 de LCV es muy eficiente suprimiendo la señal de silenciamiento sistémica pero muy débil como supresor a nivel local (Kataya *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2012). Por último, el crinivirus ToCV, al igual que en el caso del closterovirus CTV, ha adoptado la estrategia de codificar en su genoma hasta tres proteínas con actividad supresora, siendo hasta el momento el único crinivirus en el que se han descrito proteínas con actividad supresora en ambas moléculas de RNA (Cañizares *et al.*, 2008). Mientras que el extremo 3' del RNA1 codifica una proteína cuya función parece ser específicamente la de suprimir el silenciamiento, la proteína p22, en el RNA2 funcionan como proteínas supresoras las proteínas estructurales CP y CPm. Estudios con la proteína supresora CP, han mostrado que interacciona con la proteína de la planta S-adenosil homocisteína hidrolasa (SAHH) (Cañizares *et al.*, 2013), implicada en el ciclo de metilación, aunque el papel de esta interacción en supresión de silenciamiento no es conocido. En el caso de p22, se ha descrito que suprime de un modo muy eficiente el silenciamiento inducido tanto por RNA de cadena sencilla como de cadena doble a nivel local, estando su presencia asociada a una drástica reducción en los niveles de acumulación de sRNAs (Cañizares *et al.*, 2008). En esta tesis se pretende profundizar en el conocimiento del mecanismo de acción de este interesante supresor.

4. Tomato chlorosis virus (ToCV)

4.1. Propiedades biológicas y modo de inoculación

ToCV es el principal virus causante de la enfermedad del amarilleo del tomate. Los síntomas causados por ToCV consisten en manchas cloróticas irregulares que evolucionan hacia una clorosis internervial que aparece inicialmente en las hojas inferiores y que posteriormente se extiende hacia la parte superior de la planta. A veces aparecen manchas de color púrpura y necrosis. Las hojas viejas se enrollan longitudinalmente y adquieren textura quebradiza. La producción puede verse disminuida debido a la reducción de la capacidad fotosintética de las plantas afectadas. En ocasiones se observa una reducción en el número y tamaño de los frutos (Wisler *et al.*, 1998a), así como aborto floral y falta de cuajado de frutos o retraso en la maduración y falta de coloración adecuada de los mismos (Lozano *et al.*, 2006b). El síndrome de amarilleo causado por ToCV puede ser confundido con desórdenes fisiológicos o nutricionales e incluso con fitotoxicidad por pesticidas (Wisler *et al.*, 1998b) (Figura 8).



Figura 8: Síntomas de amarilleo en plantas de tomate causadas por la infección por *Tomato chlorosis virus*. Planta de tomate infectada por amarilleo (derecha) junto a una planta asintomática (izquierda) (A). Amarillero en hojas de una planta de tomate infectada (B).

Además de tomate, ToCV infecta de manera natural otras especies de la familia *Solanaceae*, como pimiento y patata (Lozano *et al.*, 2004; Barbosa *et al.*, 2010; Fortes *et al.*, 2012; Fortes y Navas-Castillo, 2012; Freitas *et al.*, 2012), así como algunas malas hierbas de las familias *Chenopodiaceae* y *Compositae* (Wintermantel y Wisler, 2006). La gama de huéspedes experimentales de ToCV es más amplia, comprendiendo más de 30 especies pertenecientes a 13 familias, incluyendo algunos cultivos importantes,

plantas ornamentales y malas hierbas (Morris *et al.*, 2006; Trenado *et al.*, 2007; Wintermantel y Wisler, 2006). Los síntomas producidos por ToCV varían dependiendo del huésped pero normalmente consisten en un amarilleo internervial y síntomas similares a los producidos en tomate (Wintermantel y Wisler, 2006).

ToCV se transmite de manera semipersistente por las especies de mosca blanca *B. tabaci*, *T. vaporariorum* y *T. abutilonea* (Figura 9). En este tipo de transmisión, ToCV, que está restringido al floema, sería adquirido durante la alimentación y se retendría en el canal alimenticio. En los procesos de ingestión-regurgitación realizado por la mosca blanca (Harris, 1996) el virus pasaría de nuevo a la planta para así ser transmitido. Aunque ToCV puede ser retenido en el vector durante días, la capacidad de transmisión disminuye considerablemente tras los dos días de adquisición (Wisler *et al.*, 1998a). Se han estudiado las características de la interacción de ToCV con las diferentes moscas blancas y se ha visto que la eficiencia en la transmisión así como la persistencia del virus en el vector varía según el tipo de mosca (Wintermantel y Wisler, 2006). Existe poca información acerca de los determinantes virales de los miembros de la familia *Closteroviridae* implicados en la transmisión por vectores. Los trabajos llevados a cabo hasta el momento indican que la proteína CPm del crinivirus *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV) estaría implicada en el proceso de transmisión (Tian *et al.*, 1999; Stewart *et al.*, 2010) y que la clave de la especificidad de vector podría estar en las diferencias encontradas en la secuencia de esta proteína entre las distintas especies virales. También se ha sugerido que la proteína CPm de los closterovirus *Beet yellows virus* (BYV) y *Citrus tristeza virus* (CTV) estarían implicadas en la transmisión por pulgones (Agranovsky *et al.*, 1995; Febres *et al.*, 1996).



Figura 9: Especies de mosca blanca: *Bemisia tabaci* (A), *Trialeurodes vaporariorum* (B) y *T. abutiloneus* (C).

El hecho de que ToCV sea un virus limitado a floema y que no se pueda transmitir de manera mecánica, ha hecho que la transmisión de este virus se pudiera

realizar únicamente mediante sus vectores naturales. El reciente desarrollo de clones infecciosos de ToCV para inoculación mediante agroinfiltración (Orlío *et al.*, 2014), ha mostrado ser una herramienta muy útil para obtener una infección eficiente. La disponibilidad de esta herramienta ha sido crucial para llevar a cabo uno de los objetivos de esta tesis, donde la creación de un mutante de delección de ToCV nos ha permitido conocer el papel de la proteína objeto de este estudio, la p22, durante el ciclo de infección viral.

4.2. Organización genómica

ToCV presenta un genoma bipartito, constituido por dos moléculas de RNA lineales, de cadena sencilla y sentido positivo que se encapsidan por separado en viriones largos y flexuosos, ambas necesarias para que el virus sea capaz de infectar sistémicamente una planta. En la actualidad se han secuenciado los genomas completos de cuatro aislados de España (Lozano *et al.*, 2006a, 2007; Villanueva, 2014), uno de Estados Unidos (Wintermantel *et al.*, 2005), uno de Grecia (Kataya *et al.*, 2008), uno de Brasil (Albuquerque *et al.*, 2013) y uno de China (Zhao *et al.*, 2014). El RNA1 está constituido por 8594-8595 nt y como otros miembros del género *Crinivirus*, fundamentalmente codifica proteínas relacionadas con la replicación viral, mientras que en el RNA2 con 8242-8247 nt codifica proteínas involucradas en la protección del genoma, movimiento viral, transmisión y otras funciones todavía no identificadas. Aunque ambos RNAs son necesarios para obtener una infección productiva en planta, el RNA1 puede replicarse independientemente. Por su parte, el RNA2 es completamente dependiente de las proteínas codificadas en el RNA1 para su replicación.

El RNA1 está formado por cuatro ORFs flanqueados por dos regiones no traducidas (*untranslated regions*, UTRs) situados en los extremos 5' y 3' de la molécula (Fig.). El ORF1a se traduce en una poliproteína que contiene los dominios proteasa (PRO), metiltransferasa (MTR) y helicasa (HEL), conservados en todos los miembros de la familia *Closteroviridae* (Karasev, 2000). El ORF1b codifica la proteína RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), que se traduce por desplazamiento del ribosoma en un nucleótido durante la traducción (+1 *frameshift*). El ORF2 codifica una proteína de 22 kDa, que ha sido descrita como un fuerte supresor del silenciamiento génico (Cañizares *et al.*, 2008) y que no presenta similitud con ninguna otra proteína disponible en GenBank. El ORF3 codifica una proteína de 6 kDa que posee un dominio

transmembrana similar a otras proteínas situadas en el extremo 3' de otros crinivirus, cuya función es desconocida.

El RNA2 codifica nueve ORFs flanqueados por dos UTRs situados en los extremos 5' y 3' de la molécula (Fig. 10). Este RNA incluye cuatro ORFs característicos de la familia *Closteroviridae* que estarían implicados en la protección del genoma, movimiento viral e interacción con el vector y son el ORF5, que codifica la proteína Hsp70h; el ORF7, que codifica la proteína p59 y el ORF9 y ORF10 que codifican las proteínas principal (CP) y menor (CPm) de la cápsida, respectivamente, siendo estas dos últimas también supresoras de silenciamiento génico (Cañizares *et al.*, 2008). El ORF4, el primero del RNA2, codifica la proteína p4, rica en residuos hidrofóbicos que no presenta ninguna homología de secuencia con otras proteínas codificadas en el mismo ORF de otros crinivirus, ni con ninguna otra proteína disponible en la base de datos. El ORF6 codifica la proteína p8 que presenta un tamaño, posición genómica y secuencia similar a proteínas de otros miembros de este género (Livieratos *et al.*, 2004; Orílio y Navas-Castillo, 2009). El ORF8 codifica la proteína p9, presente únicamente en los miembros del género *Crinivirus* y se desconoce su función, aunque presenta un alto grado de similitud en tamaño y posición genómica con proteínas presentes en BnYDV, SPaV, CYSDV, BYVaV, CCYV, BPYV. El ORF11 codifica la proteína p27, que no presenta similitud significativa con ninguna proteína codificada por las especies de los otros géneros de la familia (Dolja *et al.*, 2006). El ORF 12 codifica la proteína p7, que también presenta un dominio transmembrana y no presenta similitud significativa con ninguna proteína codificada por los genomas de otros crinivirus, por lo que podría ser exclusiva de ToCV (Lozano *et al.*, 2006a; Wintermantel *et al.*, 2005).

Los extremos 5'-UTR, tanto del RNA1 como del RNA2, están constituidos por 301-303 y 238 nucleótidos respectivamente, con una identidad nucleotídica del 33% entre ambos. Los seis primeros nucleótidos son idénticos en el RNA1 y RNA2, fenómeno característico tanto del género *Crinivirus* como de otros grupos de virus con genomas segmentados. La secuencia nucleotídica de los extremos 3'-UTR del RNA1 y RNA2 están constituidos por 176 y 212-218 nt respectivamente y presenta un alto grado de conservación (Lozano *et al.*, 2006a; Wintermantel *et al.*, 2005), como sucede en la mayoría de las especies del género, a excepción de LIYV, en el que se ha propuesto que sus extremos tengan alguna función distinta a la del resto de virus de este género (Aguilar *et al.*, 2003; Kiss *et al.*, 2013) (Figura 10).

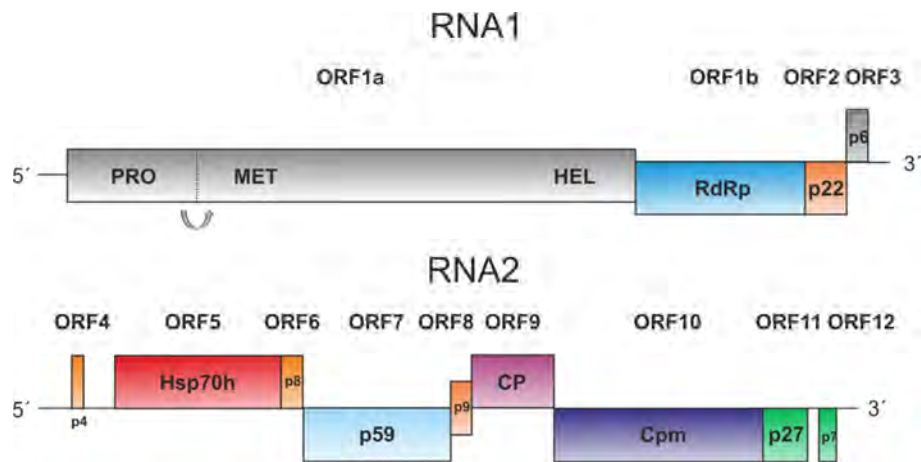


Figura 10: Organización genómica de *Tomato chlorosis virus* (aislado AT80/99 de España). Los marcos abiertos de lectura (ORFs) se muestran como cajas por encima, debajo o sobre la línea que representa el RNA genómico, dependiendo de la fase de lectura en la que se encuentren. Los motivos proteasa, metiltransferasa y helicasa están representados como PRO, MET y HEL respectivamente; la RNA polimerasa dependiente de RNA está representada como RdRp; la proteína Hsp70 homóloga está representada como Hsp70h y las proteínas de la cápsida mayor y menor están representadas como CP y Cpm respectivamente.

4.3. Diversidad genética de ToCV

La diversidad genética de poblaciones naturales de ToCV de distintas zonas de la cuenca del Mediterráneo se ha dado a conocer mediante análisis filogenéticos a partir de la secuencia nucleotídica consenso de las regiones codificantes ORF1a y ORF1b, y del extremo 5'-UTR del RNA1 de distintos aislados virales procedentes de tomate y pimiento, así como de las regiones genómicas pertenecientes a los genes Hsp70h, CP y Cpm del RNA2 (Lozano, 2007). Este estudio mostró que la población analizada de ToCV era muy uniforme, aunque con cierto grado de estructuración geográfica. Además, en este trabajo se puso de manifiesto la presencia de dos tipos de RNA1, denominados I y II, distinguibles por diferencias nucleotídicas y aminoácidas en las tres regiones genómicas analizadas del RNA1. Todos los aislados poseían, sin embargo, un tipo de RNA2. Otro estudio sobre la variabilidad genética de poblaciones de ToCV dentro de una planta huésped ha dado a conocer que presentan una estructura genética heterogénea y compleja, similar a la descrita en cuasiespecies virales de RNA de animales y plantas (Lozano *et al.*, 2009). Este estudio mostró que la frecuencia de mutación para la región RdRp, localizada en el RNA1 es más alta que en las regiones analizadas del RNA2. El hecho de que el RNA1 sea el responsable de la replicación de ambas moléculas de RNA y además sea capaz de replicarse autónomamente, lo que

implica un mayor número de replicaciones del RNA1, podría ser la razón del aumento en la frecuencia de mutación observado. Posteriormente, se realizó un estudio más extenso de la variabilidad genética existente en las regiones codificantes ORF1a y ORF1b, y del extremo 5'-UTR del RNA1, donde se incluían una mayor colección de aislados virales obtenidos de tomate y pimiento procedentes de cultivos comerciales de las zonas productoras del sudeste peninsular español (Murcia, Almería y Málaga) y de huéspedes alternativos como *Datura stramonium*, *Solanum nigrum* y patata (Fortes, 2010), donde se corroboró la existencia de los dos tipos de variantes de RNA1 (Lozano *et al.*, 2009; Fortes, 2010). Por otra parte, un reciente estudio donde se ha determinado la secuencia nucleotídica completa de cuatro nuevos aislados de ToCV provenientes de España y Brasil, ha mostrado la presencia de dos tipos de RNA2, denominados I y II (Villanueva, 2014), donde los aislados de origen español pertenecen al tipo I. Así también, en este trabajo se ha descrito que uno de los aislados españoles presentaba un RNA1 tipo II y un RNA2 tipo I, lo que parece indicar su origen pseudorrecombinante (Villanueva, 2014).

OBJETIVOS



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

La infección por virus de plantas puede ir asociada al desarrollo de enfermedades que pueden ocasionar una disminución en el rendimiento y la calidad de los cultivos. Un profundo conocimiento del virus y de cómo interacciona con su huésped es esencial para poder diseñar estrategias de control efectivas que minimicen el daño causado por el mismo. El objetivo general de este trabajo ha sido el estudio del papel de una proteína viral esencial para poder contrarrestar una respuesta defensiva por parte de la planta basada en el silenciamiento por RNA, la proteína supresora de silenciamiento p22 del crinivirus *Tomato chlorosis virus* (ToCV). Este objetivo general se ha abordado mediante los siguientes objetivos parciales que se corresponden con cada uno de los capítulos en los que se ha estructurado esta tesis:

1. Estudio de la diversidad genética de la proteína p22 de aislados de ToCV de tomate y pimiento, y análisis de la actividad supresora de silenciamiento de proteínas p22 pertenecientes a grupos filogenéticos distintos.
2. Estudio del mecanismo de acción de la proteína supresora de silenciamiento p22 de ToCV fuera de su contexto viral.
3. Estudio del papel de la proteína p22 en el proceso de infección viral mediante la creación de un mutante de delección de ToCV, en plantas de *Nicotiana benthamiana* tanto silvestres como defectivas para la expresión de RDR6.
4. Estudio del efecto sinérgico de la expresión heteróloga de la proteína p22 de ToCV a partir de los virus *Tobacco rattle virus* y *Potato virus X*.

CAPÍTULO I





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Genetic diversity and silencing suppression activity of the p22 protein of *Tomato chlorosis virus* isolates from tomato and sweet pepper

Yazmín M. Landeo-Ríos, Jesús Navas-Castillo, Enrique Moriones, M. Carmen Cañizares

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”- Universidad de Málaga - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Estación Experimental “La Mayora”, 29750 Algarrobo-Costa, Málaga, Spain.

Virus Genes 51, 283-289 (2015)

ABSTRACT

As for other bipartite criniviruses (genus *Crinivirus*, family *Closteroviridae*), the genome of *Tomato chlorosis virus* encodes an RNA silencing suppressor, the protein p22, in the 3'-proximal region of RNA1. This protein has been reported as having one of the longest lasting local suppressor activities when transiently expressed in *Nicotiana benthamiana*. Here, we examined the genetic diversity of the p22 gene in ToCV isolates from tomato and sweet pepper. The p22 gene sequences clearly grouped into two separated clades. However, functional analysis of both types of p22 proteins indicated no evident differences in suppressor activity. Our findings provide experimental evidence that the presence of a “strong” silencing suppressor is a conserved feature of ToCV isolates.

INTRODUCTION

RNA silencing is a conserved sequence specific RNA mediated mechanism of gene regulation that also works as an antiviral defence [1]. It is induced by double-stranded RNA (dsRNA) which is processed into small RNA species of 21-24 nucleotides [2] that serve as guides for cleavage of RNA molecules. Plant viruses encode proteins that can act as silencing suppressors by operating at different steps of the RNA silencing pathway to counteract this antiviral mechanism [3, 4]. The viral suppressor proteins exhibit a great diversity in sequence, structure and mechanism of action. Thus, while some plant viruses have delegated the suppressor functions to replication, structural or transport proteins, other viruses encode dedicated suppressor proteins without homologous relationship to any other viral or host proteins [5]. Most of the viral RNA silencing suppressors identified so far also exhibit properties such as the enhancement of virus accumulation and pathogenicity [6, 7]. Therefore, the study of viral suppressors might be important to understand the mechanisms of viral infection.

Tomato chlorosis virus (ToCV, genus *Crinivirus*) is a member of the family *Closteroviridae*, a family in which the largest RNA genomes among plant viruses are found [5]. In this family, a high level of variability in gene content has been reported at the 3'-proximal genomic region of the monopartite genomes of viruses from the genera *Closterovirus* and *Ampelovirus* and at the 3'-end of RNA1 of viruses from the mostly bipartite genus *Crinivirus* [5]. Interestingly, some of the genes located in the 3'-region encode RNA silencing suppression proteins [8-13] that can be crucial for virus pathogenicity [14]. The heterogeneity in this 3'-proximal region can be exemplified by the crinivirus *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV), with isolates with or without the p22 RNA silencing suppressor [15, 16].

The crinivirus ToCV is the causal agent of a “yellow leaf disorder” that affects tomato (*Solanum lycopersicum* L.) [17, 18] and sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) [19, 20], among others. ToCV is transmitted in nature by the whitefly (Hemiptera: Aleyrodidae) *Bemisia tabaci* and has a bipartite single-stranded, positive-sense RNA genome [17], in which the RNA1 encodes proteins involved in viral replication and the RNA2 encodes proteins involved in encapsidation, movement, and host transmission. As for other members of this complex family, ToCV adopts the strategy of encoding multiple RNA silencing suppressors [12], the coat protein (CP) and minor coat protein (CPm) in RNA2, and the p22 protein in RNA1. Among them, the p22 protein exhibits

no apparent homology to any other reported protein and it has been reported as having one of the longest lasting local suppression activities when transiently expressed in *Nicotiana benthamiana* plants [12]. This protein suppresses RNA silencing induced by both sense and double-stranded (dsRNA) RNAs interfering with initial stages of RNA silencing [12]. Interestingly, the p22 gene is located at the 3'-proximal genomic region of RNA1, where, a high genetic variability has been reported for members of the family [5].

Since the gene content and organization of the variable 3'-proximal genomic region of the monopartite closterovirus and ampelovirus, and of the 3'-end of RNA1 in the bipartite crinivirus where the p22 silencing suppressor of ToCV is located, has evolutionary implications [5, 15, 16, 21] we have undertaken a study to evaluate the genetic diversity of this gene in ToCV populations. Scarce studies about the variability of dedicated silencing suppressors are available and p22 is particularly interesting owe to its long lasting silencing suppressor activity. ToCV isolates collected in Spain from tomato and sweet pepper were analyzed showing that their p22 proteins grouped into two differentiated phylogenetic clades. A comparative study of the suppressor activity of p22 from both groups was carried out.

MATERIALS AND METHODS

Virus isolates

A total of 45 ToCV isolates were used for the phylogenetic analysis (Supplementary Table 1). Thirty-nine of these isolates were obtained from commercial crops of tomato and sweet pepper during the years 2006 to 2009 in southeastern Spain. Additional p22 gene sequences from six ToCV isolates of various origins were retrieved from Genbank and included in the present study (Supplementary Table 1).

RT-PCR amplification and sequencing

The amplification of the complete p22 genomic region was performed by reverse transcription (AMV RT, Promega, Madison, WI, USA) with primer MA 401 (5'-ACACCAACTAAACAGAACAATATG-3') and PCR amplification using a high-fidelity DNA polymerase (Expand High Fidelity System, Roche, Germany) with primers MA 1762 (5'-ATGTGTTTCATATGCAGCGTTG-3') and MA 1763 (5'-

TATATCTCTGGCTATACTATCC-3'), designed outside the p22 region on the isolate AT80/99 RNA1 (GenBank accession number DQ983480) that recognize all ToCV sequences available in databases. Direct sequencing of PCR products was done on an ABI 3730 XL DNA analyzer (Applied Biosystems, CA, USA) (Macrogen Inc. Company, South Korea), using the above PCR primers.

Plasmid constructs

p22 type II ToCV ORF was amplified from total RNA extracts of ToCV 2.5 isolate-infected tomato plants by reverse transcription with AMV RT (Promega, Madison, WI, USA) and amplified by PCR with Expand High Fidelity (Roche, Germany) with primers MA 569: 5'-GAACCATGGATCTCACTGGTTGTTTGC-3' and MA 570: 5'-AATAGATCTTATATATCACTCCCAAAGAAAAAC-3' containing *Nco*I and *Bgl*II restriction sites (underlined), and cloned in a vector under the control of the 35S promoter as described for the generation of the p22 type I construct [12]. Plasmid 35S-GFP [22] and 35S-GF-IR [23] were provided by Dr. David C. Baulcombe (University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom). The constructs were transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 by electroporation.

Agroinfiltration and fluorescence imaging

N. benthamiana plants were infiltrated with the *A. tumefaciens* strain GV3101 carrying the plasmids indicated as described by Voinnet *et al.* [24] to express 35S-GFP alone or in combination with 35S-GF-IR and 35S-p22-I or 35S-p22-II. Co-infiltration with the empty vector was used as a negative control. For co-infiltration, equal volumes of individual *A. tumefaciens* cultures with optical density at 600 nm of 1, were mixed prior to infiltration. Two leaves of each *N. benthamiana* plant at the four- to six- leaf growth stage were agroinfiltrated. Three plants were used per combination in two replicated experiments. GFP fluorescence was observed under long-wavelength UV light (Black Ray B 100AP, UV products, Upland, CA, USA) and photographed using a Coolpix 8700 Nikon digital camera.

RNA analysis

RNA was extracted from leaf tissue using the method described by Noris *et al.* [25]. For northern blot analysis of GFP mRNAs, total RNA aliquots (5 µg) for each sample agroinfiltrated with the different combinations indicated above, were separated

on a 1% formaldehyde agarose gels, transferred to nylon membranes and probed with a digoxigenin-labelled specific probe for GFP as described previously [26].

Phylogenetic analysis

Nucleotide and amino acid sequence alignments were performed using the CLUSTALX program [27]. The aligned sequences were used to construct the phylogenetic trees by the neighbor-joining method and maximum parsimony available in MEGA 5.0 program [28]. To estimate branch support, bootstrap values were determined using 1000 bootstrap replicates.

RESULTS AND DISCUSSION

Genetic variability of the p22 gene sequences of ToCV isolates

The identities of the nucleotide and deduced amino acid sequences of p22 from the 45 p22 ToCV isolates considered in this study ranged from 96.2% to 100% and 94.8% to 100%, respectively. These values were similar to the ones found in the genetic variability studies of isolates of the crinivirus SPCSV for the p22 silencing suppressor [16]. Analysis of the nucleotide alignment of the ToCV p22 sequences showed that 44 out of 582 positions were variable. Of these variable positions, 19 were parsimony informative sites (the ones that account for phylogenetic clustering) and the rest are singletons (substitutions present in only one sequence) (Supplementary Fig. 1). Nine out of the 19 informative positions resulted in non-synonymous substitutions in p22 protein (Figure 1). Interestingly, most of the parsimony informative changes were located in the C-terminal third of the p22 protein sequence. These results support that a higher restriction to sequence variation occurs in the N-terminal two thirds of the p22 protein. This apparent restriction to variability was not observed for the p22 protein of SPCSV isolates, where the variable positions were located through all the amino acid sequence [16]. The alignment of the deduced p22 amino acid sequences of ToCV isolates evidenced the existence of two major sequence types based on the informative positions 58, 63, 125, 133, 144, 167 and 180. Thus, these positions in one of the sequence types exhibited the following composition, L-V-G-V-L-L-Y, and in the second type, M-A-S-I-F-S-H, except for the Chinese isolate NJ in which the first of these residues corresponds to a T (due to a singleton positioned next to the first informative nucleotide

site). It is important to stress that the observed amino acid variation did not result in any effect on the predicted secondary structure (Fig. 1), suggesting some restriction to variation probably to maintain the function of the p22 protein. As shown in Figure 1, the N-terminal two thirds of the p22 protein in which less variation was observed exhibited a prevalence of alfa-helix foldings that might be essential for maintenance of the p22 suppression function. In fact, structural studies have shown that for some RNA silencing suppressors that act by binding dsRNAs, the arrangement of different alfa-helices forms the required binding surface for dsRNA recognition [29, 30]. Further studies will be needed to study this aspect for the p22 of ToCV based on the results obtained here.

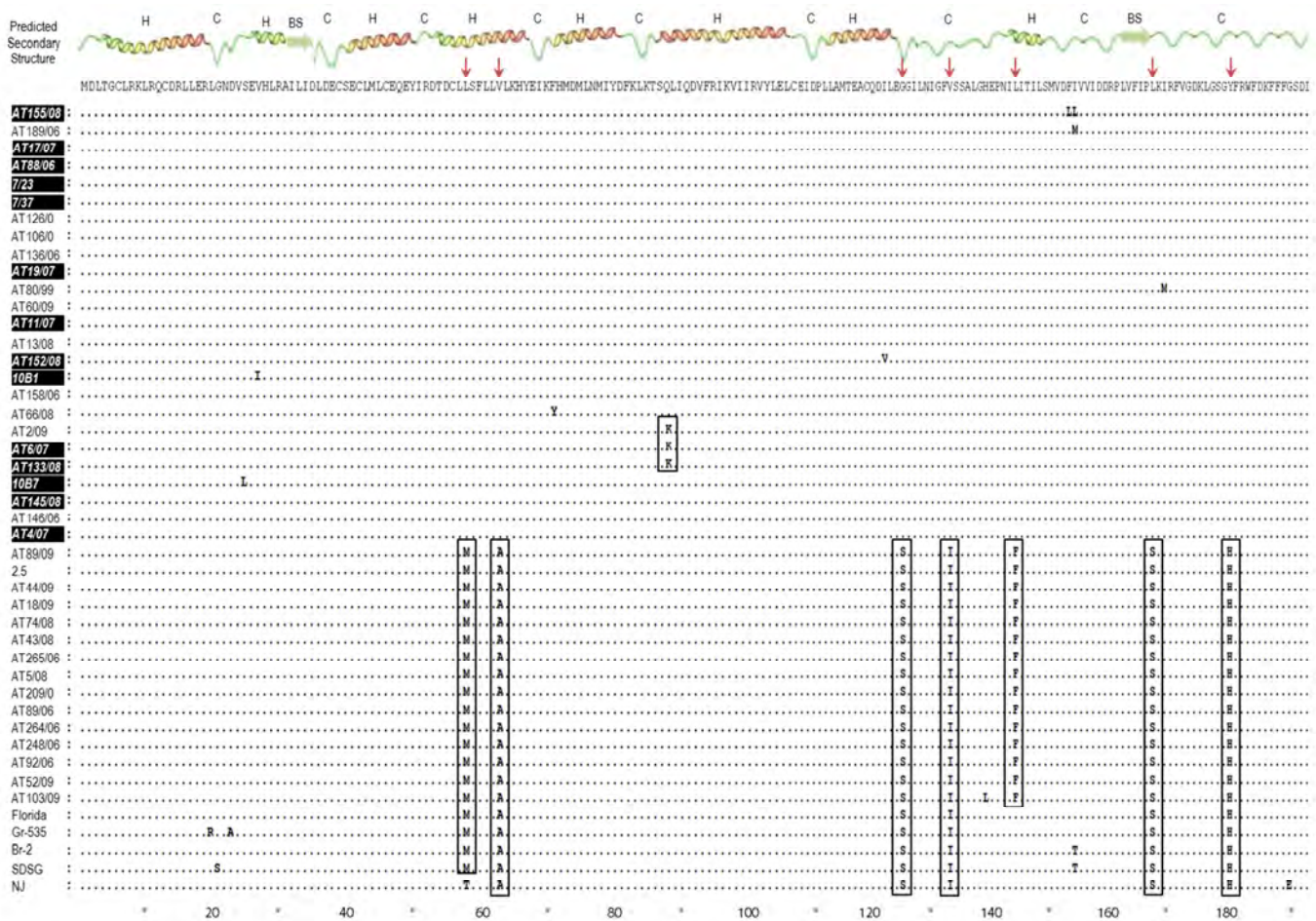


Fig. 1 Alignment of the p22 protein amino acid (aa) sequences of *Tomato chlorosis virus* isolates used in this study. Consensus secondary structure prediction and amino acid sequence are shown on the top. Sequences for p22 of isolates from Florida, Greece, Brazil and China available in databases (GenBank accession numbers AY903447, EU284745, JQ952600, KC709509, KF018289, respectively) were also included. Residues identical to the consensus sequence are indicated by dots. In the diagram of the secondary structure regions that are predicted to contain α -helices (H) or β -sheets (BS), and random coil (C) are indicated at the top. ToCV isolates from sweet pepper are highlighted with black boxes. The numbers at the bottom of the alignments indicate the aa positions. The parsimony informative changes that determine the existence of two major sequence types are indicated by arrows and boxed.

Phylogenetic analyses of the p22 amino acid sequences deduced for the 45 ToCV isolates analyzed, clearly showed two separated clades that correlated with the types I and II grouping based on studies of RNA1 nucleotide sequences (Fig. 2 and Supplementary Table 1) [31]. Equivalent tree type and clade grouping was obtained either by neighbor joining or the maximum likelihood algorithm (not shown). Although type II clade includes the ToCV isolates available in databases, from Greece, Brazil, Florida and China (Fig. 2), it should be highlighted that they were clearly separated from the branch where the type II isolates from Spain were located. In contrast to the results obtained here, no significant clustering was deduced from phylogenetic analyses of the p22 sequences of SPCSV isolates [16]. It should be noted that all the p22 sequences from pepper clustered in the type I, whereas those from tomato isolates were included in both, type I or type II clades. Future studies on possible restrictions caused by p22 type II in pepper will be conducted by using the ToCV infectious clone tool recently developed [32].



Fig. 2 Phylogenetic tree based on the p22 amino acid sequences of *Tomato chlorosis virus* isolates considered in this study, constructed using the program MEGA 5.0 [26] and generated by the neighbor-joining method. Bootstrap scores (1000 replicates) over 50% are shown at nodes. For each ToCV isolate the host plant and geographic origin are indicated. For the geographic origin of the Spanish isolates a two letters code was used (MA=Málaga, AL=Almería, MU=Murcia). ToCV isolates from sweet pepper are also highlighted with black boxes. The p22 sequences of isolates from Florida, Greece, Brazil and China available in databases (GenBank accession numbers AY903447, EU284745, JQ952600, KC709509, KF018289, respectively) were also included.

Silencing suppression activity of p22 proteins from the two phylogenetic groups

As two differentiated groups of p22 sequences were detected, we studied if some functional diversity existed among both type of sequences. It was shown that point

mutations in the sequence of a viral suppressor can result into dramatic effects in the suppressor activity [33-37]. Therefore we compared the silencing suppressor activity of one member of each of the two p22 proteins types deduced in this study. For p22 type II protein, we randomly selected the one from the isolate 2.5 and as for p22 type I we used the one from ToCV isolate AT80/99 already analyzed by Cañizares *et al.* (2008). Comparison of the suppressor activities of both ToCV p22 protein types, was done by means of a simultaneous co-infiltration assay, green fluorescence visualization and time course sample analysis in the experimental host *N. benthamiana*. Thus, *N. benthamiana* leaves were co-infiltrated with a mixture of *A. tumefaciens* cultures, one expressing 35S-GFP and a second expressing the desired p22 also under the control of the 35S promoter, using the co-infiltration of 35S-GFP with the empty pBIN19 vector as a negative control. In contrast to tissues co-infiltrated with the empty vector in which progressive decrease of green fluorescence was observed as consequence of RNA silencing activation, maintenance of green fluorescence was observed in tissues co-infiltrated with either p22 type-I (p22-I) or p22 type-II (p22-II) expressing vector, even until 25 dpi (see Fig. 3A, upper panel, for 7 days post infiltration [dpi]). Consistent with these observations, northern blot analysis revealed very low GFP mRNA levels in leaves co-infiltrated with 35S-GFP plus empty vector in contrast to the high levels of GFP mRNA accumulation evident in leaves co-infiltrated with p22-I and p22-II expressing constructs (Fig. 3A, lower panel for 3, 5 and 7dpi). These results demonstrated that both types of p22 showed a similar silencing suppression activity when triggered by positive-sense RNA. Comparative analysis of the strength of p22 type I and type II suppression activity was also performed when using as a strong inducer of RNA silencing a dsRNA by means of co-infiltration of *N. benthamiana* with an *A. tumefaciens* culture harbouring an inverted repeat GFP construct (35S-GF-IR, generating GFP dsRNA), another harbouring 35S-GFP (generating sense GFP RNA) and then 35S-p22-I or 35S-p22-II, using the empty vector as control. In contrast to the decreased GFP fluorescence observed for co-infiltrations with the empty vector, clearly increased fluorescence was observed in patches co-infiltrated with 35S-p22-I or 35S-p22-II, either at 3, 5 and 7 dpi (Fig. 3B), which was maintained even at 25 dpi (Fig. 3C). Northern blot analysis confirmed these results, with high accumulation of GFP mRNAs at either 3, 5 and 7 dpi in leaves infiltrated with 35S-GFP + 35S-GF-IR and 35S-p22-I or 35S-p22-II (Fig. 3B, lower panel). By 25 dpi, although RNA extraction was difficult due to the leaf senescence high levels of mRNA GFP accumulation were still evident in

the co-infiltrations with 35S-p22-I and 35S-p22-II in contrast to the control with the empty vector (Fig. 3C, lower panel). Therefore, even in the presence of a strong inducer of RNA silencing like dsRNA, no significant difference in silencing suppressor activity was shown by both type of p22 proteins, showing a similar lasting local suppression. Thus, in contrast to other examples [33-37], the amino acid differences between the two types of p22 sequences found in isolates present in nature did not result into a differential suppression activity. Therefore, our results support a relevant role of p22 suppression function in ToCV isolates. Although a similar suppressor activity is exhibited by counterparts of ToCV p22 gene by the members of the family *Closteroviridae* *Beet yellows virus*, *Beet yellow stunt virus*, *Citrus tristeza virus*, *Grapevine leafroll-associated virus-2* and *Grapevine leafroll-associated virus-3* [8-11, 13], the long lasting suppression activity in local agroinfiltration assays is unique for ToCV p22.

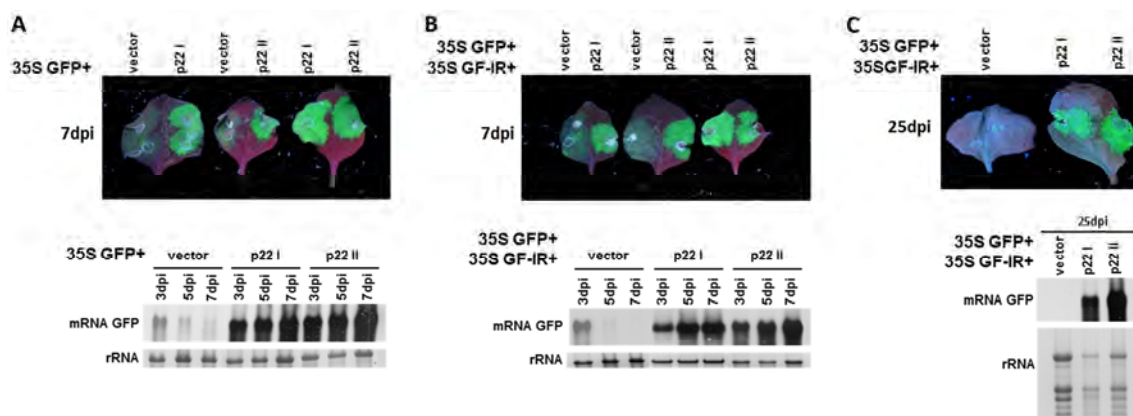


Fig. 3 Suppression of RNA silencing by p22 type I and type II proteins from *Tomato chlorosis virus* isolates AT80/99 and 2.5, respectively, performed by using an *Agrobacterium tumefaciens* co-infiltration assay. **A.** Upper panel shows photographs taken under UV light of *N. benthamiana* leaves at 7 days postinfiltration (dpi) with *A. tumefaciens* harbouring 35S GFP either in combination with the empty vector pBIN19 (vector) or with constructs expressing p22 type I (p22 I) or p22 type II (p22 II). The lower panel shows Northern blot analysis of GFP mRNA extracted from the zones infiltrated with *A. tumefaciens* carrying the constructs indicated at 3, 5 and 7 dpi hybridized with a probe specific to GFP mRNA. Ethidium bromide staining of rRNA was used as loading control. **B.** Upper panel shows photographs taken under UV light of *N. benthamiana* leaves at 7 days postinfiltration (dpi) with *A. tumefaciens* harbouring 35S GFP, 35S GF-IR either in combination with the empty vector pBIN19 (vector) or with constructs expressing p22 type I or p22 type II. The lower panel shows Northern blot analysis of GFP mRNA extracted from the zones infiltrated with *A. tumefaciens* carrying the constructs indicated, at 3, 5 and 7dpi hybridized with a probe specific to GFP mRNA. Ethidium bromide staining of rRNA was used as loading control. **C.** Upper panel shows photographs taken under UV light of *N. benthamiana* leaves at 25 dpi with *A. tumefaciens* harbouring 35S GFP, 35S GF-IR in combination with constructs expressing either p22 type I or p22 type II. The lower panel shows Northern blot analysis of GFP mRNA extracted from the zones infiltrated with *A. tumefaciens* carrying the constructs indicated at 25 dpi hybridized with a probe specific to GFP mRNA. Ethidium bromide staining of rRNA was used as loading control.

In summary, our findings provide experimental evidence that the presence of a “strong” silencing suppressor at the 3′-end of the RNA1, the protein p22, is an important and conserved feature for ToCV isolates. Although the p22 sequences are highly conserved, informative sites located mainly at the C-terminal part of the protein, has allowed the differentiation of two phylogenetic groups, named type I and type II. However, both ToCV p22 type I and ToCV p22 type II behave similarly as “strong” RNA silencing suppressors, which could indicate that such activity is needed for the lifecycle of ToCV. In agreement with this, although using a different experimental approach, strong suppressor activity also was shown for the p22 suppressor of a ToCV isolate from Greece [38] that, although grouped with the type II isolates (Fig. 2), it was fairly separated from the main clade of Spanish isolates.

ACKNOWLEDGEMENTS

Y. L.-R. was the recipient of an AECID (Spain) fellowship. M.C.C. was the recipient of an I3P contract from the CSIC (Spain) co-financed by FSE. This work was supported by grants AGL2013-48913-C2-1-R from the Ministerio de Economía y Competitividad, Spain, and P10-AGR-6516 from Consejería de Economía, Innovación y Ciencia (CEIC), Junta de Andalucía, Spain, co-financed by FEDER-FSE. J.N.C. and E.M.A. are members of the Research Group AGR-214, partially funded by the Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía, Spain. We thank F. Aparicio and I.M. Fortes for providing materials and M.V. Martín and R. Tovar for technical assistance.

REFERENCES

1. D. Baulcombe, RNA silencing in plants. *Nature* **431**, 356-363 (2004)
2. A.J. Hamilton, D.C. Baulcombe, A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**, 950-952 (1999)
3. D. Silhavy, J. Burgyan, Effects and side effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. *Trends in Plant Science* **9**, 76-83 (2004)
4. O. Voinnet, Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nature Reviews Genetics* **6**, 206-220 (2005)
5. V.V. Dolja, J.F. Kreuze, J.P.T. Valkonen, Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Research* **117**, 38-51 (2006)
6. S.W. Ding, B.J. Shi, W.X. Li, R.H. Symons, An interspecies hybrid RNA virus is significantly more virulent than either parental virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 7470-7474 (1996)
7. G. Pruss, X. Ge, X.M. Shi, J.C. Carrington, V.B. Vance, Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* **9**, 859-868 (1997)
8. J.C. Reed, K.D. Kasschau, A.I. Prokhnovsky, K. Gopinath, G.P. Pogue, J.C. Carrington, V.V. Dolja, Suppressor of RNA silencing encoded by *Beet yellows virus*. *Virology* **306**, 203-209 (2003)
9. R. Lu, A.S. Folimonov, M. Shintaku, W.X. Li, B.W. Falk, W.O. Dawson, S.W. Ding, Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 15742-15747 (2004)
10. J.F. Kreuze, E.I. Savenkov, M. Cuellar, X. Li, J.P.T. Valkonen, Viral class 1 RNase III involved in suppression of RNA silencing. *Journal of Virology* **79**, 7227-7238 (2005)
11. M. Chiba, J.C. Reed, A.I. Prokhnovsky, E.J. Chapman, M. Mawassi, E.V. Koonin, J.C. Carrington, V.V. Dolja, Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replicon. *Virology* **346**, 7-14 (2006)
12. M.C. Cañizares, J. Navas-Castillo, E. Moriones, Multiple suppressors of RNA silencing encoded by both genomic RNAs of the crinivirus, *Tomato chlorosis virus*. *Virology* **379**, 168-174 (2008)

13. P. Gouveia, S. Dandlen, A. Costa, N. Marques, G. Nolasco, Identification of an RNA silencing suppressor encoded by *Grapevine leafroll-associated virus 3*. *European Journal of Plant Pathology* **133**, 237-245 (2012)
14. J.A. Díaz-Pendón, S.W. Ding, Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* **46**, 303-326 (2008)
15. J.W. Cuellar, F. Tairo, J.F. Kreuze, J.P.T. Valkonen, Analysis of gene content in *Sweet potato chlorotic stunt virus* RNA1 reveals the presence of the p22 RNA silencing suppressor in only a few isolates: implications for viral evolution and synergism. *Journal of General Virology* **89**, 573-582 (2008)
16. A.K. Tugume, R. Amayo, I. Weinheimer, S.B. Mukasa, P.R. Rubaihayo, J.P.T. Valkonen, Genetic variability and evolutionary implications of RNA silencing suppressor genes in RNA1 of *Sweet potato chlorotic stunt virus* isolates infecting sweetpotato and related wild species. *PLoS ONE* **8**, 11 (2013)
17. G.C. Wisler, R.H. Li, H-Y. Liu, D.S. Lowry, J.E. Duffus, *Tomato chlorosis virus*: a new whitefly-transmitted, phloem-limited bipartite closterovirus of tomato. *Phytopathology* **88**, 402-409 (1998).
18. G. Lozano, E. Moriones, J. Navas-Castillo, Complete sequence of the RNA1 of a European isolate of *Tomato chlorosis virus*. *Archives of Virology* **152**, 839-841 (2007)
19. G. Lozano, E. Moriones, J. Navas-Castillo, First report of sweet pepper (*Capsicum annuum*) as a natural host plant for *Tomato chlorosis virus*. *Plant Disease* **88**, 224 (2003)
20. I.M. Fortes, E. Moriones, J. Navas-Castillo, *Tomato chlorosis virus* in pepper: prevalence in commercial crops in south-eastern Spain and symptomatology under experimental conditions. *Plant Pathology* **61**, 994-1001 (2012)
21. J. Wang, A.M. Sharma, S. Duffy, R.P. Almeida, Genetic diversity in the 3' terminal 4.7 kb region of *Grapevine leafroll-associated virus 3*. *Phytopathology* **101**, 445-450 (2011)
22. O. Voinnet, D.C. Baulcombe, Systemic signalling in gene silencing. *Nature* **389**, 553 (1997)
23. E.H. Bayne, D.V. Rakitina, S.Y. Morozov, D.C. Baulcombe, Cell-to-cell movement of potato potexvirus X is dependent on suppression of RNA silencing. *The Plant Journal* **44**, 471-482 (2005)

24. O. Voinnet, P. Vain, S. Angell, D.C. Baulcombe, Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* **95**, 177-187 (1998)
25. E. Noris, G.P. Accotto, R. Tavazza, A. Brunetti, S. Crespi, M. Tavazza, Resistance to Tomato yellow leaf curl geminivirus in *Nicotiana benthamiana* plants transformed with a truncated viral C1 gene. *Virology* **224**, 130-138 (1996)
26. M.C. Cañizares, K.M. Taylor, G.P. Lomonosoff, Surface-exposed C-terminal amino acids of the small coat protein of *Cowpea mosaic virus* are required for suppression of silencing. *Journal of General Virology* **85**, 3431-3435 (2004)
27. I.D. Thompson, T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D.G. Higgins, The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**, 4876-4882 (1997)
28. K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar, MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**, 2731-2739 (2011)
29. K. Ye, D.J. Patel, RNA silencing suppressor p21 of *Beet yellows virus* forms an RNA binding octameric ring structure. *Structure* **13**, 1375-1384 (2005)
30. A. Lingel, B. Simon, E. Izaurralde, M. Sattler, The structure of the *flock house virus* B2 protein, a viral suppressor of RNA interference, shows a novel mode of double-stranded RNA recognition. *EMBO Reports* **6**, 1149-1155 (2005)
31. G. Lozano, A. Grande-Pérez, J. Navas-Castillo, Populations of genomic RNAs devoted to the replication or spread of a bipartite plant virus differ in genetic structure. *Journal of Virology* **83**, 12973-12983 (2009)
32. A.F. Orílio, I.M. Fortes, J. Navas-Castillo, Infectious cDNA clones of the crinivirus *Tomato chlorosis virus* are competent for systemic plant infection and whitefly-transmission. *Virology* **464-465**, 365-374 (2014)
33. H.Y. Chen, J. Yang, C. Lin, Y.A. Yuan, Structural basis for RNA silencing suppression of *Tomato aspermy virus* protein 2b. *EMBO Journal* **9**, 754-760 (2008)
34. C. Torres-Barceló, S. Martín, J.A. Darós, S.F. Elena, From Hypo- to Hypersuppression: effect of amino acid substitutions on the RNA silencing suppressor activity of the tobacco etch potyvirus HC-Pro. *Genetics* **180**, 1039-1049 (2008)

35. M.L. Yambao, H. Yagihashi, H. Sekiguchi, T. Sekiguchi, T. Sasaki, M. Sato, G. Atsumi, Y. Tacahashi, K.S. Nakahara, I. Uyeda, Point mutations in helper component protease of *Clover yellow vein virus* are associated with the attenuation of RNA-silencing suppression activity and symptom expression in broad bean. *Archives of Virology* **153**, 105-115 (2008)
36. J. Ye, J. Qu, J.F. Zhang, Y.F. Geng, R.X. Fang, A critical domain of the *Cucumber mosaic virus* 2b protein for RNA silencing suppressor activity. *FEBS Letters* **583**, 101-106 (2009)
37. P. Gouveia, G. Nolasco, The p19.7 RNA silencing suppressor from *Grapevine leafroll-associated virus 3* shows different levels of activity across phylogenetic groups. *Virus Genes* **45**, 333-339 (2012)
38. A.R.M. Kataya, M.N.S. Suliman, K. Kalantidis, I.C. Livieratos, *Cucurbit yellow stunting disorder virus* p25 is a suppressor of post-transcriptional gene silencing. *Virus Research* **145**, 48-53 (2009)

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Table 1. *Tomato chlorosis virus* isolates used for the analysis of p22 genetic diversity with indication of the name, collection data and genetic type of their RNA1.

Isolate	Geographical origin	Year	Host	Type of RNA1 ^a	Sequence accession no.	Reference
AT4/07	Malaga, Spain	2007	Sweet pepper	I	KP668814	This study
AT248/06	Malaga, Spain	2006	Tomato	II	KP668815	This study
AT133/08	Malaga, Spain	2008	Sweet pepper	I	KP668816	This study
AT264/06	Malaga, Spain	2006	Tomato	II	KP668817	This study
AT2/09	Malaga, Spain	2009	Tomato	I	KP668818	This study
AT92/06	Almeria, Spain	2006	Tomato	II	KP668819	This study
AT103/09	Murcia, Spain	2009	Tomato	II	KP668820	This study
AT52/09	Almeria, Spain	2009	Tomato	II	KP668821	This study
10B7	Malaga, Spain	2006	Sweet pepper	I	KP668822	This study
7/23	Malaga, Spain	2006	Sweet pepper	I	KP668823	This study
AT6/07	Malaga, Spain	2007	Sweet pepper	I	KP668824	This study
10B1	Malaga, Spain	2006	Sweet pepper	I	KP668825	This study
7/37	Malaga, Spain	2006	Sweet pepper	I	KP668826	This study
AT88/06	Almeria, Spain	2006	Sweet pepper	I	KP668827	This study
AT11/07	Malaga, Spain	2007	Sweet pepper	I	KP668828	This study
AT17/07	Malaga, Spain	2007	Sweet pepper	I	KP668829	This study
AT19/07	Malaga, Spain	2007	Sweet pepper	I	KP668830	This study
AT155/08	Malaga, Spain	2008	Sweet pepper	I	KP668831	This study
AT152/08	Malaga, Spain	2008	Sweet pepper	I	KP668832	This study
AT145/08	Malaga, Spain	2008	Sweet pepper	I	KP668833	This study
AT189/06	Malaga, Spain	2006	Tomato	I	KP668834	This study
AT126/06	Almeria, Spain	2006	Tomato	I	KP668835	This study
AT106/06	Almeria, Spain	2006	Tomato	I	KP668836	This study
AT158/06	Murcia, Spain	2006	Tomato	I	KP668837	This study
AT13/08	Malaga, Spain	2008	Tomato	I	KP668838	This study
AT66/08	Murcia, Spain	2008	Tomato	I	KP668839	This study
AT60/09	Almeria, Spain	2009	Tomato	I	KP668840	This study
AT136/06	Murcia, Spain	2006	Tomato	I	KP668841	This study
AT146/06	Murcia, Spain	2006	Tomato	I	KP668842	This study
AT89/06	Almeria, Spain	2006	Tomato	II	KP668843	This study
AT209/06	Malaga, Spain	2006	Tomato	II	KP668844	This study
AT265/06	Malaga, Spain	2006	Tomato	II	KP668845	This study
AT5/08	Malaga, Spain	2008	Tomato	II	KP668846	This study
AT43/08	Almeria, Spain	2008	Tomato	II	KP668847	This study
AT74/08	Murcia, Spain	2008	Tomato	II	KP668848	This study
AT18/09	Malaga, Spain	2009	Tomato	II	KP668849	This study
AT44/09	Almeria, Spain	2009	Tomato	II	KP668850	This study
AT89/09	Murcia, Spain	2009	Tomato	II	KP668851	This study
2.5	Malaga, Spain	2010	Tomato	II	KP979663	This study
AT80/99	Malaga, Spain	1999	Tomato	I	DQ983480	1

Br-2	Brazil	2010	Tomato	II	JQ952600	2
Florida	Florida	1996	Tomato	II	AY903447	3
Gr-535	Greece	2007	Tomato	II	EU284745	4
SDSG	China	2012	Tomato	II	KC709509	5
NJ	China	2011	Tomato	II	KF018280	6

^a: types of RNA1 as previously reported by Lozano *et al.* [7] and Fortes *et al.*, unpublished data.

REFERENCES

(shown on supplementary Table 1):

1. G. Lozano, E. Moriones, J. Navas-Castillo, Complete sequence of the RNA1 of a European isolate of *Tomato chlorosis virus*. *Archives of Virology* **152**, 839-841 (2007)
2. L.C. Albuquerque, F. Villanueva, R.O. Resende, J. Navas-Castillo, J.C. Barbosa, A.K. Inoue-Nagata, Molecular characterization reveals Brazilian *Tomato chlorosis virus* to be closely related to a Greek isolate. *Tropical Plant Pathology* **38**, 332-336 (2013)
3. W. Wintermantel, G. Wisler, A. Anchieta, H.Y. Liu, A. Karasev, I. Tzanetakis, The complete nucleotide sequence and genome organization of *Tomato chlorosis virus*. *Archives of Virology* **150**, 2287-2298 (2005)
4. A.R.M. Kataya, M.N.S. Suliman, K. Kalantidis, I.C. Livieratos, *Cucurbit yellow stunting disorder virus* p25 is a suppressor of post-transcriptional gene silencing. *Virus Research* **145**, 48-53 (2009)
5. L.M. Zhao, G. Li, Y. Gao, Y.J. Liu, G.Z. Sun, X.P. Zhu, Molecular detection and complete genome sequences of *Tomato chlorosis virus* isolates from infectious outbreaks in China. *Journal of Phytopathology* **162**, 627-634 (2014)
6. M. Karwitha, Z. Feng, M. Yao, X. Chen, W. Zhang, X. Liu, X. Tao, The complete nucleotide sequence of the RNA 1 of a Chinese isolate of *Tomato chlorosis virus*. *Journal of Phytopathology* **162**, 411-415 (2013)
7. G. Lozano, A. Grande-Pérez, J. Navas-Castillo, Populations of genomic RNAs devoted to the replication or spread of a bipartite plant virus differ in genetic structure. *Journal of Virology* **83**, 12973-12983 (2009)

Supplementary Fig. 1 Alignment of the nucleotide (nt) sequences of the p22 gene of the 45 *Tomato chlorosis virus* isolates considered in this study. Numbers on top and on the right of the alignment indicate the nt position. The parsimony informative sites and singletons are indicated with grey shades.

	*	20	*	40	*	60	*	80	
AT106/06	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGA	TTTCAGAAGT	:	80			
AT146/06	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGA	TTTCAGAAGT	:	80			
AT126/06	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGA	TTTCAGAAGT	:	80			
AT136/06	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGA	TTTCAGAAGT	:	80			
AT158/06	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGA	TTTCAGAAGT	:	80			
AT80/99	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGA	TTTCAGAAGT	:	80			
AT66/08	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGA	TTTCAGAAGT	:	80			
AT189/06	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGA	TTTCAGAAGT	:	80			
10B7	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGA	TTT	AGAAGT	:	80		
7/23	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGA	TTTCAGAAGT	:	80			
AT4/07	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGA	TTTCAGAAGT	:	80			
AT152/08	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGA	TTTCAGAAGT	:	80			
AT60/09	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGA	TTTCAGAAGT	:	80			
AT155/08	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGA	TTTCAGAAGT	:	80			
10B1	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGA	TTTCAGAA	T	:	80		
7/37	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGA	TTTCAGAAGT	:	80			
AT88/06	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGA	TTTCAGAAGT	:	80			
AT11/07	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGA	TTTCAGAAGT	:	80			
AT17/07	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGA	TTTCAGAAGT	:	80			
AT19/07	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGA	TTTCAGAAGT	:	80			
AT145/08	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGA	TTTCAGAAGT	:	80			
AT13/08	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGA	TTTCAGAAGT	:	80			
AT2/09	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGA	TTTCAGAAGT	:	80			
AT6/07	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGA	TTTCAGAAGT	:	80			
AT133/08	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGA	TTTCAGAAGT	:	80			
AT248/06	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGAC	TTTCAGAAGT	:	80			
AT103/09	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGAC	TTTCAGAAGT	:	80			
AT264/06	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGAC	TTTCAGAAGT	:	80			
AT92/06	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGAC	TTTCAGAAGT	:	80			
AT89/09	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGAC	TTTCAGAAGT	:	80			
AT89/06	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGAC	TTTCAGAAGT	:	80			
AT52/09	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGAC	TTTCAGAAGT	:	80			
AT209/06	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGAC	TTTCAGAAGT	:	80			
AT265/06	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGAC	TTTCAGAAGT	:	80			
AT5/08	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGAC	TTTCAGAAGT	:	80			
AT43/08	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGAC	TTTCAGAAGT	:	80			
AT74/08	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGAC	TTTCAGAAGT	:	80			
AT18/09	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGAC	TTTCAGAAGT	:	80			
AT44/09	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGAC	TTTCAGAAGT	:	80			
2.5	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGAC	TTTCAGAAGT	:	80			
Florida	:	ATGGATCTCACTGGTTG	TTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGAC	TTTCAGAAGT	:	80		
Br-2	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGAC	TTTCAGAAGT	:	80			
SDSG	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTG	GTAATGAC	TTTCAGAAGT	:	80		
Gr-535	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGG	AATGAC	TTTCAGAAGT	:	80		
NJ	:	ATGGATCTCACTGGTTGCTTGC	TAAGCTTCGACAGTGTGATCGACTTCTTGAGAGGCTGGGTAATGAC	TTTCAGAAGT	:	80			

AT106/06 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT146/06 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT126/06 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT136/06 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT158/06 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT80/99 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT66/08 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT189/06 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 10B7 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 7/23 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT4/07 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT152/08 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT60/09 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT155/08 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 10B1 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 7/37 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT88/06 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT11/07 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT17/07 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT19/07 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT145/08 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT13/08 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT2/09 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT6/07 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT133/08 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT248/06 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT103/09 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT264/06 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT92/06 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT89/09 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT89/06 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT52/09 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT209/06 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT265/06 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT5/08 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT43/08 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT74/08 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT18/09 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 AT44/09 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 2.5 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 Florida : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 Br-2 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 SDSG : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 Gr-535 : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582
 NJ : TTTCTTTGGGAGTGATATATAA : 582

CAPÍTULO II





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

The p22 RNA silencing suppressor of the crinivirus *Tomato chlorosis virus* preferentially binds long dsRNAs preventing them from cleavage

Yazmín Landeo-Ríos, Jesús Navas-Castillo, Enrique Moriones, M. Carmen Cañizares

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”- Universidad de Málaga - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Estación Experimental “La Mayora”, 29750 Algarrobo-Costa, Málaga, Spain.

Virology 488, 129-136 (2016)

ABSTRACT

Viruses encode silencing suppressor proteins to counteract RNA silencing. Because dsRNA plays a key role in silencing, a general silencing suppressor strategy is dsRNA binding. The p22 suppressor of the plant virus *Tomato chlorosis virus* (ToCV; genus *Crinivirus*, family *Closteroviridae*) has been described as having one of the longest lasting local suppressor activities. However, the mechanism of action of p22 has not been characterized. Here, we show that ToCV p22 binds long dsRNAs *in vitro*, thus interfering with their processing into small RNAs (sRNAs) by an RNase III-type Dicer homologue enzyme. Additionally, we have studied whether a putative zinc finger motif found in p22 has a role in dsRNA binding and suppressor function. The efficient ability of p22 to suppress RNA silencing, triggered by hairpin transcripts transiently expressed *in planta*, supports the relationship between its ability to bind dsRNA *in vitro* and its ability to inhibit RNA silencing *in vivo*.

INTRODUCTION

Post-transcriptional RNA silencing is a sequence-specific RNA-mediated gene regulatory mechanism that also serves as an antiviral defense (Baulcombe, 2005). RNA silencing is induced by double-stranded RNAs (dsRNAs) that, in the case of single-stranded RNA (ssRNA) viruses, can be derived from highly structured regions in the RNA genome or generated during the replication cycle (Szittyá *et al.*, 2002; Molnár *et al.*, 2005). Subsequently, dsRNAs are processed by an RNase III-type Dicer-like enzyme (DCL) into double-stranded small RNAs (sRNAs) of 21 to 24 nucleotides (Hamilton and Baulcombe, 1999) with 2 nt 3'-overhangs. Then, one strand of these sRNAs is incorporated into an RNA-induced silencing complex (RISC) that serves as a guide to initiate the sequence-specific degradation of target RNAs (Baulcombe, 2005). This process is amplified by host-encoded RNA-dependent RNA polymerases (RDR) that convert single-stranded RNA into dsRNA, which is subsequently processed by DCL into secondary sRNAs. To counteract this antiviral mechanism, plant viruses encode RNA silencing suppressor proteins (Voinnet, 2005), which are highly diverse in sequence, structure, and activity within and across virus families. Thus, while some viruses have delegated the suppressor functions to replication, structural or transport proteins, other viruses encode dedicated suppressor proteins without homology to any other viral or host protein (Dolja *et al.*, 2006). Viral silencing suppressors can target *all* steps of RNA silencing, such as viral RNA recognition, dicing, RISC assembly, RNA targeting, and amplification (Burguán and Havelda, 2011). Because dsRNAs play a key role in RNA silencing, viral suppressor proteins use dsRNA binding as a general strategy of suppression (Méraí *et al.*, 2006). The dsRNA-binding suppressors (dsRBSs), based on their specificity for dsRNA size, can be broadly classified into two types: (i) dsRBSs that preferentially bind long hairpin-derived or inverted repeat dsRNA, preventing them from being processed into sRNAs by DCL, as shown for P14 of *Pothos latent virus* (Méraí *et al.*, 2005); and (ii) dsRBSs that bind sRNAs and/or sequester them, preventing their incorporation into the RISC complex, as shown for the toombusvirus P19 (Lakatos *et al.*, 2004).

Tomato chlorosis virus (ToCV; genus *Crinivirus*) belongs to the family *Closteroviridae*, in which the largest RNA genomes among plant viruses are found (Dolja *et al.*, 2006). Closterovirus gene expression includes at least three different RNA expression mechanisms: i) proteolytic processing, ii) translational frameshifting, and iii)

formation of 3'-co-terminal subgenomic RNAs (sgRNAs), resembling the mechanism in animal coronavirus (Karasev *et al.*, 1997). The replication process generates high amounts of viral RNA species, such as dsRNA replicative intermediates that correspond to the genomic RNA and sgRNAs (Hilf *et al.*, 1995). ToCV is transmitted in nature by the whitefly (Hemiptera: Aleyrodidae) *Bemisia tabaci* and has a bipartite single-stranded, positive-sense RNA genome (Wisler *et al.*, 1998). As for other members of the family *Closteroviridae* (Lu *et al.*, 2004), ToCV adopts the strategy of encoding multiple RNA silencing suppressors (Cañizares *et al.*, 2008). Thus, while ToCV RNA-2 has delegated its suppressor function to the structural proteins CP and CPm, RNA-1 encodes a dedicated suppressor protein at its 3'-proximal end, p22, which exhibits no apparent homology to any other reported protein. It has been shown that p22 very efficiently suppresses local RNA silencing, induced either by sense RNA or by dsRNA, interfering with the initial stages of RNA silencing. Moreover, it has been reported that p22 has one of the longest lasting local suppression activities when assayed in *Nicotiana benthamiana* (Cañizares *et al.*, 2008), although its mechanism of action has not been characterized.

Because the expression of viral proteins with suppressor activity seems to be essential for virus multiplication and effective systemic infection of the host, the study of the mechanism of action of these proteins will improve the understanding of the foundations of plant-virus interactions. Here, we demonstrate that the ToCV p22 suppressor preferentially binds long dsRNAs *in vitro*, preventing them from being cleaved by an RNase III-type Dicer homologue enzyme. Additionally, we have assessed whether a putative zinc finger domain located in the N-terminal part of the protein, highly similar to the one found in the p23 suppressor, a protein that is unique to *Citrus tristeza virus* (CTV) within closteroviruses, plays a role in both dsRNA binding and suppression activity. Finally, the demonstration that the p22 protein suppresses silencing triggered by hairpin transcripts transiently expressed *in planta* links the *in vitro* long dsRNA binding capability of the protein to its ability to inhibit RNA silencing *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid construction

For gene expression, the ToCV p22 gene was PCR-amplified from plasmid pGEM-T-p22 (Cañizares *et al.*, 2008) using the Expand High Fidelity PCR system (Roche Diagnostics) and primers MA 1287 and MA 1288 with specific restriction sites. The PCR product was digested, purified and cloned into *Escherichia coli* expression vector pET-28a(+) (Novagen), resulting in the pET28a-p22 construct, harboring the p22 gene fused to a sequence coding for a hexa-His tag. To generate the p22 Δ 2Cys construct, which lacked four amino acid residues including two cysteines located between positions 39–42 (C-terminal region), amplification from plasmids pET28a-p22 and pBin35S-p22 (Cañizares *et al.*, 2008) was performed. Mutations were introduced by PCR using the QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) and the specific primers MA 1616 and MA 1617, generating pET28a-p22 Δ 2Cys and pBIN35S-p22 Δ 2Cys.

The constructs pBIN35S-p22 and pETDuet.SAHH have been previously described (Cañizares *et al.*, 2008, 2013). The 35S-dsSAHH construct was kindly provided by Dr. David M. Bisaro (The Ohio State University, Columbus, OH, USA), and plasmids 35S-GFP and 35S-P19 were kindly provided by Dr. David C. Baulcombe (University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom).

Purification, analysis and quantification of p22 protein and its mutant from *E. coli*

Expression of His-tagged p22 and its mutant protein and of the negative control protein SAHH were performed in the *E. coli* strain Rosetta 2 (DE3)pLysS (Novagen). Expression was induced in the transformed bacteria with 0.4 mM isopropyl β -D-thiogalactopyranoside for 3 h at 28 °C, and the proteins were purified by chromatography on nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) columns according to the manufacturer's recommendations (Qiagen). The purified proteins were analyzed and quantified by 15% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) after Coomassie brilliant blue staining.

Preparation of labeled nucleic acids

DIG-labeled dsRNAs of 562 and 100 base pairs (bp) were generated by *in vitro* transcription with T7 RNA polymerase (Roche Diagnostics). Primers incorporating 5'-end T7 RNA polymerase promoters into the PCR products were used to amplify two

regions of 562 and 100 nucleotides (nt) of the pTOPO-GFP plasmid using either the primer pair MA 1366 and MA 1337 or the pair MA 1336 and MA 1337 (Supplementary Table 1), respectively, with the Expand High Fidelity PCR system (Roche Diagnostics). To synthesize the labeled RNA, DIG-11-UTP (Roche Diagnostics) was included in the transcription reaction. The small dsRNAs (sRNAs) were ordered as two complementary 21 nt oligonucleotides with a RNA 3'-end overhang (MA1633: 5'-ACUGGAGUUGUCCCAAUUCUU-3' and MA 1634: 5'-GAAUUGGGACAACUCCAGUGA-3'). The antisense oligonucleotide was also prepared with a DIG molecule at the 3'-end. These small RNAs were synthesized by Sigma-Aldrich. Duplex dsRNAs of 562 bp and 100 bp were obtained by annealing the two complementary T7 transcripts produced *in vitro*, and small RNA (sRNA) duplexes were obtained by annealing the two complementary RNA oligonucleotides. In both cases, to anneal complementary strands, reaction mixtures were incubated for 1 min at 95 °C and cooled to room temperature. For 562 or 100 nt ssRNA synthesis, the same strategy was used but with the reverse primer MA1337b, containing the same GFP sequence present in MA1337 but without the T7 promoter sequence (Supplementary Table 1). The PCR products containing the T7 promoter sequence at only one of the ends were used as a template for *in vitro* transcription. In all transcripts, the DNA template was removed by treatment with DNase I (Invitrogen). Unincorporated nucleotides were removed using NucAway Spin Columns (Ambion). For single- and double-strand quantification, RNAs were analyzed in 5% acrylamide gel and stained with ethidium bromide, where the different mobilities of both types of molecules could be clearly observed.

DIG-labeled dsDNA of 562 nt was obtained by PCR using primers MA 1366b and MA 1337b (Supplementary Table 1), which contained the same GFP sequence present in primers MA1366 and MA1337 but without the T7 promoter sequence, including DIG-11-dUTP in the reaction. The ssDNA was produced by boiling the dsDNA for 5 min and quickly cooling it on ice. Labeled DNA was analyzed by electrophoresis in 1% agarose gel/TBE buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acid, 0.5 mM EDTA) and stained with ethidium bromide.

Electrophoretic mobility shift assay

Labeled nucleic acids (~1 nM) were mixed with increasing amounts of His-tagged p22 or its mutant in a 10 µl reaction containing binding buffer [20 mM Tris/HCl

pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 60 mM KCl, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 1% glycerol, 0.02% Tween-20, 0.1% Bovine Serum Albumin and 8 U ribonuclease inhibitor RNaseOUT (Invitrogen)]. The binding reaction was incubated at room temperature for 30 min and resolved in a 1% agarose gel run in TBE buffer. The gel was vacuum-transferred (Vacugene XL, GE Healthcare) onto positively charged nylon membranes (Roche Diagnostics) for 3 h in SSC 10x buffer (1.5 M NaCl, 0.15 M sodium citrate, pH 7). Samples were crosslinked under UV light (Ultraviolet Crosslinker RPN 2500, Amersham). The membranes were treated with anti-digoxigenin antibody (Anti-digoxigenin-AP, Fab fragments, Roche Diagnostics) and detected with the alkaline phosphatase chemiluminescent substrate (CDP-Star, Roche Diagnostics) according to the manufacturer's protocols. As a negative control, a non-related protein involved in methylation reactions in plants, SAHH, fused to a His tag, was expressed and purified in the same manner as p22 (Cañizares *et al.*, 2013).

RNase III-mediated cleavage assay

The RNase III-mediated cleavage assay was performed in 10 µl volumes containing ~1 nM 562 bp dsRNA, 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 60 mM KCl, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 1% glycerol, 0.02% Tween-20, 0.1% Bovine Serum Albumin, 1 x RNase III buffer, and different amounts of p22 or SAHH as a negative control. Following 30 min of preincubation at room temperature to allow the test proteins to bind to dsRNA, 1 U of RNase III (Ambion) was added, and the reaction mixtures were incubated at 37 °C for 1 h. The reaction products were resolved by electrophoresis in 1% agarose gel/TBE buffer. As a marker lane, an unlabeled RNA oligonucleotide 22 nt in length was run in parallel. The gel was stained with ethidium bromide before transfer, and the marker lane was cut. Nucleic acids were vacuum-transferred (Vacugene XL, GE Healthcare) to positively charged nylon membranes (Roche Diagnostics) for 3 h in SSC 10x buffer (1.5 M NaCl, 0.15 M sodium citrate, pH 7) and crosslinked under UV light (Ultraviolet Crosslinker RPN 2500, Amersham). Then, the membranes were treated with anti-digoxigenin antibody (Anti-digoxigenin-AP, Fab fragments, Roche Diagnostics) and detected with the alkaline phosphatase chemiluminescent substrate (CDP-Star, Roche Diagnostics) according to the manufacturer's protocols.

Agroinfiltration, silencing suppression assays and fluorescence imaging

Wild-type *N. benthamiana* plants were grown in a chamber at 25 °C with a photoperiod of 16 h of light and 8 h of darkness. Plants at the four- to six-leaf growth stage were agroinfiltrated with *A. tumefaciens* strain GV3101 carrying the plasmids indicated above, as described by Voinnet *et al.*, (1998). For co-infiltration, the *A. tumefaciens* cultures were adjusted to an optical density at 600 nm of 1 and mixed prior to infiltration. For the identification of suppressor activity by visual inspection of GFP fluorescence, the 35S-GFP construct was co-expressed with a construct expressing p22 and its mutant or empty vector. For the silencing assays triggered by hairpin transcripts, the 35S-dsSAHH construct or empty vector was infiltrated alone or in combination with constructs expressing the suppressor proteins P19 or p22. GFP fluorescence was observed under long-wavelength UV light (Black Ray model B 100AP, UV products). Pictures of GFP were taken using a Coolpix 8700 Nikon digital camera.

Northern blot analysis

RNA was extracted from agroinfiltrated leaf tissue as described by Noris *et al.* (1996). For the northern blot analysis of GFP mRNAs, total RNA aliquots (5 µg) from each sample were separated in 1% formaldehyde agarose gels, transferred to nylon membranes (Roche Diagnostics) and probed with DIG-labeled probes specific for GFP, as described previously (Cañizares *et al.*, 2004).

Semi-quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from agroinfiltrated leaf tissue as described above and further treated with DNase I to eliminate genomic DNA. RNA pellets were resuspended in water and quantified in a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies). Total RNA (500 ng) was reverse transcribed with oligo-dT primers using AMV RT (Promega). The resulting single-stranded cDNA was used for PCR to detect SAHH transcripts using the specific primers MA 748 and MA 749. PCR with the specific primers MA 720 and MA 721 for the cytochrome c oxidase transcripts (Kadowaki *et al.*, 1995) was used as an internal control. Aliquots were withdrawn from the PCR reaction after 20, 25, 30, and 35 cycles and analyzed by agarose gel electrophoresis.

RESULTS

p22 preferentially binds long dsRNA *in vitro*

A previous report showed that the protein p22 of ToCV suppressed RNA silencing induced by either sense or double-stranded RNAs (dsRNAs), indicating that it acts downstream of the formation of dsRNA (Cañizares *et al.*, 2008). Moreover, the drastic reduction of sRNA when p22 is present, compared to that conferred by other suppressors such as tombusviral p19 that act by specifically binding sRNAs (Takeda *et al.*, 2002; Lakatos *et al.*, 2006), suggested that p22 could interfere with the RNA silencing pathway upstream of sRNA synthesis. Therefore, the ability of His-tagged p22 to bind different digoxigenin (DIG)-labeled dsRNAs was analyzed by electrophoretic mobility shift assays (EMSA) using increasing amounts of protein. As a negative control in our experiments, we used a non-related protein, S-adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH), fused to a His tag, which was expressed and purified in the same way (Cañizares *et al.*, 2013). Long dsRNAs of 562 or 100 base pairs (bp) and small dsRNAs (sRNA) of 21 bp were used. As shown in Figure 1A, in the case of the 562 bp dsRNA, all the RNA was shifted into a complex that gradually increased in size with increasing protein amounts, even at the lowest p22 protein concentration. No such RNA shifting was observed in the case of the control protein SAHH, confirming that the gel retardation observed was the result of an interaction of the dsRNA with p22. The gradually decreased mobility of the shifted band is likely due to the instability of the complex during electrophoresis at lower protein concentrations, which could indicate that multiple units of p22 are capable of binding to the 562 bp dsRNA, stabilizing the complex. A lower affinity of p22 to the 100 bp dsRNA was observed. In this case, although a decreased mobility of the shifted band was also shown with increasing protein amounts, some dsRNA remained unbound, even with the highest protein concentration used (Figure 1B). No complex formation was observed for the negative SAHH control. In contrast, similarly to the negative control, no significant binding of p22 to small 21 bp dsRNAs was observed, even at the highest protein concentration used (Figure 1C). Because in this case, the DIG molecule could be interfering with the binding of p22, the EMSA assay was also performed with 21 bp dsRNA containing a 2 nt overhang with a free OH at the 3' end, staining the gel with ethidium bromide. As before, no evident shifting of the RNA mobility was observed (data not shown).

Taken together, our *in vitro* assays indicate that p22 is able to bind dsRNA and that it preferentially binds long dsRNAs.

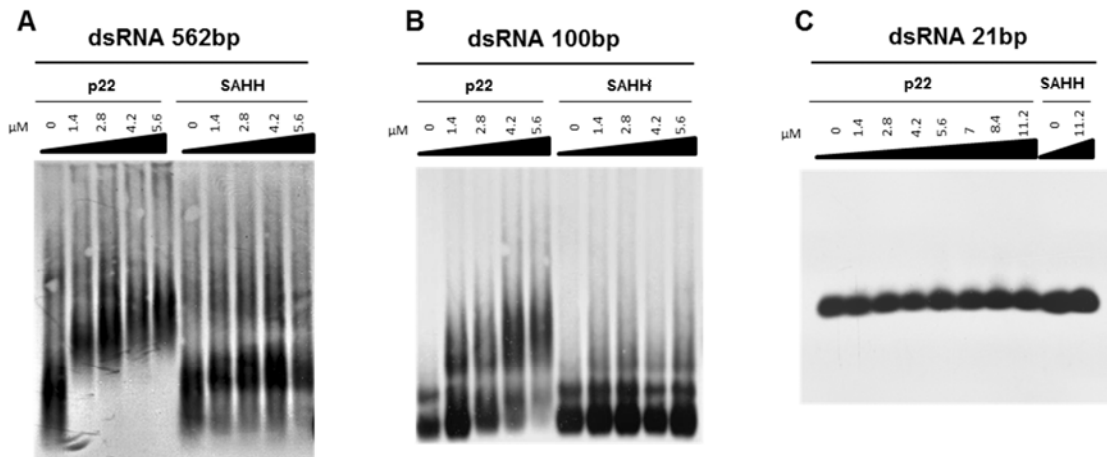


Fig. 1. Affinity of *Tomato chlorosis virus* p22 to 562 bp, 100 bp dsRNAs, and 21 bp sRNAs. Representative EMSA assays with (A) 562 bp DIG-labeled dsRNA (B) 100 bp DIG-labeled dsRNA (C) 21 nt dsRNA DIG-labeled at the 3'-end of the antisense overhang. The protein S-adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH) was used as a negative control. The concentrations of the p22 and SAHH proteins are indicated above each lane. The RNA/proteins were transferred to nylon membranes, and dsRNAs were detected using an anti-digoxigenin antibody and a chemiluminescent substrate.

p22 binds ssRNA but not ssDNA or dsDNA *in vitro*

Although the described dsRNA binding activity has been shown to be an important mechanism of silencing suppression for many viral suppressors (Merai *et al.*, 2006), we also tested whether p22 can bind other types of nucleic acids such as ssRNAs, single-stranded DNA (ssDNA) or double-stranded DNA (dsDNA). Following the experimental approach described, the ability of His-tagged p22 to bind different DIG-labeled nucleic acid types was analyzed by EMSA. The unrelated SAHH protein purified in the same way was also used in these assays. Long ssRNAs of 562 or 100 nt and ssDNA and dsDNA of 562 nt were used. As shown in Figure 2, while the ssRNA of both sizes was shifted into a complex of gradually decreased mobility with increasing amounts of p22 protein, no DNA shifting was observed with either ssDNA or dsDNA. No complex formation was observed with the SAHH protein.

These results show that while p22 binds both 562 and 100 nt ssRNA with high affinity, it cannot bind either ssDNA or dsDNA.

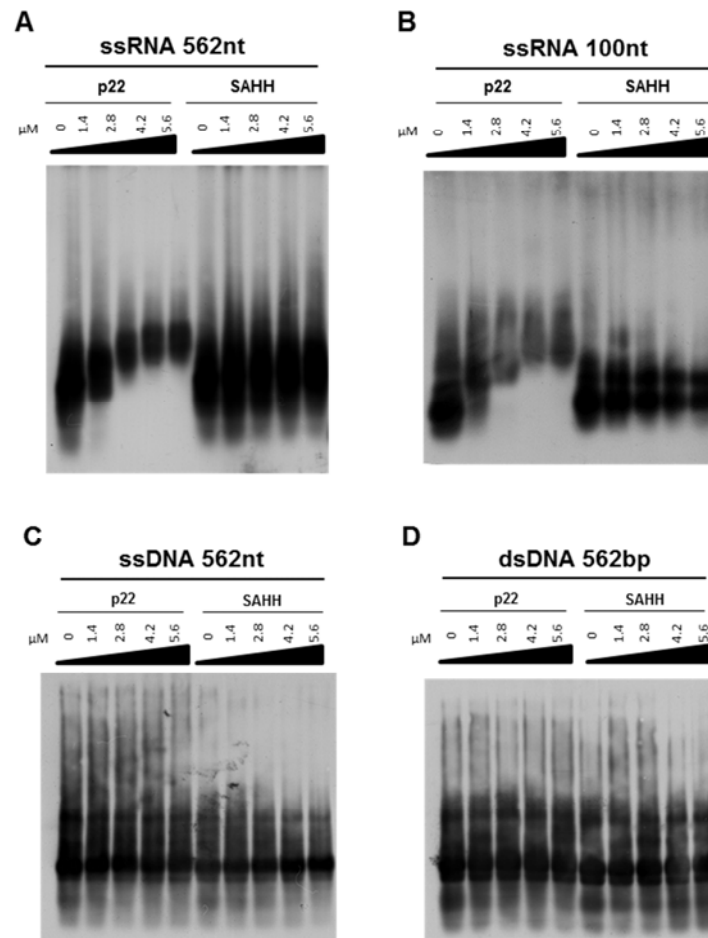


Fig. 2. Affinity of *Tomato chlorosis virus* p22 to 562 nt or 100 nt ssRNAs and to 562 nt ssDNA and dsDNA. Representative EMSA assays with (A) 562 nt DIG-labeled ssRNA (B) 100 nt DIG-labeled ssRNA (C) 562 nt DIG-labeled ssDNA (D) 562 nt DIG-labeled dsDNA. The protein S-adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH) was used as a negative control. The concentrations of the p22 and SAHH proteins are indicated above each lane. The nucleic acids/proteins were transferred to nylon membranes, and dsRNAs were detected using an anti-digoxigenin antibody and a chemiluminescent substrate.

ToCV p22 inhibits RNase III Dicer cleavage by sequestering long dsRNAs

Based on the observed ability of ToCV p22 to bind long dsRNAs with high affinity *in vitro*, we then studied its ability to protect them from RNase III-mediated cleavage. For this purpose, we used bacterial RNase III, a Dicer homologue used for *in vitro* experiments as previously reported (Zhang *et al.*, 2004; Fenner *et al.*, 2007; Ji, 2008; Qi *et al.*, 2011), and as a substrate we used a DIG-labeled, *in vitro*-transcribed 562 bp dsRNA precursor. As shown in Figure 3, preincubation with increasing amounts of p22 resulted in a reduced amount of substrate cleaved by RNase III (see lanes 2, 3 and 4 vs. lane 1), whereas no such effect was observed for the negative control, SAHH (lanes 5 and 6).

These results indicate that ToCV p22 blocks the *in vitro* RNase III cleavage activity by sequestering the dsRNA precursor.

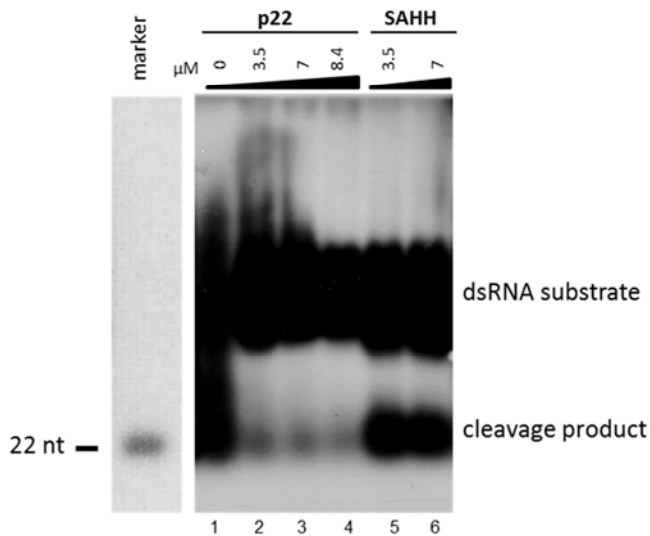


Fig. 3. *Tomato chlorosis virus* p22 protects long dsRNA from RNase III-mediated cleavage. A DIG-labeled 562 bp dsRNA was incubated with the p22 (lanes 2, 3 and 4) or S-adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH) (lanes 5 and 6) proteins before cleavage by RNase III. The concentrations of proteins are indicated above each lane. The cleavage reaction products were then separated on 1% TBE-agarose gels. As a marker lane, an unlabeled RNA oligonucleotide 22 nt in length was run in parallel, stained with ethidium bromide before the transfer and cut (left). DIG-labeled cleavage reaction products were transferred to nylon membranes and detected using an anti-digoxigenin antibody and a chemiluminescent substrate. Positions of dsRNA precursor and cleavage product are indicated.

dsRNA binding and suppressor activity of the p22 Δ 2Cys mutant

To determine whether a putative zinc-finger domain found in the N-terminal part of the p22 protein (Supplementary Figure 1) was involved in binding to long dsRNA *in vitro* and suppressor activity *in vivo*, a deletion mutant (p22 Δ 2Cys) in this domain was created. A similar putative zinc-finger domain, in addition to some similar basic amino acid residues, has been shown to be involved in the RNA binding of the p23 protein suppressor of another member of the family *Closteroviridae*, *Citrus tristeza virus* (CTV) (López *et al.*, 2000). The mutant p22 Δ 2Cys, harboring a four-amino-acid deletion (Figure 4A), was fused to a hexa-His tag, expressed and purified as previously described. EMSAs were performed with increasing amounts of the deletion mutant protein and DIG-labeled dsRNAs of 562 bp and 100 bp, with wild-type p22 as control. The p22 Δ 2Cys mutant very efficiently bound both sizes of dsRNA (Figure 4B), with an even higher affinity for the 100 bp dsRNA than wild-type p22 (Figure 4B, right panel). No retardation was observed with the negative control SAHH.

To further examine the relationship between the dsRNA binding activity *in vitro* and suppressor activity *in vivo*, we analyzed the p22 Δ 2Cys mutant for its ability to

suppress silencing using an agroinfiltration assay (Voinnet *et al.*, 1998; Johansen and Carrington 2001). Thus, *N. benthamiana* leaves were co-infiltrated with a mixture of *Agrobacterium tumefaciens* cultures, one expressing 35S-GFP and a second expressing the deletion construct (p22 Δ 2Cys), also under the control of the 35S promoter, using the co-infiltration of 35S-GFP with the empty pBIN19 vector or with the wild-type suppressor p22 as negative and positive controls, respectively. At 5 days postinfiltration (dpi), tissues infiltrated with 35S-GFP plus empty vector exhibited a low level of green fluorescence under UV light (Figure 4C, upper panels) as a consequence of RNA silencing of the GFP reporter mRNA (Brigneti *et al.*, 1998; Voinnet *et al.*, 2000). Consistently with this reduced fluorescence, northern blot analysis revealed that the steady-state levels of GFP mRNA were very low (Figure 4C, lower panels). Co-infiltration with the deletion construct p22 Δ 2Cys resulted in the suppression of GFP silencing by 5 dpi. The strong green fluorescence observed correlated with high steady-state levels of GFP mRNA (Figure 4C). However, in contrast to co-infiltration with the wild-type p22, in which strong suppressor activity was observed at 7, 10 and 14 dpi (Figure 4C, lower panel), the suppressor activity of the deletion construct p22 Δ 2Cys was lost at 7 dpi. Because no p22 antibody is available, to check whether the transient expression of the deleted construct under the control of the 35S promoter was efficient, mRNA transcript levels were analyzed in agroinfiltrated patches at 4 dpi when the suppressor activity was still evident. Using a p22-specific probe, the northern blot analysis showed that in contrast to infiltration with the wild-type p22, in which mRNA transcript levels were high, the transcript levels upon agroinfiltration with the deletion construct p22 Δ 2Cys were lower than expected (Supplementary Figure 2). Although we do not have an explanation for this result, it is clear that even with lower levels of expression, the p22 Δ 2Cys mutant construct exhibits suppressor activity (Figure 4C).

Taken together, these results indicate that the putative zinc finger located at the N-terminal part of p22 is dispensable for both binding of long dsRNA *in vitro* and suppression activity *in vivo*.

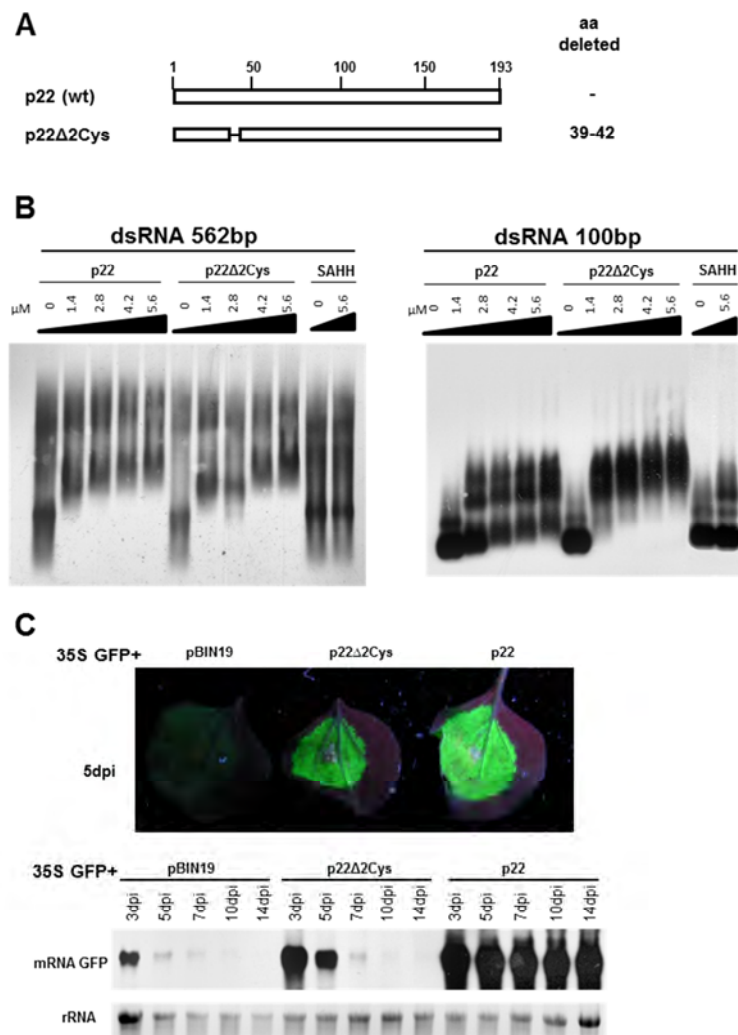


Fig. 4. Analysis of RNA-binding properties and silencing suppression activity of *Tomato chlorosis virus* - p22 deletion mutant. (A) Schematic representation of the wild-type p22 protein and the deletion mutant. The deleted amino acid (aa) residues are indicated. (B) RNA-binding properties of the p22Δ2Cys mutant detected by an EMSA assay. The increased concentration of protein is indicated above each lane. Wild-type p22 was used as a positive control, and S-adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH) was used as a negative control. The EMSA gels were transferred to a nylon membrane, and dsRNAs were detected using an anti-digoxigenin antibody and a chemiluminescent substrate. (C) Silencing suppression assays with a 35S construct expressing the p22Δ2Cys mutant. Upper panels show photographs taken under UV light of *Nicotiana benthamiana* leaves at 5 days postinfiltration (dpi) with *Agrobacterium tumefaciens* harboring 35S GFP in combination with the empty vector pBIN19 or with a 35S construct expressing p22Δ2Cys or with p22. The lower panels show a northern blot analysis of GFP mRNA extracted from the zones infiltrated at 3, 5, 7, 10 and 14 dpi, hybridized with a probe specific to GFP mRNA. Ethidium bromide staining of rRNA was used as a loading control.

ToCV p22 differs from the sRNA binding suppressor p19 in hairpin-induced silencing assays at prolonged times post-infiltration

To assess a possible link between the *in vitro* long dsRNA binding capability of the p22 protein and its ability to inhibit RNA silencing *in planta*, we performed hairpin-transcript-induced silencing assays at longer periods of time than are routinely used in

local transient assays. Thus, we compared the behavior of ToCV p22 with the behavior of the *Tomato bushy stunt virus* (TBSV, genus *Tombusvirus*, family *Tombusviridae*) p19 suppressor, which is known to act after sRNA generation (Vargason *et al.*, 2003). The time for the analysis, 12 dpi, was chosen because at this time the suppressor activity of TBSV p19 in patches infiltrated with a mixture of *Agrobacterium* sp. expressing sense and an inverted repeat GFP construct was overcome (at 14 dpi, the infiltrated patches became deep red), and the accumulation level of GFP sRNAs was high (Takeda *et al.*, 2002). In contrast, in co-infiltrations of p22 with the same mixture, even at 30 dpi, strong fluorescence was still observed and linked to a drastic reduction of GFP sRNAs (Cañizares *et al.*, 2008). The hairpin-induced silencing assays were conducted by triggering the silencing of *N. benthamiana* SAHH through agroinfiltration with an inverted repeat SAHH construct (dsSAHH), as previously described (Cañizares *et al.*, 2013). Agroinfiltrated patches were analyzed at 12 dpi, when high levels of sRNAs are expected to effectively silence the targeted SAHH mRNAs. Thus, no accumulation of SAHH mRNAs was observed, as shown in Figure 5 (left panels), in which the downregulation of SAHH was determined by semiquantitative RT-PCR. An equivalent result was obtained when co-infiltration with p19 was performed (Figure 5, central panels). In contrast, co-infiltration of the dsSAHH construct with p22 showed no reduced levels of accumulation of SAHH mRNA at this time (Figure 5, right panels). As stated previously, because the p19 suppressor is unable to prevent sRNA accumulation in hairpin-induced silencing (Takeda *et al.*, 2002), we could speculate that the presence of these sRNAs effectively silenced SAHH by 12 dpi. The lack of silencing of SAHH obtained in co-infiltrations with p22 indicated that this suppressor inhibits hairpin-induced silencing differently. Based on these results, we hypothesize that p22 acts at an early step of the silencing process, most likely by binding hairpin transcripts, which are the long dsRNA precursors of sRNAs.

Therefore, taken together, our results suggested a link between the p22 ability to bind long dsRNA and its ability to suppress gene silencing *in vivo* by interfering with sRNA generation.

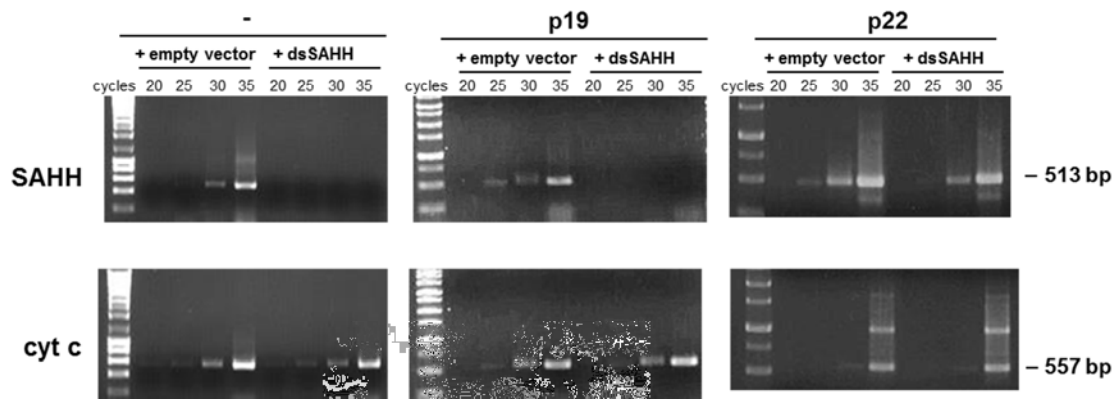


Fig. 5. Semi-quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of *Nicotiana benthamiana* *S-adenosylhomocysteine hydrolase* (NbSAHH) transcripts. RNAs extracted at 12 days postinfiltration from patches with 35S constructs expressing dsSAHH or the empty vector control, alone or in combination with constructs expressing *Tomato bushy stunt virus* P19 protein (p19) or *Tomato chlorosis virus* p22 protein (p22), were analyzed using appropriate primers. Aliquots were removed at the indicated cycles. RT-PCR of cytochrome c oxidase (cyt c) transcript was used as an internal control. Sizes of the expected RT-PCR products are indicated to the right.

DISCUSSION

The expression of the complex closterovirus genomes resembling that of coronavirus (family *Coronaviridae*) produces high amounts of viral RNA species in the infected cell. In this set of RNAs, highly structured RNAs or dsRNAs as replicative intermediates would induce an RNA silencing response that must be efficiently counteracted by viral suppressors. In this work, the mechanism of action of the described ToCV p22 suppressor, known to suppress RNA silencing induced by both sense and double-stranded RNAs (dsRNAs) (Cañizares *et al.*, 2008), has been studied further. The *in vitro* binding studies shown here indicate that p22 very efficiently binds ssRNA of both 562 and 100 nt but does not bind ssDNA or dsDNA. Moreover, p22 also possesses dsRNA binding activity, showing a high affinity for the longest dsRNA tested. The gradually decreased mobility of the shifted band observed in either ssRNA or long dsRNA binding assays might indicate that multiple units of p22 can bind to the RNA, thus retarding the complex, as the amount of RNA in all binding reactions is constant. We can speculate that both an increased number of p22 binding sites in the longest dsRNA or both ssRNAs, and a co-operative interaction might support the results obtained. Unfortunately, the lack of discrete intermediates makes it difficult to measure binding constants, thus precluding an accurate determination of cooperation.

In contrast to the described high affinity for long RNAs, no significant binding to sRNAs was observed for p22 in our conditions, either to synthetic 21 bp ds-sRNA labeled with DIG at the 3'-end or to sRNAs having a 2-nt overhang with a free OH at the 3'-end. Although we cannot rule out the binding of p22 to sRNAs, our results support the hypothesis that binding to long dsRNAs is more relevant for the p22 suppressor activity, as the co-infiltrations of p22 are always linked to reduced accumulation of sRNAs (Cañizares *et al.*, 2008), indicating that p22 interferes with their generation. Moreover, we demonstrated that the binding of p22 to long dsRNA molecules prevented their cleavage into sRNAs by RNase III Dicer homologue, thus blocking subsequent steps of the RNA silencing process. Interestingly, although the strategy of suppressing gene silencing via binding to long dsRNA preventing Dicer cleavage has been described frequently for viruses infecting insects and mammals (Chao *et al.*, 2005; Lingel *et al.*, 2005; Fenner *et al.*, 2006; van Rij *et al.*, 2006; Kimberlin *et al.*, 2010; Qi *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2015), it has only rarely been associated with plant viruses. In fact, it has only been reported for the protein NSs of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (family *Bunyaviridae*) (Schnettler *et al.*, 2010), and for the proteins CP and p14 of *Turnip crinkle virus* (TCV) and *Pothos latent virus* (PoLV), respectively (Méraï *et al.*, 2005, 2006), and both members of the family *Tombusviridae*, although *in vitro* cleavage assays were not performed in the latter two cases. Therefore, as proposed for the coronavirus N protein suppressor (Cui *et al.*, 2015), we could speculate that the ability to bind either ssRNA or dsRNA shown by ToCV p22 could protect viral RNA in two ways: i) binding viral ssRNAs to prevent unnecessary intramolecular and intermolecular dsRNA formation between the positive- and negative-sense genomic or subgenomic RNAs; and ii) binding virus-derived dsRNAs to protect them from Dicer cleavage.

By analyzing the p22 amino acid sequence, we found a putative zinc finger domain in the N-terminal part of the molecule as described for the CTV p23 suppressor (López *et al.*, 2000). Interestingly, although CTV p23 has no homologues in other closteroviruses (Lu *et al.*, 2004), it contains a zinc-finger motif that is almost identical to the one present in ToCV p22. Thus, in CTV p23, the zinc finger-like motif has a CX₂CX₃HX₉C signature, and in ToCVp22, the signature is CX₂CX₃CX₉C. The zinc finger domain of p23, in addition to some basic amino acid residues, has been shown to be involved in RNA binding (Lopez *et al.*, 2000) and to be important for controlling asymmetrical RNA synthesis (Satyanarayana *et al.*, 2002). In addition, a functional zinc

finger domain is required for the silencing suppression activity of some suppressors (Chiba *et al.*, 2013). With these precedents, in this study, we assessed a possible role of the putative zinc finger motif of p22 in dsRNA binding and suppression activity by creating the p22 Δ 2Cys mutant. Our results showed that, in contrast to CTV p23 (López *et al.*, 2000), in which modifications of this domain had deleterious effects on the interaction with the RNA, the putative zinc finger motif found in p22 seemed to be dispensable for dsRNA binding. However, we found that the silencing suppressor activity of the p22 Δ 2Cys mutant was shorter lasting than the activity of wild-type p22 and that the expression levels of the p22 Δ 2Cys construct were lower than those for p22. Thus, a link could exist between the reduced transcript levels of this construct and the silencing suppressor activity observed. Alternatively, it can be argued that the *in vivo* suppression function of p22 has additional requirements for RNA binding.

The importance of the *in planta* p22 suppression of silencing by binding long dsRNAs is supported by the results obtained in the suppression of silencing induced by hairpin transcripts. The hairpin-induced RNA silencing pathway requires *de novo* processing by Dicer to produce sRNAs. Thus, the p19 silencing suppressor failed to prevent the generation of sRNAs from hairpin transcripts at long times post-infiltration (Takeda *et al.*, 2002), and therefore, it failed to prevent silencing of the SAHH mRNA target. In contrast, the effective suppression observed for p22 in equivalent assays supported the importance of the ability of ToCV p22 to bind long dsRNA and thereby block Dicer cleavage to reduce sRNA accumulation, thus preventing silencing. In fact, the presence of p22 in GFP co-infiltrated patches can support the maintenance of a reduced level of GFP sRNAs for a long period of time (25–30 days) (Cañizares *et al.*, 2008).

Although the use of *in vitro* binding assays or transient heterologous expression systems to infer the mechanism of action of certain viral suppressors has recently been questioned (Incarbone and Dunoyer, 2013), we think that the use of such indirect methodologies might help to shed light on plant-virus interactions. One of the arguments against the use of these methodologies is that the viral suppressors of RNA silencing are often multifunctional proteins that perform other essential roles in the virus life cycle that require association with viral nucleic acids, thus concluding that the binding observed *in vitro* could not be a feature of silencing suppression. In the case of p22, however, this argument might not apply, as p22 seems to be a dedicated suppressor protein in the ToCV genome (Cañizares *et al.*, 2008). The property of binding dsRNA

previously described for certain viral suppressors, such as TCV CP, has been questioned since the discovery of a new strategy based on the use of glycine/tryptophan (GW) mimicry to compete for and inhibit host AGOs (Azevedo *et al.*, 2010). Recent studies, however, showed that these GW motifs are also important for binding dsRNA and, in the case of the *Pelargonium line pattern virus* (family *Tombusviridae*) p37 suppressor, an essential requirement to suppress RNA silencing (Pérez-Cañamás and Hernández, 2015). These results suggest that the RNA binding capability of suppressors containing GW motifs could have been overlooked. Thus, the property of binding dsRNA exhibited by some viral proteins that act as suppressors might not be an artifact but rather important to their function as suppressors.

In summary, we believe that the characterization of the mode of action of p22 reported in this work is another important contribution to unraveling the complex interplay occurring during plant-virus interactions. We report a mechanism of action for p22 that does not seem common for plant viruses, which could explain its long-lasting suppressor activity. The high affinity for long dsRNAs affecting the Dicer-like cleavage might block the silencing process at early steps by hindering the generation of sRNAs. The possibility that the described mechanism of action of the p22 suppressor could occur during viral infections might be supported by the results obtained using a ToCV mutant deficient in p22 (our unpublished results), which showed that systemic viral infection is impeded in wild-type *N. benthamiana* plants but not in *rdr6 N. benthamiana* plants impaired in the synthesis of dsRNA precursors of secondary sRNAs. Thus, the blockage of dsRNA cleavage through binding might be an effective way to suppress the silencing used by ToCV and sustain effective infection of host plants.

ACKNOWLEDGMENTS

Y. L.-R. was the recipient of an AECID (Spain) fellowship. M.C.C. was the recipient of an I3P contract from the CSIC (Spain) co-financed by FSE. This work was supported by grants AGL2010-22287-C02-01/AGR and AGL2013-48913-C2-1-R from the Ministerio de Economía y Competitividad, Spain, co-financed by FEDER-FSE. J.N.C. and E.M.A. are members of the Research Group AGR-214, partially funded by the Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía, Spain. We thank F. Aparicio for providing the pET vectors and helpful discussions, and we thank

M.V. Martín and R. Tovar for their technical assistance. We thank American Journal Experts (AJE) for English language editing.

REFERENCES

- Azevedo, J., Garcia, D., Pontier, D., Ohneshorge, S., Yu, A., Garcia, S., Braun, L., Bergdoll, M., Hakimi, M.A., Lagrange, T., Voinnet, O., 2010. Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes & Development* 24, 904-915.
- Baulcombe, D.C., 2005. RNA silencing. *Trends in Biochemical Science* 30, 290-293.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L.H., Ding, S.W., Baulcombe, D.C., 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO Journal* 17, 6739-6746.
- Burgyán, J., Havelda, Z., 2011. Viral suppressors of RNA silencing. *Trends in Plant Science* 16, 265-272.
- Cañizares, M.C., Lozano-Durán, R., Canto, T., Bejarano, E.R., Bisaro, D.M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., 2013. Effects of the crinivirus coat protein-interacting plant protein SAHH on post-transcriptional RNA silencing and its suppression. *Molecular Plant Microbe Interactions* 26, 1004-1015.
- Cañizares, M.C., Navas-Castillo, J., Moriones, E., 2008. Multiple suppressors of RNA silencing encoded by both genomic RNAs of the crinivirus, *Tomato chlorosis virus*. *Virology* 379, 168-174.
- Cañizares, M.C., Taylor, K.M., Lomonosoff, G.P., 2004. Surface exposed C-terminal amino acids of the small coat protein of *Cowpea mosaic virus* are required for suppression of silencing. *Journal of General Virology* 85, 3431-3435.
- Chao, J.A., Lee, J.H., Chapados, B.R., Debler, E.W., Schneemann, A., Williamson, J.R., 2005. Dual modes of RNA-silencing suppression by *Flock House virus* protein B2. *Nature Structural & Molecular Biology* 12, 952-957.
- Chiba, S., Hleibieh, K., Delbianco, A., Klein, E., Ratti, C., Ziegler-Graff, V., Bouzoubaa, S., Gilmer, D., 2013. The benyvirus RNA silencing suppressor is essential for long distance movement, requires both zinc-finger and NoLS basic residues but not a nucleolar localization for its silencing suppression activity. *Molecular Plant Microbe Interactions* 26, 168-181.
- Cui, L., Wang, H., Ji, Y., Yang, J., Xu, S., Huang, X., Wang, Z., Qin, L., Tien, P., Zhou, X., Guo, D., Chen, Y., 2015. The nucleocapsid protein of coronaviruses acts as a

- viral suppressor of RNA silencing in mammalian cells. *Journal of Virology* 89, 9029-9043.
- Dolja, V.V., Kreuze, J.F., Valkonen, J.P.T., 2006. Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Research* 117, 38-51.
- Fenner, B.J., Gob, W., Kwang, J., 2006. Sequestration and protection of double-stranded RNA by the betanodavirus B2 protein. *Journal of Virology* 80, 6822-6833.
- Fenner, B.J., Gob, W., Kwang, J., 2007. Dissection of double-stranded RNA binding protein B2 from betanodavirus. *Journal of Virology* 81, 5449-5459.
- Hamilton, A.J., Baulcombe, D.C., 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952.
- Hilf, M.E., Karasev, A.V., Pappu, H.R., Gumpf, D.J., Niblett, C.L., Garnsey, S.M., 1995. Characterization of *Citrus tristeza virus* subgenomic RNAs in infected tissue. *Virology* 208, 576-582.
- Incarbone, M., Dunoyer, P., 2013. RNA silencing and its suppression: novel insights from *in planta* analysis. *Trends in Plant Science* 18, 382-392.
- Ji, X., 2008. The mechanism of RNase III action: how dicer dices. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 320, 99-116.
- Johansen, L.K., Carrington, J.C., 2001. Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Physiology* 126, 930-938.
- Kadowaki, K., Ozawa, K., Kazama, S., Kubo, N., Akihama, T., 1995. Creation of an initiation codon by RNA editing in the *coxI* transcript from tomato mitochondria. *Current Genetics* 28, 415-422.
- Karasev, A.V., Hilf, M.E., Garnsey, S.M., Dawson, W.O., 1997. Transcriptional strategy of closteroviruses: mapping the 5' termini of the *Citrus tristeza virus* subgenomic RNAs. *Journal of Virology* 71, 6233-6236.
- Kimberlin, C.R., Bornholdt, Z.A., Li, S., Woods, V.L., MacRae, I.J., Saphire, E.O., 2010. *Ebolavirus* VP35 uses a bimodal strategy to bind dsRNA for innate immune suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 314-319.
- Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E., Carrington, J.C., Liu, Y.P., Dolja, V.V., Calvino, L.F., López-Moya, J.J., Burguán, J., 2006. Small RNA binding is

- a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO Journal* 25, 2768-2780.
- Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D., Burgyán, J., 2004. Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *EMBO Journal* 23, 876-884.
- Lingel, A., Simon, B., Izaurralde E., Sattler, M., 2005. The structure of the *Flock house virus* B2 protein, a viral suppressor of RNA interference, shows a novel mode of double-stranded RNA recognition. *EMBO Reports* 6, 1149-1155.
- López, C., Navas-Castillo, J., Gowda, S., Moreno, P., Flores, R., 2000. The 23-kDa protein coded by the 3'-terminal gene of *Citrus tristeza virus* is an RNA-binding protein. *Virology* 269, 462-470.
- Lu, R., Folimonov, A., Shintaku, M., Li, W.X., Falk, B.W., Dawson, W.O., Ding, S.W., 2004. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 15742-15747.
- Mérai, Z., Kerényi, Z., Molnár, A., Barta, E., Válczi, A., Bisztray, G., Havelda, Z., Burgyán, J., Silhavy, D., 2005. Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity. *Journal of Virology* 79, 7217-7226.
- Mérai, Z., Kerényi, Z., Kertész, S., Magna, M., Lakatos, L., Silhavy, D., 2006. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *Journal of Virology* 80, 5747-5756.
- Molnár, A., Csorba, T., Lakatos, L., Várallyay, E., Lacomme, C., Burgyán, J., 2005. Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *Journal of Virology* 79, 7812-7818.
- Noris, E., Accotto, G.P., Tavazza, R., Brunetti, A., Crespi, S., Tavazza, M., 1996. Resistance to tomato yellow leaf curl geminivirus in *Nicotiana benthamiana* plants transformed with a truncated viral C1 gene. *Virology* 224, 130-138.
- Pérez-Cañamás, M., Hernández, C., 2015. Key importance of small RNA binding for the activity of a glycine-tryptophan (GW) motif-containing viral suppressor of RNA silencing. *Journal of Biological Chemistry* 290, 3106-3120.
- Qi, N., Cai, D., Qiu, Y., Xie, J., Wang, Z., Si, J., Zhang, J., Zhou, X., Hu, Y., 2011. RNA binding by a novel helical fold of B2 protein from Wuhan Nodavirus

- mediates the suppression of RNA interference and promotes B2 dimerization. *Journal of Virology* 85, 9543-9554.
- Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllón, M.A., Albiach-Martí, M.R., Rabindran, S., Dawson, W.O., 2002. The p23 protein of *Citrus tristeza virus* controls asymmetrical RNA accumulation. *Journal of Virology* 76, 473-483.
- Schnettler, E., Hemmes, H., Huismann, R., Goldbach, R., Prins, M., Kormelink R., 2010. Diverging affinity of tospovirus RNA silencing suppressor proteins, NS_s, for various RNA duplex molecules. *Journal of Virology* 84, 11542-11554.
- Szittyá, G., Molnár, A., Silhavy, D., Hornyik, C., Burgyán, J., 2002. Short defective interfering RNAs of tombusviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus. *Plant Cell* 14, 359-372.
- Takeda, A., Sugiyama, K., Nagano, H., Mori, M., Kaido, M., Mise, K., Tsuda, S., Okuno, T., 2002. Identification of a novel RNA silencing suppressor, NS_s, protein of *Tomato spotted wilt virus*. *FEBS Letters* 532, 75-79.
- van Rij, R.P., Saleh M.C., Berry, B., Foo, C., Houk, A., Antoniewski, C., Andino, R., 2006. The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes & Development* 20, 2985-2995.
- Vargason, J.M., Szittyá, G., Burgyán, J., Tanaka Hall, T.M., 2003. Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* 115, 799-811.
- Voinnet, O., Vain, P., Angell, S., Baulcombe, D.C., 1998. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* 95, 177-187.
- Voinnet, O., Lederer, C., Baulcombe D.C., 2000. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103, 157-167.
- Voinnet, O., 2005. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nature Reviews Genetics* 6, 206-220.
- Wisler, G.C., Li, R.H., Liu, H-Y, Lowry, D.S., Duffus, J.E., 1998. Tomato chlorosis virus: a new whitefly-transmitted, phloem-limited bipartite closterovirus of tomato. *Phytopathology* 88, 402-409.

Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., Filipowicz, W., 2004. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 118, 57-68.

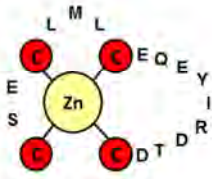
SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Table 1. Sequences of primers used in this work.

Gene	Primer	Primer sequence (5' - 3')	Primer position
ToCV p22	MA 1287 (FW)	ACCGA <u>AATTC</u> ATGGATCTCACTGGTTGTTTGC	7662
	MA 1288 (RV)	TAAC <u>TCGAG</u> TTATATATCACTCCCAAAGAAAAAC	8243
	MA 1616 (FW)	GATCTTAATTGATCTTGATGAGCTGATGCTTTGTGAGCAG	7753
	MA 1617 (RV)	CTGCTCACAAAGCATCAGCTCATCAAGATCAATTAAGATC	7805
GFP	MA 1366 (FW)	<i>TAATACGACTCACTATAGGGACTGGAGTTGTCCAATTCTTGTTG</i>	25
	MA1366b (FW)	ACTGGAGTTGTCCAATTCTTGTTG	25
	MA 1336 (FW)	<i>TAATACGACTCACTATAGGGGTTAACTTCAAATTAGACACAACATG</i>	487
	MA 1337 (RV)	<i>TAATACGACTCACTATAGGGGTTAAAGGACAGGGCCATCGCC</i>	565
SAHH	MA 1337b (RV)	GTAAGGACAGGGCCATCGCC	565
	MA 748 (FW)	AACTTTGCAGGAGTACTGGTGG	336
SAHH	MA 749 (RV)	TGTTTCAAGGCAGCAGCACATC	848
	cyt c oxidase	MA 720 (FW)	TATCTAGGCATGGTTTATGCC
MA 721 (RV)		CTGCTAAGGGCATTCCATCC	1632

Table S1: The underlined sequences are restriction endonucleases sites introduced into primers for cloning (*Eco* RI in MA 1287 and *Xho* I in MA 1288). The italic sequences indicate the T7 RNA polymerase promoter sequence. Primer positions indicate the positions in: RNA1-ToCV genome of AT 80/99 isolate with GenBank access number DQ983480, GFP sequence with GenBank access number M62653, *Nicotiana benthamiana* S-adenosyl homocysteine hydrolase gene with GenBank access number JQ890096 and *Solanum lycopersicum* cytochrome C oxidase gene with GenBank access number X54738. FW and RV indicate forward and reverse primers sense.

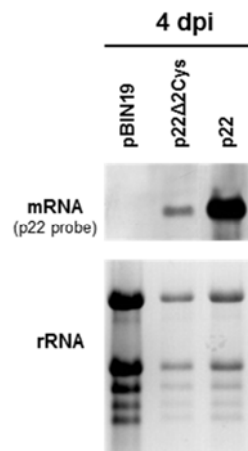
Supplementary Fig. 1 Structure of the proposed zinc-finger domain and location in the p22 amino acid sequence (red box). With asterisks are marked the removed amino acid residues by site-directed mutagenesis to produce p22 Δ 2Cys mutant.



```

MDLTGCLRKL RQC DRLLERLGNDVSEVHLRAILIDLDE
* * * *
CSECLMLCEQEYIRDTC LMSFLLVLKHYEIKFHMDML
NMIYDFK LKTSQLIQDVFRIVVYLELCEIDPLLAM
TEACQDILEGGILNIGFVSSALGHEPNILITILSMVDFIV
VIDDRPLVFIPLKMRVFGDKLGSGYFRWFDKFFFGSDI
    
```

Supplementary Fig. 2 Northern blot analysis of RNAs extracted from the zones infiltrated at 4 dpi, hybridized with a probe specific to p22 mRNA. Leaves were infiltrated with *Agrobacterium tumefaciens* harboring 35S GFP plus the constructs indicated above each lane. Ethidium bromide staining of rRNA was used as a loading control.



CAPÍTULO III





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

The p22 RNA silencing suppressor of the crinivirus *Tomato chlorosis virus* is dispensable for local viral replication but important for counteracting an antiviral RDR6-mediated response during systemic infection

Yazmín Landeo-Ríos, Jesús Navas-Castillo, Enrique Moriones, M. Carmen Cañizares

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”- Universidad de Málaga - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Estación Experimental “La Mayora”, 29750 Algarrobo-Costa, Málaga, Spain.

Submitted

ABSTRACT

Among the components of the RNA silencing pathway in plants, RNA-dependent RNA polymerases (RDRs) play fundamental roles in antiviral defence. Here, we demonstrate that the *Nicotiana benthamiana* RDR6 is involved in defence against the bipartite crinivirus (genus *Crinivirus*, family *Closteroviridae*) *Tomato chlorosis virus* (ToCV). Additionally, by producing a p22-deficient ToCV infectious mutant clone (ToCV Δ p22), we studied the role of this silencing suppressor in viral infection in both wild-type and RDR6-silenced *N. benthamiana* (NbRDR6i) plants. We demonstrate that p22 is dispensable for the replication of ToCV, where RDR6 appears not to have any effect. Furthermore, the finding that ToCV Δ p22 systemic accumulation was impaired in wild-type *N. benthamiana* but not in NbRDR6i plants suggests a role for p22 in counteracting an RDR6-mediated antiviral response of the plant during systemic infection.

In plants, RNA silencing is a conserved sequence-specific RNA-mediated mechanism of gene regulation that also serves as an antiviral defence (Baulcombe, 2004). This mechanism is triggered by double-stranded RNA (dsRNA), which in single-stranded RNA (ssRNA) viruses can derive from highly structured ssRNAs or be generated during their replication (Llave, 2010). These dsRNAs are processed by RNase III-type Dicer-like (DCL) enzymes into small RNAs (sRNAs) (Hamilton and Baulcombe, 1999) that are incorporated into the RNA-induced silencing complex, leading to sequence-specific degradation of target RNAs. This process is amplified by host-encoded RNA-dependent RNA polymerases (RDR) that convert single-stranded RNA into dsRNA, which is subsequently processed by DCL into secondary sRNAs. Among the plant RDRs implicated in virus defence, RDR6 plays a relevant role (Jiang *et al.*, 2012; Qu *et al.*, 2005; Schwach *et al.*, 2005). RDR6 is involved in short-, long-range cell-to-cell and long-distance signalling of RNA silencing (Qin *et al.*, 2012; Voinnet, 2008). The involvement of RDR6 in virus defence is supported by the fact that the downregulation of *RDR6* through RNA interference in *Nicotiana benthamiana* plants (RDR6i plants) can result in hypersusceptibility to some viruses (Qu *et al.*, 2005; Schwach *et al.*, 2005).

To counteract antiviral RNA silencing, most plant viruses express suppressor proteins that act at different steps in the silencing pathway to facilitate the infection process (Díaz-Pendón and Ding, 2008). Therefore, to achieve a successful plant invasion, viruses must replicate and move both cell-to-cell and systemically to distant parts of the plants, confronting the RNA silencing defence responses of the plant at each of these steps. The use of suppressor-deficient viruses is an interesting tool for studying the suppressor role during these steps of viral infection.

Tomato chlorosis virus (ToCV, genus *Crinivirus*) belongs to the family *Closteroviridae*, in which the largest RNA genomes among plant viruses have been reported (Dolja *et al.*, 2006). ToCV causes a yellow leaf disorder syndrome that primarily affects tomato (*Solanum lycopersicum*) and is transmitted in nature by the whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) *Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum* and *T. abutiloneus* (Wintermantel and Wisler, 2006). ToCV has a bipartite single stranded, positive-sense RNA genome with RNA1-encoding proteins involved in viral replication and RNA2-encoding proteins involved in encapsidation, movement, and host transmission (Lozano *et al.*, 2006, 2007; Wintermantel *et al.*, 2005; Wisler *et al.*, 1998). Although both RNAs are required for the effective infection of plants, RNA1 can

replicate independently, whereas RNA2 depends on RNA1 for its replication (Orlío *et al.*, 2014). Similar to other members of the family *Closteroviridae* (Kreuze *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2004), ToCV encodes multiple RNA silencing suppressors, the major coat protein (CP) and minor coat protein (CPm) in RNA2, and the p22 protein located at the 3'-proximal genomic region of RNA1 (Cañizares *et al.*, 2008). Isolated from the viral context, p22 has one of the longest lasting local suppression activities reported to date, suppressing local RNA silencing induced either by sense RNA or dsRNAs. Although the suppressors of silencing exhibit broad ranges of structural diversity and modes of action, in the family *Closteroviridae*, counterparts of genes encoding suppressors of RNA silencing are found at the 3'-end of the monopartite genomes in the genera *Closterovirus* and *Ampelovirus* and at the 3'-end of RNA1 in viruses of the mostly bipartite genus *Crinivirus* (Dolja *et al.*, 2006). It is worth mentioning that some of the viral silencing suppressors were shown to enhance viral infection before being identified as suppressors (Díaz-Pendón and Ding, 2008). Thus, by deletion analysis of the 3'-end genes of the closterovirus *Citrus tristeza virus* (CTV), it was found that the p23 suppressor of silencing controls the asymmetric accumulation of CTV RNAs by downregulating negative-stranded RNA accumulation and indirectly increases the expression of 3' genes (Satyanarayana *et al.*, 2002). The p21 suppressor encoded in the 3'-end of the genome of the closterovirus *Beet yellow virus* (BYV) (Reed *et al.*, 2003) was previously identified as an enhancer of RNA amplification (Peremyslov *et al.*, 1998). In the case of the crinivirus *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV), the 3'-end RNA1-encoded p34 protein, although it has not been described as a suppressor, enhances the trans-replication of RNA2 (Yeh *et al.*, 2000).

Understanding the underlying mechanisms in plant virus confrontations is a prerequisite for further control of viral diseases. In this work, we demonstrate that RDR6 plays an antiviral role in plant defence against ToCV. Additionally, by using a p22-deficient ToCV infectious mutant clone (ToCV Δ p22), we investigated the specific role of this protein in the viral infection process in both wild-type and RDR6-silenced *N. benthamiana* plants.

To analyse whether NbRDR6 plays a role in plant defence against ToCV, virus accumulation was studied in the *N. benthamiana* line RDR6i, in which NbRDR6 is constitutively silenced (Schwach *et al.*, 2005). For this purpose, whitefly-mediated inoculation assays were conducted within insect-proof cages using individuals of the *Bemisia tabaci* Mediterranean species (MED) (formerly biotype Q) from a healthy

population reared on melon (*Cucumis melo* cv. ANC 42, La Mayora-CSIC seed bank). Viruliferous whiteflies were obtained by allowing adult individuals a 48-h acquisition access period (AAP) on ToCV-infected tomato plants (cv. Moneymaker). After AAP, viruliferous whiteflies were transferred to healthy wild-type or RDR6i *N. benthamiana* plants (3 to 5 leaf stage) (fifty individuals per plant) for a 48-h inoculation access period using clip-on cages. Virus accumulation levels were estimated by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR). Total RNA was extracted as described previously (Noris *et al.*, 1996) from pools of young non-inoculated leaves from three infected plants per treatment analysed at 25 days post-inoculation. RNA was treated with Turbo DNase (Ambion, Austin, TX, USA) and quantified in a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA). Total RNA (300 ng) was reverse transcribed with specific primers using AMV RT (Promega, Madison, WI, USA). For qRT-PCR, cDNA was used in 20 μ l reactions with SYBR *Premix Ex Taq* (Perfect Real Time) (TaKaRa Biotech, Dalian, China) according to the manufacturer's instructions. Three technical replicates were performed per cDNA of each biological sample. Primers for the ToCV RNA2 viral sequence (MA1178 and MA1179) and for the CAC gene (MA1279 and MA1280) as a housekeeping internal standard (Wieczorek *et al.*, 2013) were designed to amplify fragments of similar size. The sequences of the primers used are listed in Supplementary Table S1. The relative quantification of viral RNA was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). The results revealed an approximately 4-fold increase in ToCV RNA accumulation in RDR6i compared with wild-type plants (Figure 1A). Although this increased susceptibility did not always correlate with an enhancement of the disease symptoms, an increase in the internervial chlorosis in older leaves, which is typical of ToCV infection, was exclusively observed in some RDR6i plants (exemplified in Figure 1B). Therefore, these results indicate that the reduced RDR6 expression in *N. benthamiana* plants resulted in increased ToCV susceptibility, suggesting that RDR6 plays a relevant role in antiviral defence.

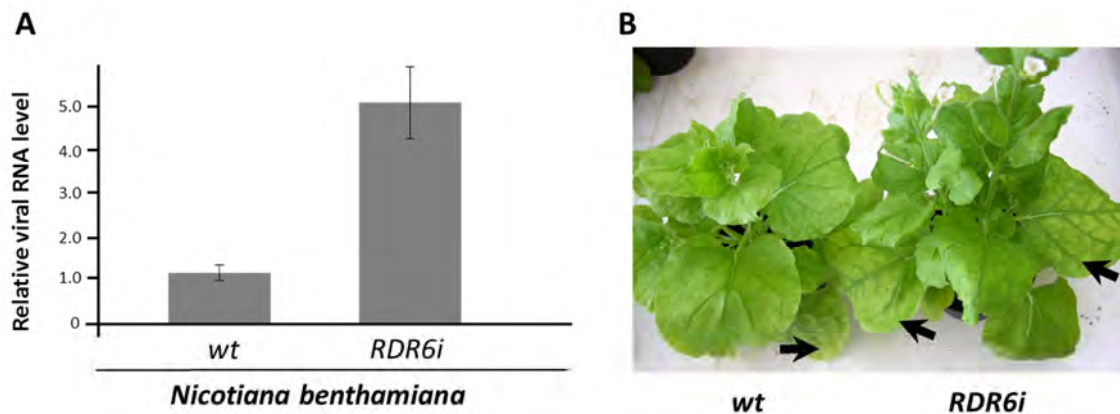


Fig. 1. Enhanced susceptibility to *Tomato chlorosis virus* (ToCV) transmitted using its natural vector *Bemisia tabaci* in *Nicotiana benthamiana* RDR6i plants at 25 days post-infiltration. (A) Quantitative real-time RT-PCR of ToCV RNA2 in infected *N. benthamiana* wild-type and RDR6i plants performed using pools of three plants each. Error bars represent standard deviation for three replicates. Values are relative to levels detected in wild-type plants, which were given an arbitrary value of 1. (B) Internervial chlorotic symptoms of ToCV in infected *N. benthamiana* wild-type and RDR6i plants. Leaves exhibiting enhanced internervial symptoms are indicated by arrows.

Considering that RDR6 is a component of the RNA silencing pathway in plants, we presumed that a viral RNA silencing suppressor could be involved in counteracting this antiviral response. We assessed the role of the silencing suppressor p22 of ToCV during the infection process by using a p22-deficient ToCV mutant clone created by deleting the complete p22 gene sequence. To obtain the construct ToCV-RNA1 Δ p22, we used the ToCV RNA1 infectious clone p35S-ToCV-RNA1 (Orlío *et al.*, 2014). The deletion mutant was generated by PCR-driven overlap extension (Hechman and Pease, 2007), amplifying two overlapping DNA fragments in separate PCRs. In the first PCR, a 763-bp DNA fragment containing the *Pst*I site of ToCV RNA1 at position 6911 was amplified using the primer pair MA1543/MA1544. In a second PCR, a 395-bp DNA fragment containing the *Pst*I site of ToCV RNA1 genome at position 8614 was amplified using the primer pair MA1545/MA1546. These initial PCRs resulted in overlapping segments containing part of the flanking sequences of the p22 genomic region, which were mixed and amplified in a third PCR with primers MA 1543 and MA 1546 to produce a 1132-bp chimeric fragment with a deleted p22. The ToCV RNA1 p22 deletion mutant was constructed by exchanging the unique *Pst*I restriction fragment of the p35S-ToCV-RNA1 infectious clone with the chimeric fragment amplified in the third PCR indicated above, which was also obtained by digestion with *Pst*I. The p22-deficient construct was then cloned into *E. coli* ElectroMAX Stbl4 cells and introduced

into *Agrobacterium tumefaciens* cells (strain GV3101). The nucleotide sequences of the primers used are provided in Supplementary Table S1.

To ensure that both the wild-type and the p22-deficient mutant constructs were efficiently and equally transcribed *in vivo* from the 35S promoter, a preliminary agroinfiltration analysis was performed in *N. benthamiana* plants after short periods post-infiltration (3 and 5 days post-infiltration (dpi)). Thus, plants (3-5 leaf stage) were agroinfiltrated with *A. tumefaciens* GV3101 carrying ToCV-RNA1 or ToCV-RNA1 Δ p22 clones, as previously described (Orlío *et al.*, 2014). For Northern blot analysis, total RNA was extracted from agroinfiltrated patches as described above, and viral RNA was detected using digoxigenin (DIG)-labelled positive and negative sense-specific ssRNA probes for the RNA1 3'-end as described previously (Orlío *et al.*, 2014). The analysis of positive strands at 3 dpi exhibited similar accumulation levels of transcripts from both the ToCV-RNA1 and ToCV-RNA1 Δ p22 constructs (Figure 2A). Therefore, the clear differences in the RNA accumulation levels of the positive strands observed at 5 dpi for the two constructs indicated differences in local replication (Figure 2A). A time-course analysis of the local replication levels of wild-type ToCV and ToCV Δ p22 was subsequently conducted at 5 and 7 dpi. We compared the viral accumulation levels in patches agroinfiltrated with infectious clones of ToCV-RNA1 or ToCV-RNA1 Δ p22 in combination with the infectious clone of ToCV-RNA2 in both wild-type and RDR6i *N. benthamiana* plants. In the agroinfiltrated leaves of wild-type plants, increased accumulation of both positive and negative viral RNA strands of ToCV-RNA1 Δ p22 were observed compared with ToCV-RNA1 (Figure 2B). In this case, we hypothesized that the loss of certain secondary structure elements in the deletion construct could facilitate the replication process. In fact, by using the RNA folding prediction program mfold (Zuker, 2003) we found that the presence of the p22 sequence leads to an increase in the number of potential stem loop structures (Supplementary Fig. 1). Interestingly, the absence of p22 resulted in an increased accumulation of negative strand molecules at both 5 and 7 dpi (Figure 2B). To assess whether p22 plays a role in the trans-accumulation of ToCV-RNA2, the patches were analysed by Northern blot analysis using a DIG-labelled specific RNA probe for the coat protein (CP) gene (Orlío *et al.*, 2014). In this case, a faint band corresponding to the genomic RNA2 was observed in all cases (Figure 2B). Although the viral accumulation levels of ToCV-RNA1 Δ p22 were consistently increased compared with ToCV-RNA1, no increased accumulation of RNA2 was observed in these cases. Similar

results were obtained for agroinfiltrated leaves of NbrDR6i plants (Figure 2B), which indicated that it is unlikely that NbrDR6 influences local ToCV replication as described for PVX (Schwach *et al.*, 2005). These results were independently reproduced twice. Overall, the previous results indicated that p22 is not required for the local replication of ToCV-RNA1 and/or trans-accumulation of ToCV-RNA2.

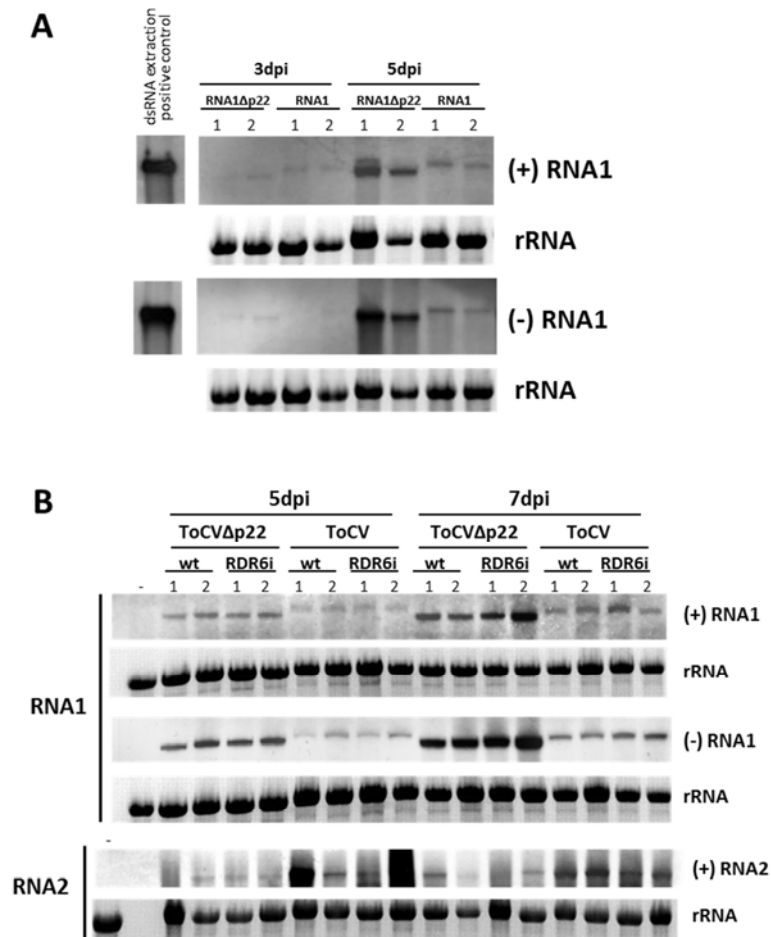


Fig. 2. Northern blot analysis using digoxigenin (DIG)-labelled RNA probes to detect the positive (+) or negative (-) sense RNA forms during local infection with wild-type or p22 mutant *Tomato chlorosis virus* (ToCV) (ToCV and ToCV Δp22, respectively). (A) Local RNA1 replication and accumulation of (+) and (-) sense strands [(+) RNA1 and (-) RNA1] at 3 and 5 dpi in patches of wild-type *Nicotiana benthamiana* agroinfiltrated with RNA1 infectious clones of ToCV or ToCVΔp22. As a positive control, a dsRNA extraction from a ToCV infected plant was used. (B) Local replication and accumulation of (+) and (-) sense strands [(+) RNA1 and (-) RNA1] of RNA1, and accumulation of (+) strand [(+) RNA2] of RNA2 at 5 and 7 dpi in patches of wild-type and RDR6i *N. benthamiana* plants agroinfiltrated with infectious clones of RNA1 of ToCV or ToCVΔp22 and RNA 2 of ToCV. Samples from two independent plants (1, 2) were analysed. Ethidium bromide-stained rRNA was used as loading control.

After elucidating the role of p22 in local replication, we studied its role during systemic ToCV infection of plants. For this purpose, we conducted two independent experiments in which wild-type and RDR6i plants were co-infiltrated with a mixture of

A. tumefaciens containing ToCV-RNA1 or ToCV-RNA1 Δ p22 and ToCV-RNA2 (15 wild-type and 15 RDR6i plants per combination and experiment). The systemic infection of plants was analysed at 30 dpi by tissue blot hybridization of petiole sections of apical non-infiltrated leaves (Figure 3A), using a probe specific for the CP gene (Orílio et al., 2014). The effects of viruses and genotypes were analysed by applying generalized linear models (GzLM) (IBM SPSS Statistics v. 22 software) in which pairwise comparisons were performed using the sequential Bonferroni method for error correction. Data sets were expressed as the numbers of infected and non-infected plants and analysed by GzLM using Logit as the link function and Binomial as the underlying distribution. Thus, it was observed that less efficient ($p=0.025$) ToCV systemic infection occurred in the absence of p22 in wild-type *N. benthamiana* plants (compare ToCV and ToCV Δ p22 in Figure 3A and 3B). Therefore, these results indicated that the presence of p22 is important to support the efficient systemic infection of wild-type *N. benthamiana* plants. In contrast, in RDR6i plants, both ToCV and ToCV Δ p22 exhibited similar ($p=0.89$) systemic infection ability (Figure 3A and 3B). These results indicated that for ToCV Δ p22, the ability to systemically infect plants was rescued in RDR6i plants. Interestingly, the absence of RDR6 in RDR6i plants resulted in an enhancement of the leaf chlorotic symptoms in infected plants for both ToCV and ToCV Δ p22 (not shown). Altogether, these results suggest a role of p22 in counteracting an antiviral RDR6-mediated response during the process of systemic infection.

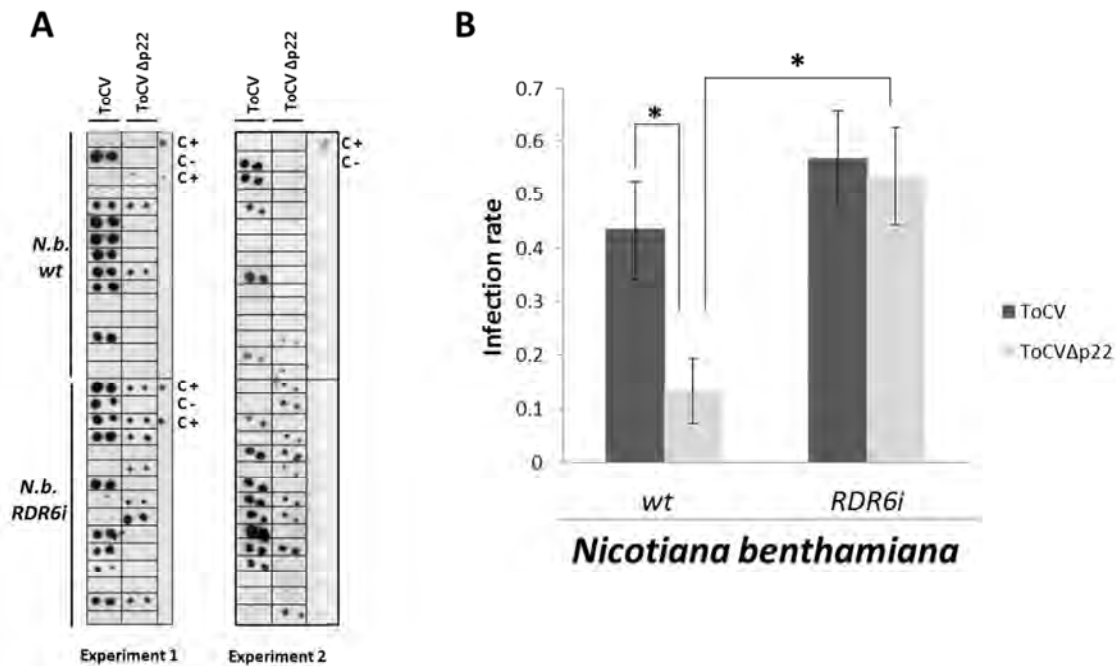


Fig. 3. Systemic infection of *Tomato chlorosis virus* (ToCV), either wild-type (ToCV) or its p22 mutant (ToCVΔp22), in *Nicotiana benthamiana* wild-type and *RDR6i* plants at 30 days post inoculation. (A) Hybridization (using DIG-labelled RNA2 probe) of squash blots of leaf petiole cross-sections (two blots performed per sample) of non-agroinfiltrated apical young leaves of *N. benthamiana* wild-type and *RDR6i* plants inoculated with infectious clones of RNA1 of ToCV or ToCVΔp22 and RNA2 of ToCV. Two independent experiments were performed with 15 plants per combination. (B) Systemic infection rate (mean ± standard error (SE)) of *N. benthamiana* wild-type and *RDR6i* plants inoculated with infectious clones of RNA1 of ToCV or ToCVΔp22 and RNA2 of ToCV from the two independent experiments conducted. Infections of ToCV and ToCVΔp22 were compared by the generalized mixed linear model with binomial error structure. For each genotype, infections with both viruses were compared by sequential Bonferroni tests. Bars represent the standard error of the mean, and asterisks indicate significant differences ($p < 0.05$).

In this work, we demonstrated that RDR6 plays a relevant role in controlling ToCV accumulation in plants. Our results also indicate that NbRDR6 does not influence local ToCV replication either in the presence or absence of p22 protein. Although p22 does not appear to be necessary for local RNA1 replication, it may influence the equilibrium between the positive and negative strands of the virus during the infection process. Therefore, it was noticeable that a clear accumulation of negative strands of ToCV RNA1Δp22 occurred in the absence of p22 (Figure 2B). Similarly, the absence of the p23 suppressor at the 3'-end of the genome of the closterovirus CTV was associated with a substantial increase in the accumulation of negative-stranded RNAs, especially those corresponding to subgenomic RNAs (sgRNA) (Satyanarayana *et al.*, 2002). Apparently, this increased accumulation of negative-stranded sgRNA reduced the availability of the corresponding positive-stranded sgRNA as a messenger. In the case

of ToCV, the increase in negative strands of ToCV RNA1 Δ p22, which might result in increased accumulation of positive strands from which the replication associated proteins are translated, does not correlate with increased RNA2 accumulation. We hypothesize that, as described for CTV, the increase in negative strands in the absence of p22 affects the availability of positive strands as messengers, leading to a reduction in products translated from RNA1, where the replicase is encoded. Alternatively, the absence of the p22 suppressor could lead to a less efficient protection of the RNA2 template that has to be replicated. Significantly, we demonstrated that the suppressor p22 appears to be important for the successful ToCV systemic infection of plants, counteracting an antiviral RDR6-mediated response. Similarly, RDR6 restricts systemic infection by the suppressor-defective viruses *Cucumber mosaic virus* (CMV) and *Turnip mosaic virus* (TuMV) (García-Ruiz *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010, 2011).

The results shown in this work, together with the results obtained for the p22 protein when isolated from the viral context that demonstrate that p22 preferentially binds long dsRNAs (Landeo-Ríos *et al.*, 2016), have allowed us to propose a model for the RDR6-p22 confrontation during ToCV infection. Thus, after the induction of antiviral silencing in the recipient tissues, the new dsRNA synthesized by RDR6 is processed into the secondary sRNA that targets the viral RNA for degradation. When ToCV produces p22, this protein would bind to the long dsRNAs generated by RDR6, avoiding their cleavage in sRNA and thus interfering in the progression of the silencing process. When p22 is absent (ToCV Δ p22), the virus is silenced more efficiently, as RDR6 generates the long dsRNAs that are processed into sRNAs to target ToCV Δ p22, impairing the systemic spread of the virus. In RDR6i plants in which RDR6 is constitutively silenced, efficient ToCV Δ p22 infections occur.

In summary, the use of a p22 suppressor-deficient version of ToCV allowed us to advance our understanding of the ToCV infection process, a necessary preliminary step in addressing this important viral disease.

ACKNOWLEDGMENTS

Y. L.-R. was the recipient of an AECID (Spain) fellowship. M.C.C. was the recipient of an I3P contract from the CSIC (Spain) co-financed by FSE. This work was supported by grants AGL2010-22287-C02-01/AGR and AGL2013-48913-C2-1-R from the Ministerio de Economía y Competitividad, Spain, co-financed by FEDER-FSE. J.N.C. and E.M.A. are members of the Research Group AGR-214, which is partially funded by the Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía, Spain. We thank E. de la Peña and R. Fernández-Muñoz for their help in the statistical analysis, C. Llave and J.A Díaz-Pendón for critical reading of the manuscript, and M.V. Martín and R. Tovar for technical assistance. We thank American Journal Experts (AJE) for English language editing.

REFERENCES

- Baulcombe, D., 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356-363.
- Cañizares, M.C., Navas-Castillo, J., Moriones, E., 2008. Multiple suppressors of RNA silencing encoded by both genomic RNAs of the crinivirus, *Tomato chlorosis virus*. *Virology* 379, 168-174.
- Díaz-Pendón, J.A., Ding, S.W., 2008. Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 46, 303-326.
- Dolja, V.V., Kreuze, J.F., Valkonen, J.P.T., 2006. Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Research* 117, 38-51.
- García-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Fahlgren, N., Brempelis, K.J., Carrington, J.C., 2010. Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during *Turnip mosaic virus* infection. *Plant Cell* 22, 481-496.
- Hamilton, A.J., Baulcombe, D., 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286, 950-952.
- Hechman, K.L., Pease, L.R., 2007. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nature Protocols* 2, 924-932.
- Jiang, L., Qian, D., Zheng, H., Meng, L.Y., Chen, J., Le, W.J., Zhou, T., Zhou, Y.J., Wei, C.H., Li, Y., 2012. RNA-dependent RNA polymerase 6 of rice (*Oryza sativa*) plays role in host defense against negative-strand RNA virus, *Rice stripe virus*. *Virus Research* 163, 512-519.
- Kreuze, J.F., Savenkov, E.I., Cuellar, W., Li, X., Valkonen, J.P.T., 2005. Viral class 1 RNase III involved in suppression of RNA silencing. *Journal of Virology* 79, 7227-7238.
- Landeo-Ríos, Y.M., Navas-Castillo, J., Moriones, E. & Cañizares, M.C., 2016. The p22 RNA silencing suppressor of the crinivirus *Tomato chlorosis virus* preferentially binds long dsRNAs preventing them from cleavage. *Virology* 488, 129-136.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25, 402-408.
- Llave, C., 2010. Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends in Plant Science* 15, 701-707.

- Lozano, G., Moriones, E., Navas-Castillo, J., 2006. Complete nucleotide sequence of the RNA2 of the crinivirus *Tomato chlorosis virus*. *Archives of Virology* 151, 581-587.
- Lozano, G., Moriones, E., Navas-Castillo, J., 2007. Complete sequence of the RNA1 of a European isolate of *Tomato chlorosis virus*. *Archives of Virology* 152, 839-841.
- Lu, R., Folimonov, A., Shintaku, M., Li, W.X., Falk, B.W., Dawson, W.O., Ding, S.W., 2004. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 15742-15747.
- Noris, E., Accotto, G.P., Tavazza, R., Brunetti, A., Crespi, S., Tavazza, M., 1996. Resistance to tomato yellow leaf curl geminivirus in *Nicotiana benthamiana* plants transformed with a truncated viral C1 gene. *Virology* 225, 130-138.
- Orlío, F.A., Fortes, I.M., Navas-Castillo, J., 2014. Infectious cDNA clones of the crinivirus *Tomato chlorosis virus* are competent for systemic plant infection and whitefly-transmission. *Virology* 464-465, 365-374.
- Peremyslov, V.Y., Hagiwara, Y., Dolja, V.V., 1998. Genes required for replication of the 15.5-kilobase RNA genome of a plant closterovirus. *Journal of Virology* 72, 5870-5876.
- Qin, C., Shi, N., Gu, M., Zhang, H., Li, B., Shen, J., Mohammed, A., Ryabov, E., Li, C., Wang, H., Liu, Y., Osman, T., Vatish, M., Hong, T., 2012. Involvement of RDR6 in short-range intercellular RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Scientific Reports* 2, 1-6.
- Qu, F., Ye, X., Hou, G., Sato, S., Clemente, T.E., Morris, T.J., 2005. RDR6 has a broad-spectrum but temperature-dependent antiviral defense role in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Virology* 79, 15209-15217.
- Reed, J.C., Kasschau, K.D., Prohnevsy, A.I., Gopinath, K., Pogue, G.P., Carrington, J.C., Dolja, V.V., 2003. Suppressor of RNA silencing encoded by *Beet yellows virus*. *Virology* 306, 203-209.
- Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllón, M.A., Albiach-Martí, M.R., Rabindran, S., Dawson, W.O., 2002. The p23 protein of *Citrus tristeza virus* controls asymmetrical RNA accumulation. *Journal of Virology* 76, 473-483.
- Schwach, F., Vaistij, F.E., Jones, L., Baulcombe, D.C., 2005. An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by *Potato virus X* and is required for the

- activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiology* 138, 1842-1852.
- Voinnet, O., 2008. Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends in Plant Science* 13, 317-328.
- Wang, X.B., Jovel, J., Udomporn, P., Wang, Y., Wu, Q., Li, W.X., Gascioli, V., Vaucheret, H., Ding, S.W., 2011. The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative argonautes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23, 1625-1638.
- Wang, X.B., Wu, Q., Ito, T., Cillo, F., Li, W.X., Chen, X., Yu, J.L., Ding, S.W., 2010. RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 484-489.
- Wieczorek, P., Wrzesinska, B., Obrepalska-Stepłowska, A., 2013. Assessment of reference gene stability influenced by extremely divergent disease symptoms in *Solanum lycopersicum*. *Journal of Virological Methods* 194, 161-168.
- Wintermantel, W.M. & Wisler, G.C., 2006. Vector specificity, host range, and genetic diversity of *Tomato chlorosis virus*. *Plant Disease* 90, 814-819.
- Wintermantel, W.M., Wisler, G.C., Anchieta, A.G., Liu, H.Y., Karasev, A.V., Tzanetakis, I.E., 2005. The complete nucleotide sequence and genome organization of *Tomato chlorosis virus*. *Archives of Virology* 150, 2287-2298.
- Wisler, G.C., Li, R.H., Liu, H.Y., Lowry, D.S., Duffus, J.E., 1998. *Tomato chlorosis virus*: a new whitefly-transmitted, phloem-limited, bipartite closterovirus of tomato. *Phytopathology* 88, 402-409.
- Yeh, H.H., Tian, T., Rubio, L., Crawford, B., Falk B.W., 2000. Asynchronous accumulation of *Lettuce infectious yellows virus* RNAs 1 and 2 and identification of an RNA1 *trans* enhancer of RNA2 accumulation. *Journal of Virology* 74, 5762-5768.
- Zuker, M., 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31, 3406-3415.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

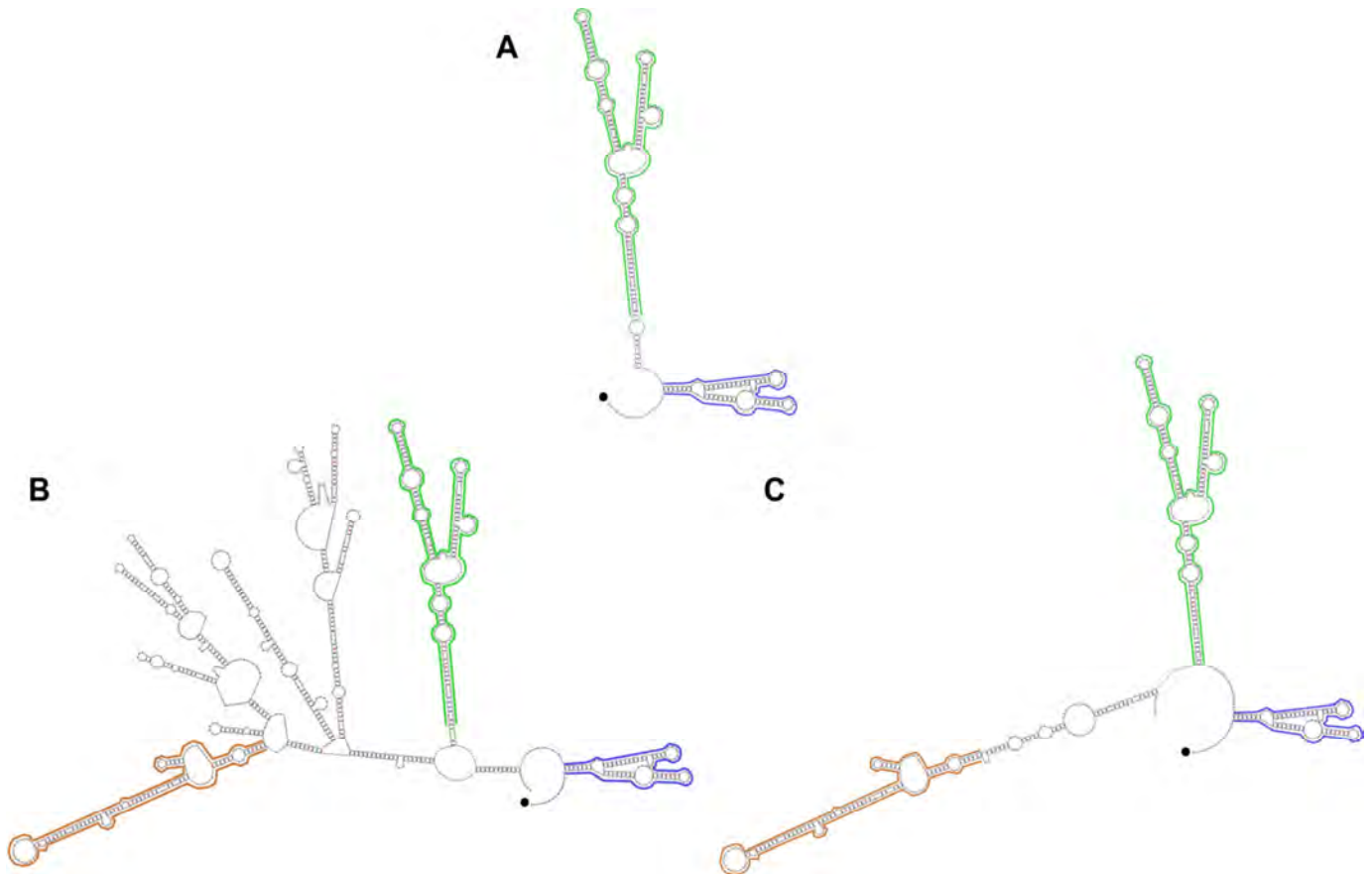
Supplementary Table 1. Sequences of primers used in this work.

Gene/ cDNA clone	Primer	Primer sequence (5' - 3') ¹	Primer position ^{1,2}
ToCV-RNA1 clone	MA 1543 (FW)	A <u>ACTGCAGA</u> AAGCCATTGACA	6907-6926
	MA 1544 (RV)	<i>TTGAATATTAACCAGAACTGACCTAAATAACAACAGTC</i>	8259-8241/7661-7640
	MA 1545 (FW)	<i>ATTTAGGTCAGTTCTGGTTAATATTCAAAGGATGG</i>	7650-7661/8244-8266
	MA 1546 (RV)	GATCTG <u>CAGGTC</u> GACTCTAG	8620-8601
ToCV-RNA2 clone	MA 1178 (FW)	ACCGGGCGCAGTTCATACAA	1522-1541
	MA 1179 (RV)	CCGACAAGAAACAGCGCTCC	1697-1675
CAC	MA 1279 (FW)	CTCCGTTGTGATGTAAGTGG	816-835
	MA 1280 (RV)	ATTGGTGAAAGTAACATCAT	987-967

¹The underlined sequences are restriction endonucleases sites introduced into the primers for cloning (*Pst* I in MA 1543 and MA 1546). Nucleotides in bold indicate overlapping sequences. Nucleotide sequences in italics and positions separated with the slash symbol (/) indicate the p22 flanking sequences. FW and RV indicate forward and reverse sense primers, respectively.

²Primer positions indicate the positions in the RNA1 and RNA2 nucleotide sequences of AT80/99 ToCV isolate (GenBank accession numbers DQ983480 and DQ136146, respectively) and the CAC house keeping gene of *Solanum lycopersicum* (GenBank accession number AK324080).

Supplementary Fig. 1 Lowest free energy secondary structure prediction of 3'-ends of the coding strand of ToCV RNA1. (a) Predicted secondary structure of the entire 3'-UTR (nt: 8237-8594). (b) Predicted secondary structure of the 3'-end comprising the 3'-UTR, the p22 sequence and the 241 nt located before the p22 sequence (nt: 7421-8594). (c) Predicted secondary structure of the 3'-end comprising the 3'-UTR and the 241 nt located before the p22 sequence (nt: 7421-7662 and 8237-8594). Identical stem loops are highlighted with similar colors. The 3'-end of each structure is indicated with (●). The RNAs were folded using the mfold program (Zuker, 2003).



CAPÍTULO IV





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

The heterologous expression of the p22 RNA silencing suppressor of the crinivirus *Tomato chlorosis virus* from TRV and PVX induces a drastic synergistic effect but does not complement suppressor defective mutant viruses

Yazmín M. Landeo-Ríos, Jesús Navas-Castillo, Enrique Moriones, M. Carmen Cañizares

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”- Universidad de Málaga - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Estación Experimental “La Mayora”, 29750 Algarrobo-Costa, Málaga, Spain.

To be submitted

ABSTRACT

To counteract host antiviral RNA silencing plant viruses express suppressor proteins that also function as pathogenicity enhancers. The genome of *Tomato chlorosis virus* (genus *Crinivirus*, family *Closteroviridae*) encodes an RNA silencing suppressor, the protein p22, that has been described as having one of the longest lasting, local suppressor activities. Since suppression of RNA silencing and the ability to induce a synergistic response are closely associated, we analyzed the effect of expressing p22 in heterologous viral contexts. Thus, we studied the effect of the expression of ToCV p22 from heterologous wild-type TRV and PVX viruses, and from attenuated suppressor mutants. Our results showed that although a drastic disease synergism leading to plant death was observed in the heterologous expression of ToCV p22 from both viruses, only in the case of TRV increased viral accumulation occurred. Also, the heterologous expression of ToCV p22 could not complement suppressor defective mutant viruses.

INTRODUCTION

RNA silencing acts as an effective antiviral defense in plants (Baulcombe, 2004). To counteract it, plant viruses have developed strategies based on the expression of silencing suppressor proteins. Most of the viral RNA silencing suppressors identified so far also exhibit properties such as the enhancement of virus accumulation and pathogenicity (Ding *et al.*, 1996; Pruss *et al.*, 1997). These suppressors of RNA silencing may contribute to disease synergism in which one virus enhances the virulence or complements the defects of the other one by helping it to replicate, to move systemically or to be transmitted by vectors. In viral synergism, co-infection of two or more different viruses can exacerbate disease symptom severity and increase the titer of the viruses observed in single infections (Pruss *et al.*, 1997; Vance *et al.*, 1995). The best studied example of plant viral synergism is that between *Potato virus Y* (PVY), the type member of the genus *Potyvirus* (family *Potyviridae*), and *Potato virus X* (PVX; family *Alphaflexiviridae*; genus *Potexvirus*) in tobacco (Goodman and Ross, 1974; Damirdagh and Ross, 1967; Vance, 1991; Vance *et al.*, 1995; González-Jara *et al.*, 2004). The pathogenicity enhancement observed when the potyviral helper component-proteinase (HC-Pro) suppressor was expressed from heterologous viruses revealed that this was the sequence involved in the synergistic interaction (Pruss *et al.*, 1997). Similarly, the co-expression of other viral RNA silencing suppressors was shown to be able to enhance the virulence of heterologous viruses (Moissiard and Voinnet, 2004; Scholthof *et al.*, 1995).

Tomato chlorosis virus (ToCV; genus *Crinivirus*) belongs to the family *Closteroviridae*, in which the largest RNA genomes among plant viruses have been reported (Dolja *et al.*, 2006). ToCV is transmitted in nature by the whitefly (Hemiptera: Aleyrodidae) *Bemisia tabaci* and has a bipartite single-stranded, positive-sense RNA genome (Lozano *et al.*, 2006, 2007; Wintermantel *et al.*, 2005; Wisler *et al.*, 1998). As for other members of the family *Closteroviridae*, ToCV adopts the strategy of encoding multiple RNA silencing suppressors (Cañizares *et al.*, 2008). Thus, while ToCV RNA-2 has delegated its suppressor function to the structural proteins CP and CPm, RNA-1 encodes a dedicated suppressor protein, the p22, which exhibits no apparent homology to any other reported protein. Interestingly, p22 has been shown to be one of the longest lasting local suppressors reported to date when assayed in *Nicotiana benthamiana*, suppressing local RNA silencing induced either by sense RNA or dsRNAs; moreover,

previous work showed that the heterologous expression of p22 from PVX lead to plant death (Cañizares *et al.*, 2008).

Tobacco rattle virus (TRV; family *Virgaviridae*; genus *Tobravirus*) and PVX have been frequently used as viral vectors for both, gene expression and gene silencing studies (Robertson *et al.*, 2004; MacFarlane and Popovich, 2000; Mallory *et al.*, 2002). TRV has a bipartite, positive-sense single-stranded RNA in which RNA1 encodes the replicase proteins, the 29K cell-to-cell movement protein (Hamilton and Baulcombe 1989), recently described as an RNA silencing suppressor (Deng *et al.*, 2013), and the 16K silencing suppressor protein (Ghazala *et al.*, 2008; Martín-Hernández and Baulcombe 2008; Martínez-Priego *et al.*, 2008; Reavy *et al.*, 2004). The TRV RNA2 encodes a coat protein (CP) (MacFarlane, 1999) and it has been engineered to facilitate insertion of heterologous gene sequences (Liu *et al.*, 2002a,b; Ratcliff *et al.*, 200; Ruiz *et al.*, 1998). In the RNA1, while the replicase is translated from the genomic RNA, the 29K and 16K proteins are translated from the respective subgenomic RNAs (sgRNA) (MacFarlane 1999). TRV RNA1 is capable to replicate and move systemically in plants in the absence of RNA2 (Swanson *et al.*, 2002). On the other hand, PVX has a monopartite, positive-strand RNA genome encoding five open reading frames (ORFs); a first ORF encodes the viral replicase, a central region encodes three overlapping ORFs, known as the triple-gene block (TGB), and a final ORF encodes the CP (Verchot-Lubicz *et al.*, 2007). It has also been engineered to insert heterologous gene sequences. The three central region encoded proteins and the final viral CP are translated from sgRNAs. One of the three TGB proteins is the multifunctional P25 that suppresses RNA silencing and is required for cell to cell movement through plasmodesmata (Angel *et al.*, 1996; Bayne *et al.*, 2005).

In this study, we advanced in the understanding of the role of p22 viral silencing suppressor as enhancer of disease symptoms in heterologous viral infections using as host plants *N. benthamiana*. Both wild-type and attenuated TRV and PVX suppressor mutants were examined for heterologous expression of p22. Our results showed that although p22 induced a dramatic enhancement of the disease symptoms caused by TRV and PVX resulting into plant death, the mechanism involved in the synergistic interaction seemed to be different in each virus. Thus, while for TRV the synergistic response is linked to an increased RNA viral level in plants, no change was observed for PVX. Also, the heterologous expression of ToCV.p22 can not functionally complement

the absence of the 16K or P25 suppressors of defective TRV or PVX mutant viruses, respectively.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid constructs

Plasmids pTRV1 and pTRV2 containing the cDNA of TRV RNA1 and RNA2, respectively, under the CaMV 35S promoter have been described (Liu *et al.*, 2002b). To construct TRV2p22, the cDNA fragment corresponding to ToCV p22 was PCR amplified using the Expand High Fidelity PCR system (Roche, Diagnostics, Germany) and primers MA 1287 and MA 1288 (Supplementary Table S1) with specific restriction sites and cloned into pTRV2. For mutants TRV1 Δ 16K and TRV Δ 16Kp22, one premature stop codon was introduced at position 11 of the amino acid sequence by PCR using the QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, U.S.A.) and specific primers MA 1281 and MA 1282 (Supplementary Table S1). Each construct was verified by DNA sequencing with an ABI 3730 XL DNA analyzer (Applied Biosystems, CA, USA) (Macrogen Inc., South Korea). The constructs were transformed into *A. tumefaciens* strain GV3101 by electroporation.

Plasmid pgR107 containing the cDNA of PVX under the CaMV 35S promoter has been described (Jones *et al.*, 1999). The generation of the construct PVXp22 has also been described (Cañizares *et al.*, 2008). To generate PVX Δ P25 and PVX Δ P25p22 constructs, two premature stop codons were introduced at positions 23 and 25 of the amino acid sequence of the P25 ORF of the vectors PVX and PVXp22 by PCR as described above, using the specific primers MA 1621 and MA 1622 (Supplementary Table S1). Each construct was verified by DNA sequencing with an ABI 3730 XL DNA analyzer (Applied Biosystems, CA, USA) (Macrogen Inc., South Korea). pgR107 was kindly provided by Dr. David C. Baulcombe (Sainsbury Laboratory, Norwich, United Kingdom). The constructs were transformed into *A. tumefaciens* strain GV3101 by electroporation.

Plant material and agroinfiltration

N. benthamiana plants (3-5 leaf stage) were agroinfiltrated with *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 strain carrying pTRV1 + pTRV2p22 or pTRV2, pTRV1Δ16K + pTRV2p22 or pTRV2, and PVX.p22, PVX, PVXΔP25p22 or PVXΔP25. For co-infiltration of pTRV1 and pTRV2 and its derivatives, equal volumes of individual *A. tumefaciens* cultures (optical density at 600nm of 1) were mixed prior infiltration. Plants were maintained in a controlled temperature chamber at 22 to 24°C with a 16h/8h light/dark cycle.

RNA analysis

For northern blot analysis, total RNA was extracted from leaf tissues as described by Noris *et al.* (1996). Total RNA (5 µg) was separated in 1% formaldehyde agarose gels, transferred to positively-charged nylon membranes (Roche Diagnostics, Germany), and probed with digoxigenin-labeled specific RNA probes for the RNA1 and RNA2 3'-untranslatable region of TRV (6548-6789 nt of RNA1 and 1860-2101 nt of RNA2), and for the 3'-end region of PVX (5875-6403 nt of PVX cDNA sequence in pgR107 vector). For tissue blot hybridization, freshly cross-sections of four noninoculated parts (leaf petiole or stem) of the plants were squash blotted on positively-charged nylon membranes (Roche Diagnostics, Germany), and blots were hybridized with the described digoxigenin-labeled RNA probes. The hybridization conditions used were those recommended by the manufacturer (DIG Application Manual for Filter Hybridization, Roche Diagnostics, Germany). Membranes were exposed to X-ray film (X-Omat AR, Kodak) and developed following a conventional photographic process.

RESULTS

Effect of the heterologous expression of the p22 suppressor on TRV virulence

To have a full vision of the role of the p22 suppressor in the context of a heterologous TRV infection, we examined the effect of the expression of the ToCV p22 suppressor from the heterologous wild-type TRV virus (TRVp22 construct), and from a 16K suppressor deficient TRV mutant (TRVΔ16Kp22 construct) comparing the results with those obtained with the wild type TRV and a 16K suppressor deficient TRV

mutant (TRV and TRV Δ 16K constructs, respectively). Then, *N. benthamiana* plants were co-infiltrated with *A. tumefaciens* strains harbouring a mixture of TRV1 and TRV2p22 or TRV2, and TRV1 Δ 16K plus TRV2p22 or TRV2 (Figure 1A).

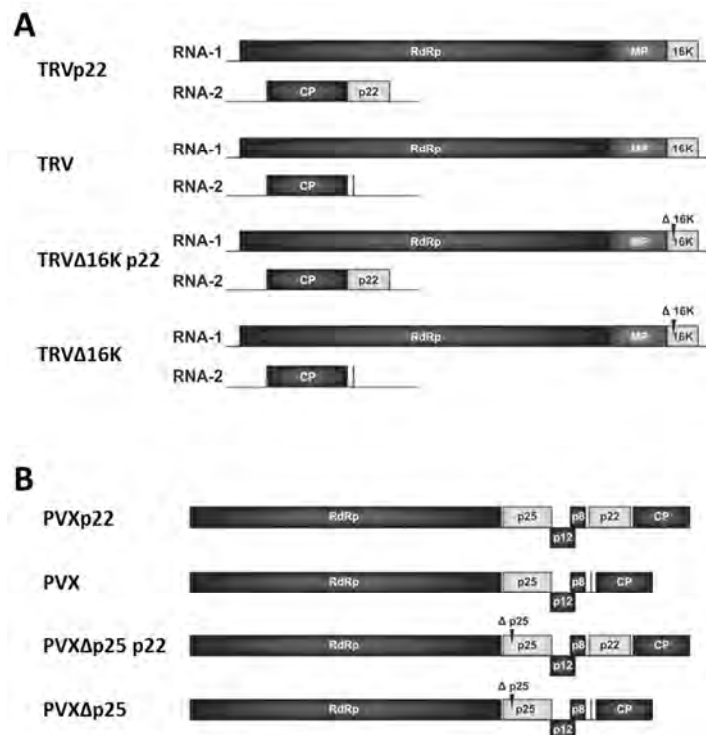


Fig. 1. Schematic representation of *Tobacco rattle virus* (TRV) and *Potato virus X* (PVX) constructs used in this work. (A) In TRVp22 the *Tomato chlorosis virus* (ToCV) p22 gene was inserted into a multiple cloning site (Mcs) on the viral RNA2 created after removing the two genes involved in nematode transmission of TRV. TRV is the viral vector containing the infectious TRV cDNA. In TRV Δ 16Kp22 the ToCV p22 gene was inserted into the Mcs and a premature stop codon was created in the RNA1 encoded 16K ORF (arrowhead). TRV Δ 16K consists of an infectious TRV cDNA that harbor a premature stop codon in the RNA1 encoded 16K ORF (arrowhead). (B) PVXp22 consists of an infectious PVX cDNA clone that expresses *Tomato chlorosis virus* (ToCV) p22 from a duplicated PVX CP promoter. PVX is the viral vector containing the infectious PVX cDNA. PVX Δ p25p22 p22 consists of an infectious PVX cDNA clone that expresses ToCV p22 and harbors two stop codons in the P25 ORF (arrowhead). PVX Δ p25 consists of an infectious PVX cDNA clone harboring two stop codons in the P25 ORF (arrowhead). A vertical black line shows the multiple cloning site.

By 7-9 days post inoculation (dpi), a striking enhancement of the symptoms was observed in plants infected with TRVp22 in which the added expression of the p22 suppressor is occurring. So, infected *N. benthamiana* plants developed large necrotic lesions on stems, leaf petioles and young leaves that spread rapidly to the whole plant, resulting in plant death by 19-21 dpi (Figure 2A). In contrast, no such a severe symptoms were observed in the other treatments in which the plants exhibited symptoms similar to those of the wild type TRV infection, leaf distortion, chlorotic mottle and mild necrosis (Figure 2A), although less severe for TRV Δ 16K and

TRV Δ 16Kp22. The results obtained with TRV Δ 16Kp22 show that no synergism occurs when both, the recently described TRV 29K suppressor (Deng *et al.*, 2013) and p22 are present. We analysed if it existed a correlation between the observed symptoms enhancement and changes in the accumulation of viral RNA by northern blot analysis of total RNA extracted from agroinfiltrated leaves at 5 dpi, and from young noninoculated leaves at 12, 19 and 26 dpi. As shown in Figure 2B, the enhanced virus virulence observed for TRVp22 correlated with enhanced accumulation of viral RNA at either 5, 12 and 19 dpi (analysis could not be performed at 26 dpi since TRV2p22-inoculated plants had died by this time). In contrast to this, the expression of the suppressor p22 from a 16K suppressor deficient TRV mutant (TRV Δ 16Kp22 infections) did not result into an increase of the RNA viral accumulation, with levels always lower than that observed for wild type TRV-inoculated plants. In fact, by 19 and 26 dpi the RNA viral accumulation levels in plants infected with TRV Δ 16Kp22, when p22 was present, were similar to the RNA viral levels observed for TRV Δ 16K infections, when neither 16K and p22 suppressors were present (Figure 2B). Similar results were obtained in two independent experiments.

Taken together, these results indicate that the expression of the suppressor p22 from the heterologous vector TRV when the 16K suppressor is present, causes a drastic synergistic effect enhancing both, symptoms and RNA viral accumulation level but it can not functionally complement a 16K defective virus.

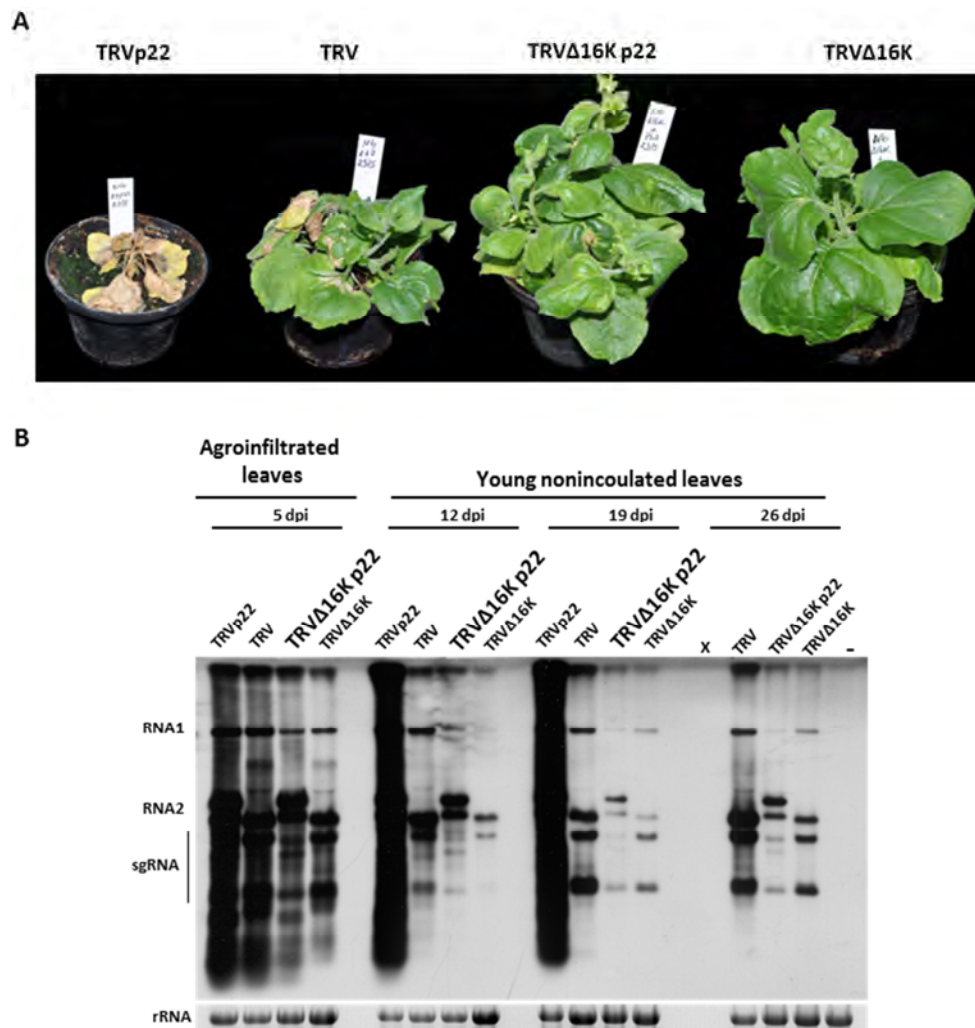


Fig. 2. Analysis of *Nicotiana benthamiana* plants inoculated with *Tobacco rattle virus* p22 (TRVp22), TRV, TRVΔ16Kp22 and TRVΔ16K. (A) Symptoms on *N. benthamiana* following inoculation with TRV.p22, TRV, TRVΔ16Kp22 and TRVΔ16K at 19 days postinoculation. (B) Northern blot analysis of RNA extracted from agroinfiltrated patches at 5 days post-infiltration (dpi) and from noninoculated leaves at 12, 19 and 26 dpi of plants agroinfiltrated with constructs TRV.p22, TRV, TRVΔ16Kp22 and TRVΔ16K. Hybridization was carried out with a probe specific to the 3' untranslated region that is identical in RNA1 and RNA2. Positions of TRV genomic RNA1 and RNA2 and subgenomic RNAs (sgRNA) are indicated. Note that RNA2 was longer in TRV.p22 and TRVΔ16Kp22 because of the insertion of the p22 gene sequence. X indicates no RNA sample since plants agroinfiltrated with TRV.p22 were dead at 26 dpi, and - is a healthy negative control. Ethidium bromide staining of rRNA was used as a loading control.

The virulence enhancement of the heterologous expression of the p22 suppressor from a TRV vector is not linked to a faster systemic spread

We examined whether the rapid spread of the necrotic symptoms observed in plants infected with TRVp22 was linked to a faster systemic spread of the virus. Tissue blot analysis was done for tissue cross sections of noninoculated tissues in four different

parts of the plants co-infiltrated with a mixture of TRV1 plus TRV2p22 or TRV2, and TRV1Δ16K plus TRV2p22 or TRV2 at 1, 2, 3, 4, 5, 7 and 12 dpi. As shown in Figure 3, the first positive signal in noninoculated parts of the plant was observed for plants inoculated with wild type TRV at 3 dpi. By 4 dpi, a complete systemic spread was achieved in plants inoculated with either TRVp22 and wild type TRV. By this time, however, the systemic spread was not evident in TRVΔ16Kp22 or TRVΔ16K-inoculated plants. By 5 dpi, almost in all the cases the mutant or wild type viruses had spread from the inoculated to the systemic parts of the plant, although full infection was more evident at 7 and 12 dpi. Similar results were obtained in two independent experiments.

These results showed that the synergistic effect of p22 did not seem to be linked to a faster spread of the chimeric virus across the infected plant. In addition to this, the presence of the suppressor p22 could not complement the absence of 16K of a defective TRV mutant virus since the rate/pattern of the spreading is similar to that observed when no suppressor, p22 or 16K, was present.

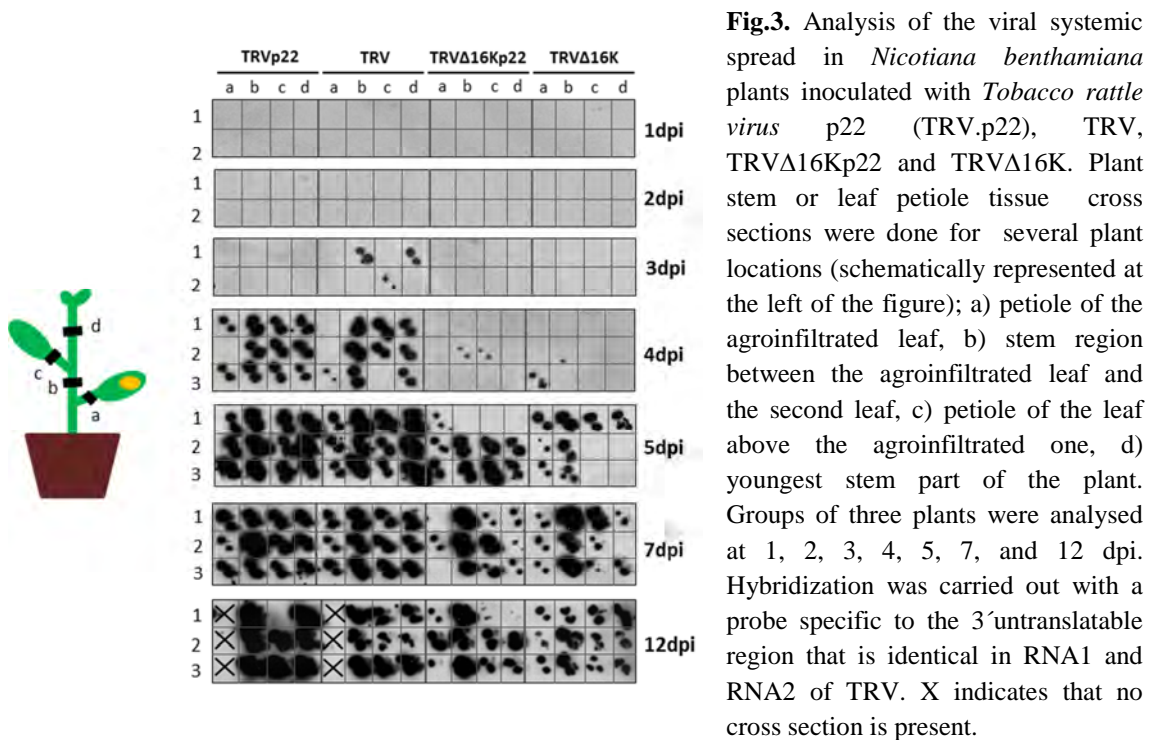


Fig.3. Analysis of the viral systemic spread in *Nicotiana benthamiana* plants inoculated with *Tobacco rattle virus* p22 (TRV.p22), TRV, TRVΔ16Kp22 and TRVΔ16K. Plant stem or leaf petiole tissue cross sections were done for several plant locations (schematically represented at the left of the figure); a) petiole of the agroinfiltrated leaf, b) stem region between the agroinfiltrated leaf and the second leaf, c) petiole of the leaf above the agroinfiltrated one, d) youngest stem part of the plant. Groups of three plants were analysed at 1, 2, 3, 4, 5, 7, and 12 dpi. Hybridization was carried out with a probe specific to the 3'untranslatable region that is identical in RNA1 and RNA2 of TRV. X indicates that no cross section is present.

Effect of the heterologous expression of the p22 suppressor on PVX virulence

Although it was previously demonstrated that the expression of the suppressor protein p22 from a heterologous PVX vector enhanced the virulence of the unrelated virus PVX when p22 was identified as a suppressor (Cañizares *et al.*, 2008), a detailed

analysis of this synergistic effect was not conducted. Here, as described above for TRV, a full vision of the role of p22 in the context of a heterologous PVX infection was obtained by expressing p22 from the wild type PVX (PVXp22) and from a P25 suppressor deficient PVX mutant (PVX Δ P25p22) (Figure 1B). Compared with PVX infection that resulted into mild mosaic symptoms in *N. benthamiana* plants at 7-8 dpi, plants inoculated with PVXp22 exhibited an evident leaf curling in young non-inoculated leaves that rapidly progressed into a generalized necrosis that lead to plant death by 10-12 dpi (Figure 4A). In contrast, even no mild mosaic symptoms could be observed in plants infected with PVX Δ P25p22 or PVX Δ P25, in which p22 or no suppressor were present, respectively (Figure 4A). The necrotic disease symptoms observed in the synergistic interaction progressed so fast that a time course for comparative analysis of virus accumulation could only be performed at 2, 4, and 5 dpi in agroinfiltrated leaves, and at 7 dpi in noninoculated leaves. By 7dpi, although the noninoculated leaves of PVXp22 infected plants already exhibited necrotic symptoms it was still possible to extract total RNA to perform the analysis. As summarized in Figure 4B analysis of agroinfiltrated patches at 2, 4 and 5 dpi, and young noninoculated leaves at 7 dpi showed no significant differences in the viral accumulation levels of PVXp22 and PVX, not being possible to link the enhanced symptomatology observed with an increase of the PVXp22 accumulation levels. On the other hand, for PVX Δ P25p22 or PVX Δ P25 inoculations, although at 2 dpi no differences in the viral accumulation levels were observed in the agroinfiltrated patches, at 4 and 5 dpi, similar but lower accumulation levels were observed in both cases compared to that detected for PVXp22 and PVX. Absence of detection of PVX Δ P25p22 or PVX Δ P25 at 7 dpi in young noninoculated leaves of test plants, indicated the strong constraints of this two P25 deleted mutant chimeras to reach distant parts of the plant. Similar results were obtained in two independent experiments.

Altogether, the previous results indicated that the enhancement of symptom expression observed in PVXp22 infected plants in which p22 and P25 suppressors were present, was not linked to an increase in viral RNA accumulation. On the other hand, the presence of p22 could not complement virulence of the chimeric PVX Δ P25p22 virus, showing a similar behavior to PVX Δ P25 mutant virus.

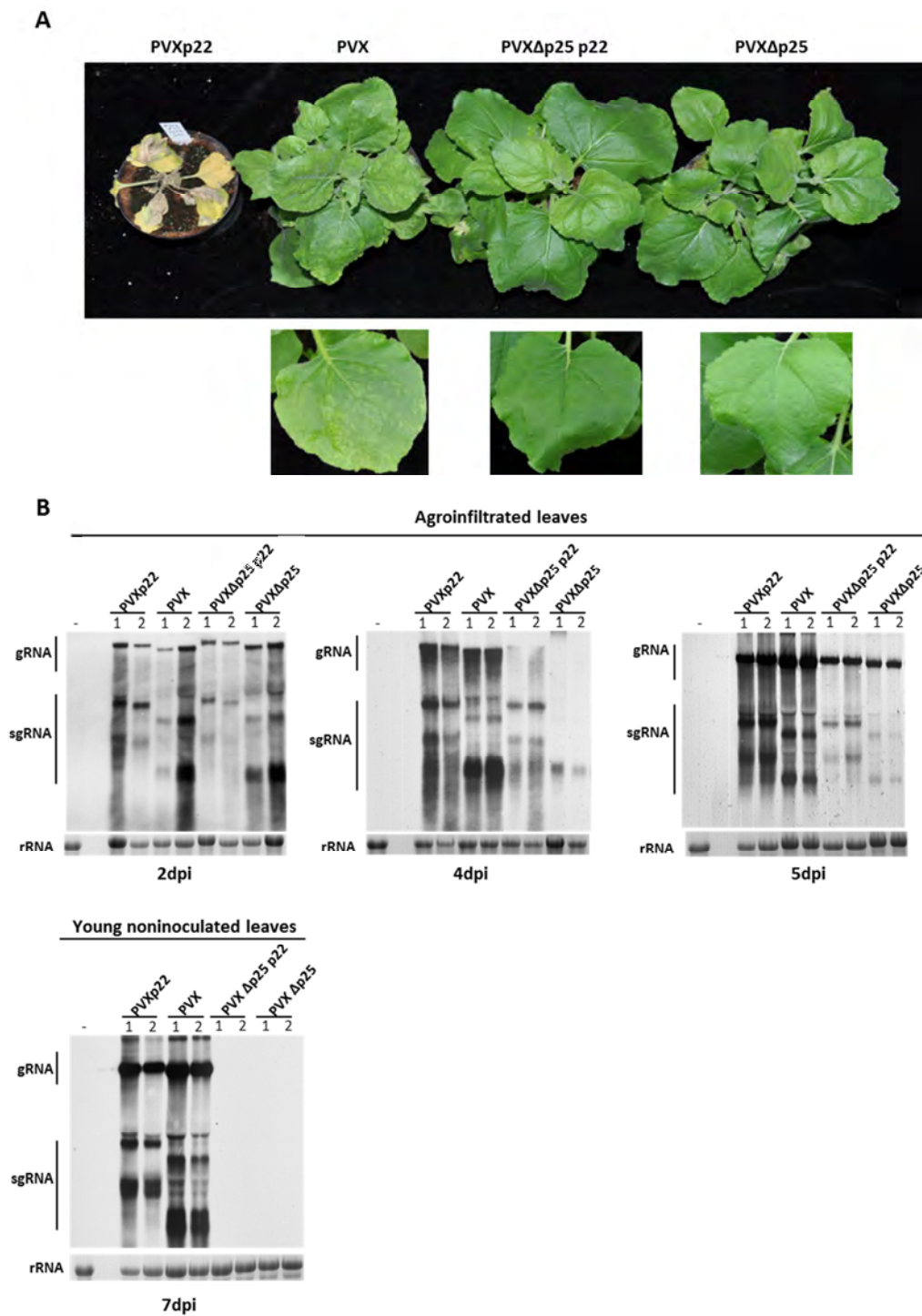


Fig. 4. Analysis of *Nicotiana benthamiana* plants inoculated with *Potato virus X*-p22 (PVXp22), PVX, PVXΔP25p22 and PVXΔP25. (A) Symptoms on *N. benthamiana* plants following infection with PVXp22, PVX, PVXΔP25p22 and PVXΔP25 at 12 days postinoculation. For PVX, PVXΔP25p22 and PVXΔP25 inoculations, a detail of a leaf systemically infected is shown. (B) Northern blot analysis of RNA extracted from agroinfiltrated patches at 2, 4 and 5 days post-infiltration (dpi) and from noninoculated young leaves at 7 dpi of plants agroinfiltrated with constructs PVXp22, PVX, PVXΔP25p22 and PVXΔP25. Hybridization was carried out with a probe specific to the 3'-end region of PVX. Positions of PVX genomic RNA (gRNA) and subgenomic RNAs (sgRNA) are indicated. Note that gRNA and sgRNA are longer in PVXp22 and PVXΔP25p22 because of the insertion of the p22 gene sequence. – is a healthy negative control. Ethidium bromide staining of rRNA was used as a loading control.

The increased virulence of the recombinant virus PVXp22 is not linked to a faster systemic spread

As described for TRV, we examined whether the rapid spread of the necrotic symptoms observed in plants infected with PVXp22 was linked to a faster spread of the virus to systemic parts of the plant by hybridization analysis of squash blot of stem or leaf petiole cross sections of noninoculated parts of the plant performed at 1, 2, 3, 4, 5 and 7 dpi (Figure 5). No significant differences were observed between PVXp22 and PVX which showed that the first clear positive signals of virus presence in the four sections of noninoculated parts of the plants was observed at 4 dpi for both viruses. This positive signal was maintained in these two cases until 7dpi, although the systemic necrosis shown by PVXp22-infected plants did not allow to perform the tissue blot of some cross sections by 7 dpi. On the other hand, no positive signals in systemic parts of the plants was detected for PVXΔP25p22 or PVXΔP25 inoculations. Similar results were obtained for the two independent experiments conducted.

Taken together, these observations suggested that the heterologous expression of the suppressor p22 from a PVX vector did not result into a faster spread of the virus across the plant and that p22 could not functionally complement the suppressor defective virus PVXΔP25.

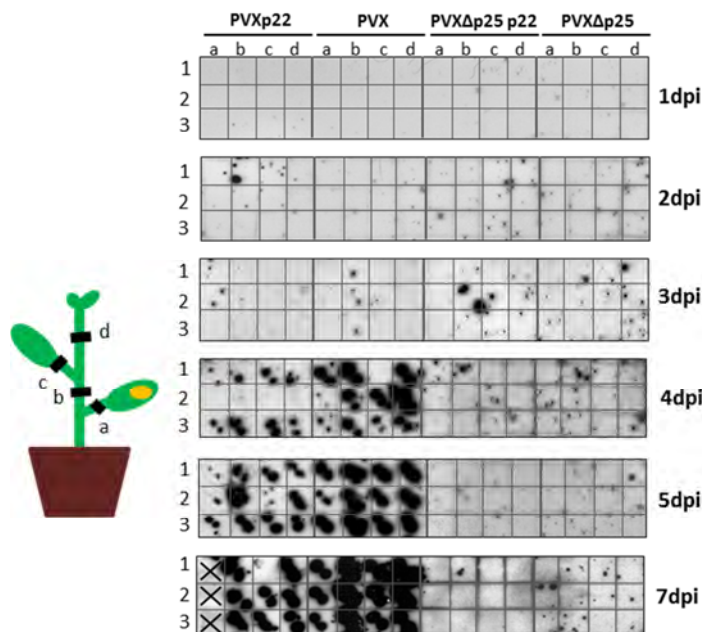


Fig.5. Analysis of the viral systemic spread in *Nicotiana benthamiana* plants inoculated with *Potato virus X* p22 (PVXp22), PVX, PVXΔP25p22 and PVXΔP25. Cross sections of plant tissues in positions a, b, c and d (schematically represented at the left of the figure) were done as described in Fig. 3. Groups of three plants were analysed at 1, 2, 3, 4, 5 and 7 dpi. Hybridization was carried out with a probe specific to the 3' untranslated region of PVX. X indicates that no cross section is present.

DISCUSSION

Since viral RNA silencing suppressors have been linked to viral synergism, we studied whether ToCV p22 suppressor, which exhibited a long lasting suppressor activity in local assays (Cañizares *et al.*, 2008), induced a synergistic response when expressed from heterologous viruses. By expressing ToCV p22 from TRV and PVX viruses, and from their 16K and P25 suppressor deficient mutants, respectively, we advanced in understanding the role of p22 suppressor in viral synergism.

The expression of ToCV p22 from TRV vector resulted into a synergistic interaction with an enhancement of the pathogenicity and accumulation of the viral RNAs in plants. This enhancement, however, was not linked to a faster virus systemic spread. The fact of finding that the p22 expression increased the viral accumulation levels of TRV could indicate that the observed synergistic effect is at least in part due to the combined action of different suppressors on multiple steps of the RNA silencing pathway (MacDiarmid, 2005; Pruss *et al.*, 1997). This interaction can contribute to a more effective way of counteracting an antiviral RNA silencing response of plants which might then result in the observed higher viral accumulation level. TRV 16K has been described as a relatively weak suppressor that effectively suppresses RNA silencing in the presence of low levels of dsRNA inducer (Martínez-Priego *et al.*, 2008). Since its activity is overcome when a dsRNA inducer accumulates, the presence of ToCV p22 that can bind long dsRNAs (Landeo-Ríos *et al.*, unpublished data) seems to be an appropriate support for the combined action. That the increased viral accumulation levels observed were not linked to a faster systemic spread of TRVp22 could be due to containing an extra foreign sequence that could affect the viral spread. However, although the presence of ToCV p22 resulted into a dramatic synergistic effect when the 16K TRV suppressor was present, it could not functionally complement a 16K defective suppressor deficient TRV mutant virus which showed a mild phenotype, no increase of the viral accumulation levels and an slow spread. In contrast to this, the heterologous expression of *Cucumber mosaic virus* (CMV; family *Bromoviridae*; genus *Cucumovirus*) 2b, *Pea early browning virus* (PEBV; family *Virgaviridae*; genus *Tobravirus*) 12K, *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV; family *Virgaviridae*; genus *Furovirus*) 19K, and *Barley stripe mosaic virus* (BSMV; family *Virgaviridae*; genus *Hordeivirus*) γ b suppressors from a 16K deficient mutant TRV virus were able to compensate the absence of the TRV 16K protein (Liu *et al.*, 2002a). Although, as stated

before, the mechanism of action of ToCV p22 could complement TRV 16K suppressor activity, probably other factors are also important for a functional interchangeability. In fact, that PEBV 12K, SBWMV 19K, BSMV γ b and TRV 16K are all classified as cysteine-rich proteins (CRPs) could indicate that it is important to have both a structural and a functional similarity for being interchangeable. These conservation/complementation of action could be linked, for example, to a required subcellular distribution, necessary to accomplish a function. On the other hand, although the TRV1 encoded 29K protein has been described as a suppressor of RNA silencing (Deng *et al.*, 2013) in addition to 16K, our results in plants infected with the mutant recombinant virus TRV Δ 16Kp22 seemed to indicate that no synergistic interaction occurred between this protein and p22 when both suppressors were present simultaneously in a TRV background.

In the case of the heterologous expression of ToCV p22 from PVX although we observed an enhancement of symptoms leading to plant death at 10-12 dpi, no differences in the viral RNA accumulation levels were observed in either, agroinfiltrated or noninoculated leaves of *N. benthamiana*. Similar results have been reported in *N. benthamiana* infected with PVX or PVX expressing the silencing suppressor HC-Pro either derived from PVY or TEV (Pruss *et al.*, 1997; González-Jara *et al.*, 2005). It was argued that the lack of an enhancement in PVX titers during this synergistic interaction in *N. benthamiana* could be due to the existence of a threshold above which viral accumulation cannot increase in this host, despite inhibition of antiviral defenses by HC-Pro (González-Jara *et al.*, 2005). Therefore, since the enhanced pathogenicity associated with the heterologous expression of the suppressor p22 from PVX does not seem to be the consequence of a more efficient viral accumulation, other mechanisms must be involved in the induction of synergism. Recent results by Aguilar *et al.* (2015) indicate that the combination of PVX with different viral suppressors capable of inducing a systemic necrosis response in *N. benthamiana* do not have any effect in the PVX genomic RNA levels but enhance an/or stabilize the PVX subgenomic RNAs. Although in our case we do not appreciate an evident increase in the viral accumulation levels of subgenomic RNAs, we have to bear in mind that these subgenomic RNAs are longer than in wild type PVX since they have the extra sequence of the p22 gene. Thus, these authors propose that the systemic necrosis observed during PVX-associated synergisms is a delayed systemic HR-like response triggered by P25 once it reaches a threshold level as a result of the action of the heterologous suppressor of silencing

(Aguilar *et al.*, 2015). It is suggested that *Nicotiana* spp. could carry a matching R gene that can specifically recognize P25 and mount an HR, where the suppressor activity of the P25 protein is necessary. Based on this model, we can hypothesize the heterologous expression of the p22 suppressor could help P25 to reach a threshold expression level, probably by stabilizing the subgenomic RNAs, triggering the HR-like response resulting into a drastic enhancement of the necrotic symptoms that lead to plant death in a short period of time. Similarly to what we observed for TRV, expression of p22 was unable to compensate the impaired infection of a P25-suppressor defective mutant PVX. Even more, the expression of p22 by the suppressor defective mutant virus seemed to limit further the virus spread ability (see Fig. 5), probably due to a debilitating effect of the extra sequence insertion.

In summary, the results presented here might help to understand the complexity observed in mixed infections of viruses in nature supporting the relevance of viral suppressors in these interactions.

ACKNOWLEDGEMENTES

Y. L.-R. was the recipient of an AECID (Spain) fellowship. M.C.C. was the recipient of an I3P contract from the CSIC (Spain) co-financed by FSE. This work was supported by grants AGL2010-22287-C02-01/AGR and AGL2013-48913-C2-1-R from the Ministerio de Economía y Competitividad, Spain, co-financed by FEDER-FSE. J.N.C. and E.M.A. are members of the Research Group AGR-214, partially funded by the Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía, Spain. We thank M.V. Martín and R. Tovar for their technical assistance.

REFERENCES

- Aguilar, E., Almendral, D., Allende, L., Pacheco, R., Chung, B.N., Canto, T., Tenllado, F., 2015. The P25 protein of *Potato virus X* (PVX) is the main pathogenicity determinant responsible for systemic necrosis in PVX-associated synergisms. *Journal of Virology* 89, 2090-2103.
- Angell, S.M., Davies, C., Baulcombe, D.C., 1996. Cell-to-cell movement of *Potato virus X* is associated with a change in the size exclusion limit of plasmodesmata in trichome cells of *Nicotiana clevelandii*, *Virology* 215, 197-201.
- Baulcombe, D. C., 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356-363.
- Bayne, E.H., Rakitina, D.V., Morozov, S.Y., Baulcombe, D.C., 2005. Cell-to-cell movement of Potato Potexvirus X is dependent on suppression of RNA silencing. *The Plant Journal* 44, 471-482.
- Cañizares, M.C., Navas-Castillo, J., Moriones, E., 2008. Multiple suppressors of RNA silencing encoded by both genomic RNAs of the crinivirus, *Tomato chlorosis virus*. *Virology* 379, 168-174.
- Damirdagh, I.S., Ross, A.F., 1967. A marked synergistic interaction of *Potato virus X* and *Y* in inoculated leaves of tobacco. *Virology* 31, 296-307.
- Deng, X., Kelloniemi, J., Haikonen, T., Vuorinen, A. L., Elomaa, P., Teeri, T. H., Valkonen, J. P., 2013. Modification of *Tobacco rattle virus* RNA1 to serve as a VIGS vector reveals that the 29K movement protein is an RNA silencing suppressor of the virus. *Molecular Plant Microbe Interactions* 26, 503-514.
- Ding, S.W., Shi, B.J., Li, W.X., Symons, R.H., 1996. An interspecies hybrid RNA virus is significantly more virulent than either parental virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 7470-7474.
- Dolja, V.V., Kreuze, J.F., Valkonen, J.P.T., 2006. Comparative and functional genomes of closteroviruses. *Virus Research* 117, 38-51.
- Ghazala, W., Waltermann, A., Pilot, R., Winter, S., Varrelmann, M., 2008. Functional characterization and subcellular localization of the 16K cysteine-rich suppressor of gene silencing protein of *Tobacco rattle virus*. *Journal of General Virology* 89, 1748-1758.
- Goodman, R.M., Ross, A.F., 1974. Enhancement by *Potato virus Y* of *Potato virus X* synthesis in doubly infected tobacco depends on the timing of invasion by the viruses. *Virology* 58, 16-24.

- González-Jara, P., Tenllado, F., Martínez-García, B., Atencio, F.A., Barajas, D., Vargas, M., Díaz-Ruiz, J., Díaz-Ruiz, J.R., 2004. Host-dependent differences during synergistic infection by potyviruses with *Potato virus X*. *Molecular Plant Pathology* 5, 29-35.
- González-Jara, P., Atencio, F.A., Martínez-García, B., Barajas, D., Tenllado, F., Díaz-Ruiz, J.R., 2005. A single amino acid mutation in the *Plum pox virus* helper component-proteinase gene abolishes both synergistic and RNA silencing suppression activities. *Phytopathology* 95, 894-901.
- Hamilton, W.D.O., Baulcombe, D.C., 1989. Infectious RNA produced by *in vitro* transcription of a full-length *Tobacco rattle virus* RNA1 cDNA. *Journal of General Virology* 70, 963-968.
- Jones, L., Hamilton, A. J., Voinnet, O., Thomas, C. L., Maule, A. J., Baulcombe, D. C., 1999. RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell* 11, 2291-2301.
- Liu, H., Reavy, B., Swanson, M., MacFarlane, S.A., 2002a. Functional replacement of the *Tobacco rattle virus* cysteine-rich protein by pathogenicity proteins from unrelated plant viruses. *Virology* 298, 232-239.
- Liu, Y.L., Schiff, M., Marathe, R., Dinesh-Kumar, S.P., 2002b. Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to *Tobacco mosaic virus*. *Plant Journal* 30, 415-429.
- Lozano, G., Moriones, E., Navas-Castillo, J., 2006. Complete nucleotide sequence of the RNA2 of the Crinivirus *Tomato chlorosis virus*. *Archives of Virology* 151, 581-587.
- Lozano, G., Moriones, E., Navas-Castillo, J., 2007. Complete sequence of the RNA1 of a European isolate of *Tomato chlorosis virus*. *Archives of Virology* 152, 839-841.
- MacDiarmid, R., 2005. RNA silencing in productive virus infections. *Annu. Rev. Phytopathology* 43, 523-544.
- MacFarlane, S.A., 1999. Molecular biology of the tobnaviruses. *Journal of General Virology* 80, 2799-2807.
- MacFarlane, S. A., Popovich, A. H., 2000. Efficient expression of foreign proteins in roots from tobnavirus vectors. *Virology* 267, 29-35.

- Mallory, A. C., Parks, G., Endres, M. W., Baulcombe, D., Bowman, L. H., Pruss, G. J., Vance, V. B., 2002. The amplicon-plus system for high-level expression of transgenes in plants. *Nature Biotechnology* 20, 622-625.
- Martín-Hernández, A.M., Baulcombe, D.C., 2008. *Tobacco rattle virus* 16-kilodalton protein encodes a suppressor of RNA silencing that allows transient viral entry in meristems. *Journal of Virology* 82, 4064-4071.
- Martínez-Priego, L., Donaire, L., Barajas, D., Llave, C., 2008. Silencing suppressor activity of the *Tobacco rattle virus*-encoded 16-kDa protein and interference with endogenous small RNA-guided regulatory pathways. *Virology* 376, 346-356.
- Moissiard, G., Voinnet, O., 2004. Viral suppression of RNA silencing in plants. *Molecular Plant Pathology* 5, 71-82.
- Noris, E., Accotto, G.P., Tavazza, R., Brunetti, A., Crespi, S., Tavazza, M., 1996. Resistance to tomato yellow leaf curl geminivirus in *Nicotiana benthamiana* plants transformed with a truncated viral C1 gene. *Virology* 225, 130-138.
- Pruss, G., Ge, X., Shi, X. M., Carrington, J. C., Vance, V.B., 1997. Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* 9, 859-868.
- Reavy, B., Dawson, S., Canto, T., MacFarlane, S.A., 2004. Heterologous expression of plant virus genes that suppress post-transcriptional gene silencing results in suppression of RNA interference in *Drosophila* cells. *BMC Biotechnology* 4, 18.
- Robertson, D., 2004. VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools. *Annual Review of Plant Biology* 55, 495-519.
- Ruiz, M.T., Voinnet, O., Baulcombe, D.C., 1998. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 10, 937-946.
- Scholthof, H.B., Scholthof, K.B.G., Jackson, A.O., 1995. Identification of *Tomato bushy stunt virus* host-specific symptom determinants by expression of individual genes from a *Potato virus X* vector. *Plant Cell* 7, 1157-1172.
- Swanson, M., Barker, H., MacFarlane, S.A., 2002. Rapid vascular movement of tobnaviruses does not require coat protein: evidence from mutated and wild-type viruses. *Annals of Applied Biology* 141, 259-266.
- Vance, V.B., 1991. Replication of *Potato virus X* RNA is altered in coinfections with *Potato virus Y*. *Virology* 182, 486-494.

- Vance, V.B., Berger, P.H., Carrington, J.C., Hunt, A.G., Shi, X.M., 1995. 5' proximal potyviral sequences mediate *Potato virus X*/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology* 206, 583-590.
- Verchot-Lubicz, J., Ye, C.M., Bamunusinghe, D., 2007. Molecular biology of potexviruses: recent advances. *Journal of General Virology* 88, 1643-1655.
- Wintermantel, W.M., Wisler, G.C., Anchieta, A.G., Liu, H.Y., Karasev, A.V., Tzanetakis, I.E., 2005. The complete nucleotide sequence and genome organization of *Tomato chlorosis virus*. *Archives of Virology* 150, 2287-2298.
- Wisler, G.C., Li, R.H., Liu, H.Y., Lowry, D.S., Duffus, J.E., 1998. *Tomato chlorosis virus*: a new whitefly-transmitted, phloem-limited, bipartite closterovirus of tomato. *Phytopathology* 88, 402-409.

SUPPLEMENTARY MATERIAL
Supplementary Table 1. Sequences of primers used in this work.

Gene	Primer		Primer sequence (5' - 3')	Primer position
pTRV1	MA 1281	(FW)	TACTCAAGGGTTGTGTGAAT <i>TAAGT</i> CACTGTTCTTGGTCAC	6121
pTRV1	MA 1282	(RV)	GTGACCAAGAACAGTGACT <i>TTA</i> ATTCACACAACCCCTTGAGTA	6161
PVX	MA 1621	(FW)	CTTTAGATTCAT <i>GACCTTAGG</i> TAGTACATGCAGTAGCC	5543
PVX	MA 1622	(RV)	GGCTACTGCATGTACTAC <i>CTAAGGTCAT</i> GAATCTAAAG	5580
ToCV-p22	MA 1287	(FW)	<u>ACCGAATTC</u> ATGGATCTCACTGGTTGTTGC	7662
ToCV-p22	MA 1288	(RV)	TAACTCGAGTTATATATCACTCCCAAAGAAAAAC	8243

Table S1: The underlined sequences are sites restriction endonucleases introduced into primers for cloning (*Eco* RI in MA 1287 and *Xho* I in MA 1288). In bold and italic sequences indicate the stop codons introduced into primers. Primer positions indicate the positions in: RNA1-TRV genome of Ppk20 isolate with GenBank access number AF166084, pgR107 vector with GenBank access number AY297842 and RNA1-ToCV genome of AT 80/99 isolate with GenBank access number DQ983480. FW and RV indicate forward and reverse primers sense.

DISCUSIÓN GENERAL



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ToCV pertenece al género *Crinivirus* dentro de la familia *Closteroviridae* donde se engloban los virus de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva de mayor tamaño y complejidad entre los virus de RNA de plantas. La expresión del genoma de los closterovirus incluye tres estrategias: i) procesamiento proteolítico, ii) desplazamiento de la pauta de lectura del ribosoma en un nucleótido y iii) producción de RNAs subgenómicos (sgRNAs) 3' coterminales (Dolja *et al.*, 2006), siendo similar al mecanismo de expresión descrito para los coronavirus (Karasev *et al.*, 1997). Esta compleja combinación de estrategias, no descrita en ningún otro grupo de plantas (Koonin y Dolja, 1993), genera grandes cantidades de especies de RNA viral entre las que se encuentran RNAs altamente estructurados e intermediarios de replicación de doble hebra (dsRNAs) correspondientes tanto al RNA genómico como a los sgRNAs (Hilf *et al.*, 1995). Ya que el dsRNA es el inductor de una respuesta de defensa de la planta basada en el silenciamiento por RNA, parece lógico pensar que los virus de este grupo puedan haber desarrollado eficientes y complejas estrategias de supresión de silenciamiento para mantener la viabilidad de sus infecciones. Así, y tal y como ha sido descrito para otros miembros de esta familia, ToCV codifica en su genoma bipartito hasta tres proteínas con actividad supresora del silenciamiento. Mientras que en el RNA2 esta función supresora del silenciamiento se lleva a cabo por las proteínas estructurales CP y CPM, en el RNA1 esta actividad supresora se realiza por una proteína que parece específicamente dedicada a ello, la proteína p22. Aunque ambos RNAs son necesarios para obtener una infección productiva en planta, el RNA1 puede replicarse independientemente, en contraste, el RNA2 es completamente dependiente de las proteínas codificadas en el RNA1 para su replicación (Orilio *et al.*, 2014). De las citadas proteínas con actividad supresora de silenciamiento, p22, codificada en el extremo 3' del RNA1, posee una de las actividades supresoras descritas más duraderas a lo largo del tiempo, en ensayos de expresión transitoria en planta (Cañizares, *et al.*, 2008). Esta particularidad hizo que fuera considerada de especial interés, convirtiéndose en el tema de estudio de esta tesis doctoral, donde la finalidad última es conocer cómo, por mediación de p22, ToCV es capaz de hacer frente a una respuesta defensiva por parte de la planta basada en el silenciamiento por RNA y conocer su efecto cuando se expresa de forma heteróloga a partir de otros virus diferentes a ToCV.

Dentro de la familia *Closteroviridae* existe un alto nivel de variabilidad del contenido en genes localizados en el extremo 3' del genoma en miembros monopartitos

de los géneros *Ampelovirus* y *Closterovirus*, y del RNA1 en miembros mayormente bipartitos del género *Crinivirus* (Dolja *et al.*, 2006). Aunque se trate de una región altamente variable en contenido en genes, es bastante común entre los miembros de esta familia, que al igual que ocurre con ToCV, esta región 3'-terminal codifique proteínas con actividad supresora del silenciamiento (Reed *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2004; Kreuze *et al.*, 2005; Chiba *et al.*, 2006; Cañizares *et al.*, 2008; Gouveia *et al.*, 2012). El que no exista ninguna homología entre ellas, parece indicar que poseer un gen con estas características en esta posición del genoma confiere algún tipo de ventaja adaptativa a este grupo de virus, y además que es una reciente adquisición (Dolja *et al.*, 2006). Por tanto, dadas las implicaciones evolutivas que esta región del genoma parece tener en este grupo de virus (Dolja *et al.*, 2006; Cuellar *et al.*, 2008; Tugume *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2011), hemos realizado un estudio sobre la variabilidad genética de la región del RNA1 de ToCV que codifica la proteína supresora del silenciamiento p22, en poblaciones de ToCV. Hasta el momento, los estudios realizados de variabilidad genética del RNA1 de ToCV, se han basado principalmente en el análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas correspondientes a las regiones ORF1a y ORF1b. Estos estudios han mostrado la existencia de dos tipos de variantes de RNA1, denominados tipo I y tipo II (Lozano *et al.*, 2009; Fortes, 2010; Villanueva, 2014). En este trabajo, se ha llevado a cabo un estudio de variabilidad genética de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas correspondientes a la proteína p22 de 45 aislados de ToCV recogidos en las epidemias ocurridas en cultivos comerciales de tomate y pimiento de las principales zonas productoras del sudeste español. Los altos valores de identidad nucleotídica y aminoacídica encontrados, con valores entre el 96.2 y el 100 y entre el 94.8 y el 100%, respectivamente, fueron similares a los encontrados en un estudio similar realizado con la proteína p22 de aislados del crinivirus *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) (Tugume *et al.*, 2013). El análisis del alineamiento de las secuencias de p22 mostró 19 posiciones informativas, de las cuales 9 resultaron en sustituciones no sinónimas, que se localizaron principalmente en el tercio carboxilo terminal de la secuencia de la proteína. Por tanto, parece existir una mayor restricción a la variabilidad en los dos primeros tercios de la secuencia de la proteína p22 de ToCV. En el estudio de variabilidad genética del supresor de silenciamiento p22 de SPCSV, sin embargo, la variabilidad encontrada se distribuía a lo largo de toda la secuencia de los aislados analizados (Tugume *et al.*, 2013). El análisis de las secuencias de aminoácidos mostró que dichas posiciones informativas determinaban la existencia de 2 tipos principales de secuencias,

aunque no provocaban ningún cambio en la estructura secundaria de la proteína en base a las predicciones *in silico* que se realizaron, lo que podría indicar la importancia de la misma para el mantenimiento de la función de p22. De hecho, en la región amino terminal en la que se observó mayor restricción a la variación existía una prevalencia de plegamientos en alfa-hélice, que podría ser importante para el mantenimiento de la función supresora del silenciamiento de p22. Del mismo modo, estudios estructurales han mostrado que para ciertos supresores de silenciamiento por RNA que actúan uniendo dsRNAs, la disposición de diferentes alfa-hélices determina la estructura de unión necesaria para el reconocimiento del dsRNA (Lingel *et al.*, 2005; Ye y Patel, 2005). El estudio filogenético de las secuencias de aminoácidos de p22 de los 45 aislados de ToCV analizados mostró una distribución de las mismas en dos grupos bien definidos, que coincidían con los determinados por los alineamientos de las secuencias aminoacídicas, y que correspondían a los tipos I y II ya descritos para el RNA1. Aunque los aislados procedentes de otros países (Grecia, Brasil, Florida y China) se agrupaban con los aislados tipo II, éstos estaban claramente separados de la rama donde se situaban los aislados tipo II de España. En relación al huésped del que procedía el aislado, se observó que todas las secuencias de p22 procedentes de pimiento se agrupaban con las de tipo I, mientras que las secuencias de aislados de tomate se agrupaban tanto con las de tipo I como con las de tipo II, lo que podría indicar la existencia de algún tipo de restricción en el caso de las secuencias tipo II en el huésped pimiento. Una vez conocida la existencia de estos dos tipos de proteínas p22 se ha estudiado si existía alguna diversificación funcional entre ambos tipos de secuencias. De hecho, se ha descrito que mutaciones puntuales en la secuencia de proteínas supresoras de silenciamiento virales pueden tener un efecto drástico en la actividad de estos supresores (Chen *et al.*, 2008; Torres-Barceló *et al.*, 2008; Yambao *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2009; Gouveia and Nolasco, 2012). Sin embargo, la comparación de la actividad supresora de ambos tipos de proteína p22 mediante un ensayo simultáneo de agroinfiltración en parche con GFP (Johansen y Carrington, 2001), visualización de fluorescencia y análisis de muestras a lo largo del tiempo en plantas de *Nicotiana benthamiana* mostró que ambos tipos de proteína p22 son capaces de suprimir de forma igualmente eficiente el silenciamiento inducido tanto por mRNA como por un fuerte inductor de silenciamiento como dsRNA. En ambos casos se observó una capacidad muy eficiente y duradera de suprimir el silenciamiento génico a nivel local de forma que hasta al menos a 25 días post-infiltración (dpi) tanto la fluorescencia como los niveles de mRNA de GFP fueron

claramente observables. Un resultado similar se ha descrito para la actividad supresora de la proteína p22 de un aislado de ToCV de Grecia aunque con una aproximación experimental diferente (Kataya *et al.*, 2009). Este aislado, como hemos comentado, aunque se agrupa con los de tipo II, se encuentra en una rama totalmente separada de la que incluye a los aislados españoles. Parece, por tanto, que la presencia de un supresor de silenciamiento con esta actividad supresora fuerte y de larga duración es una característica conservada entre los aislados de ToCV, y podría indicar que esta actividad es importante para el ciclo de vida del virus.

La confirmación de que la actividad supresora de larga duración de p22 parece ser importante para ToCV, hizo que consideráramos de especial interés conocer el mecanismo de acción responsable de la misma. En este sentido y dado que la compleja estrategia de expresión de este grupo de virus genera grandes cantidades de dsRNA viral, la molécula inductora del silenciamiento, y que la unión a dsRNAs es una estrategia frecuentemente usada por proteínas supresoras de silenciamiento (Mérai *et al.*, 2006), nuestro primer abordaje consistió en estudiar si p22 presentaba propiedades de unión a dsRNAs, y si esta propiedad podíamos correlacionarla con su actividad supresora de silenciamiento. Los ensayos de unión *in vitro* mostraron que p22 mostraba una alta afinidad por moléculas de dsRNA de tamaño largo, mientras que, en nuestras condiciones, no fue capaz de unir dúplex de RNAs pequeños (sRNAs). Por tanto, aunque no podemos descartar por completo que p22 una sRNAs, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que, para la actividad supresora de p22, es más relevante la unión a dsRNAs de tamaño largo, ya que en los ensayos de coinfiltración con GFP, la presencia de p22, incluso a prologados tiempos post-infiltración, estaba siempre asociada a bajos niveles de acumulación de sRNAs, lo que parecía indicar que su biogénesis estaba afectada (Cañizares *et al.*, 2008). Para confirmar si la unión a dsRNAs de tamaño largo, interfería en la generación de sRNAs, se realizó un ensayo de corte *in vitro* con Dicer. Los resultados de este ensayo mostraron que el complejo de unión p22-dsRNA de tamaño largo, inhibía la acción de corte de Dicer, interfiriendo por tanto en la generación de sRNAs. Curiosamente, aunque esta estrategia de supresión del silenciamiento ha sido descrita frecuentemente para virus de insectos y mamíferos (Chao *et al.*, 2005; Lingel *et al.*, 2005; Fenner *et al.*, 2006; van Rij *et al.*, 2006; Kimberlin *et al.*, 2010; Qi *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2015), en pocas ocasiones ha sido asociada a virus de plantas. De hecho, sólo ha sido descrita en el caso de la proteína NSs

del miembro de la familia *Bunyaviridae*, *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), y en el caso de las proteínas CP y p14 de *Turnip crinkle virus* (TCV) y *Pothos latent virus* (PoLV), respectivamente (Mériai *et al.*, 2005, 2006), ambos miembros de la familia *Tombusviridae*. Además de los ensayos de unión a dsRNAs, también realizamos ensayos de unión a RNAs de cadena sencilla (ssRNAs), ss- y dsDNAs que mostraron que p22 unía también de un modo muy eficiente ssRNAs de tamaño largo. Por tanto, tal y como ha sido propuesto para la proteína supresora N de coronavirus (Cui *et al.*, 2015), podemos especular que la capacidad que muestra p22 de unir tanto ssRNA como dsRNA podría proteger el RNA viral de dos maneras: i) uniendo ssRNA viral para prevenir la formación innecesaria de dsRNAs intra e intermoleculares entre cadenas positivas y negativas de RNAs genómicos o subgenómicos; y ii) uniendo dsRNAs derivados del virus para protegerlos de la acción de Dicer. Nos interesamos también en intentar localizar el dominio de p22 implicado en unión a dsRNA y en supresión de silenciamiento. El análisis de la secuencia de p22 mostró la existencia de un dominio en dedo de zinc en la región amino terminal similar al descrito en el supresor p23 de *Citrus tristeza virus* (CTV) que está implicado en unión a RNA (López *et al.*, 2000), y en el control de la síntesis asimétrica de cadenas de RNA de polaridad positiva y negativa (Satyanaraya *et al.*, 2002b). Es interesante indicar que aunque p23 de CTV no presenta homología con las proteínas de otros closterovirus (Lu *et al.*, 2004), el motivo en dedo de zinc es prácticamente idéntico al encontrado en p22. Así, en p23 este dominio es del tipo CX₂CX₃HX₉C, y en p22 es CX₂CX₃CX₉C. Además de este hecho, el que ciertos supresores requieran un dominio funcional en dedo de zinc para poder ejercer su actividad supresora (Chiba *et al.*, 2013), sugería que este dominio en p22 podía ser el importante. Con el mutante creado en este dominio, se realizaron ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* para conocer si estaba implicado en unión a dsRNA y en supresión del silenciamiento. Nuestros resultados mostraron, que a diferencia de lo observado para la p23 de CTV, donde modificaciones en este dominio afectaban a la interacción con el RNA, el putativo dominio de zinc encontrado en p22 parecía ser dispensable para la unión a dsRNA. Por otra parte, aunque la actividad supresora de silenciamiento de las proteínas mutadas parecía no ser tan duradera como la de la proteína p22 silvestre, el análisis de los niveles de expresión mostró que en el caso de la construcción mutante estos niveles eran claramente más bajos que los de la construcción de la proteína silvestre. Aunque no tenemos una explicación para este hecho, vemos que, aunque con bajos niveles de expresión, la proteína mantiene sus propiedades de

supresión del silenciamiento. Por tanto, estos resultados indicaban que el putativo dedo de zinc de p22, en el caso de ToCV, es dispensable tanto para la unión a dsRNAs de tamaño largo *in vitro* como para su actividad supresora *in vivo*. Estos resultados *in vitro* se correlacionaron con los obtenidos en ensayos de supresión de silenciamiento inducidos por construcciones en horquilla *in planta*. Así, el comportamiento diferencial del supresor p19 de TBSV, que actúa después de la generación de sRNAs, con el del supresor p22 de ToCV en dichos ensayos a prologados tiempos post-infiltración, mostró que sólo en el caso de p22 se producía una supresión efectiva, mientras que p19 no fue capaz de suprimir el silenciamiento a este prolongado tiempo post-infiltración. Ya que en la ruta de silenciamiento por RNA inducida por estructuras en horquilla se requiere el procesamiento *de novo* por Dicer para producir sRNAs, el hecho de que p22 fuera capaz de suprimir el silenciamiento a 12 dpi, indicaba que podía estar inhibiendo este paso, probablemente mediante el secuestro del dsRNA precursor sobre el que debería actuar Dicer. Estos resultados están en consonancia con resultados previos obtenidos, donde en ensayos de coinfiltración con GFP, la presencia de p22, incluso a 25 dpi, estaba siempre asociada a la presencia de unos reducidos niveles de acumulación de sRNAs de GFP (Cañizares *et al.*, 2008).

Aunque el uso de ensayos de unión *in vitro* y sistemas heterólogos de expresión transitoria para inferir el mecanismo de acción de ciertos supresores virales ha sido recientemente cuestionado (Incarbone y Dunoyer, 2013), pensamos que el uso de estas metodologías indirectas son una herramienta que puede ser de gran utilidad en el estudio de las interacciones virus-planta. Una de las argumentaciones en contra del uso de estas metodologías es que las proteínas supresores de silenciamiento virales frecuentemente son proteínas multifuncionales que cumplen otros papeles esenciales en el ciclo de vida del virus para lo que necesitan asociarse con los ácidos nucleicos virales, sugiriendo que la unión *in vitro* observada pudiera no tener relación con supresión de silenciamiento. En el caso de p22, sin embargo, este argumento puede no ser válido, ya que su función parece ser únicamente la de suprimir el silenciamiento en el genoma de ToCV (Cañizares *et al.*, 2008). Entre las propiedades de unión a dsRNA descritas para ciertos supresores que ha sido cuestionada, encontramos la descrita para la proteína CP de TCV, en concreto desde que se ha propuesto un nuevo mecanismo de acción por el que supresores que contienen repeticiones aminoacídicas del tipo glicina/triptófano (GW), entre los que se encuentran la CP de TCV, pueden competir

con proteínas celulares que intervienen en el funcionamiento de RISC, e interferir con el mismo (Azevedo *et al.*, 2010). Estudios recientes, sin embargo, han mostrado que los motivos GW también son importantes para la unión a dsRNA, tanto en el caso de la CP de TCV, como en el caso de la proteína supresora p37 de *Pelargonium line pattern virus* (familia *Tombusviridae*), donde además es un requerimiento imprescindible en supresión del silenciamiento (Pérez-Cañamás y Hernández, 2015). Por tanto, las propiedades de unión a dsRNA mostrada por varias proteínas virales que actúan como supresoras parece no ser artefactual sino importante para su función supresora. De este modo, en el caso de p22, la interferencia en el corte del dsRNA precursor por medio de la unión al mismo parece ser para ToCV un modo muy eficiente de suprimir el silenciamiento y por tanto de conseguir una infección productiva en planta.

Una vez conocido el mecanismo de acción de p22 fuera de su contexto viral, se estudió su papel durante el ciclo de infección viral, donde como supresor debería tener un papel importante contrarrestando una respuesta defensiva de la planta basada en el silenciamiento por RNA. Para ello, en primer lugar nuestro interés se centró en conocer si uno de los componentes de la cascada del silenciamiento por RNA frecuentemente implicado en defensa antiviral, la RNA polimerasa dependiente de RNA 6 (RDR6), también tenía un papel frente a la infección por ToCV. Para ello, hicimos uso de plantas de *N. benthamiana* defectivas para la expresión de RDR6 (RDR6i) (Schwach *et al.*, 2005), mediante ensayos de inoculación mediados por su vector natural, la mosca blanca. El mayor nivel de acumulación de ToCV observado en plantas RDR6i, comparado con el de plantas silvestres, indicaba que RDR6 estaba implicado en la respuesta de defensa frente a este virus. Para conocer si durante el proceso de infección viral, p22 tenía algún papel frente a este componente de la cascada de silenciamiento, se hizo uso del clon infeccioso de ToCV (Orlío *et al.*, 2014) para la obtención de un mutante de delección de p22 (ToCV Δ p22). Con este mutante se realizaron estudios de infección tanto a nivel local como sistémico en plantas de *N. benthamiana* silvestres y RDR6i. Los ensayos a nivel local mostraron que la ausencia de p22, además de no afectar a la replicación del RNA1, provocaba una desregulación del ratio de cadenas positivas y negativas, aumentando estas últimas, no teniendo RDR6 ningún efecto apreciable a este nivel. De igual modo, la ausencia del supresor p23 localizado en el extremo 3' del genoma de CTV estaba asociado con un incremento sustancial de la acumulación de cadenas negativas de RNAs, especialmente los que correspondían a

sgRNAs (Satyanarayana *et al.*, 2002a). Aparentemente, en CTV el incremento en la acumulación de cadenas negativas de sgRNAs reducía la disponibilidad como mensajero del correspondiente sgRNA de polaridad positiva. En el caso de ToCV, en ausencia de p22 el incremento de la acumulación de cadenas negativas correspondientes al RNA1, que podría resultar en un incremento en los niveles de acumulación de cadenas positivas a partir de las cuales las proteínas requeridas para la replicación podrían traducirse, no se correlaciona con un incremento en los niveles de acumulación del RNA2. Podemos hipotetizar que, como ha sido descrito para CTV, el incremento en cadenas negativas cuando p22 no está presente afecta la disponibilidad de las cadenas positivas como mensajeros, dando como resultado una reducción de los productos traducidos a partir del RNA1, donde está codificada la replicasa. Alternativamente, ya que la replicación del RNA2 está retrasada comparada con la del RNA1 (Orilio *et al.*, 2014), la ausencia de p22 podría hacer que el molde de RNA2 estuviera protegido menos eficientemente de la degradación, y aún habiendo una mayor acumulación de RNA1 y por tanto de replicasa disponible, esto no se tradujera en un incremento de la replicación del RNA2. Por otra parte, los estudios a nivel sistémico mostraron que, aunque el mutante ToCV Δ p22 tenía reducida la capacidad de infectar sistémicamente plantas de *N. benthamiana* silvestres, esta capacidad se vio rescatada en plantas RDR6i. Por tanto, estos resultados indicaban que el supresor p22 parece ser importante para que ToCV pueda llevar a cabo de forma exitosa una infección sistémica en planta, contrarrestando una respuesta antiviral mediada por RDR6. Estos resultados conjuntamente con los obtenidos cuando p22 fue aislada de su contexto viral, y que mostraban que p22 unía preferentemente dsRNAs de tamaño largo, nos ha permitido proponer un modelo para explicar la confrontación RDR6-p22 durante una infección por ToCV. Así, después de la inducción del silenciamiento antiviral en los tejidos receptores, se sintetizará nuevo dsRNA por mediación de RDR6 que será procesado en vsRNAs secundarios que tendrán como diana el RNA viral para su degradación. Cuando ToCV produce p22, esta proteína se uniría a los dsRNAs de tamaño largo generados por RDR6, inhibiendo de este modo la acción de corte de Dicer en vsRNAs, interfiriendo de este modo con la progresión del proceso de silenciamiento. Cuando p22 está ausente, el virus es silenciado más eficientemente, ya que RDR6 genera dsRNAs de tamaño largo que son procesados en vsRNAs que tendrán como diana el virus, impidiendo la dispersión sistémica del mismo. En plantas RDR6i en las que RDR6 está

silenciado constitutivamente, ToCV Δ p22 puede recuperar su capacidad de infectar eficientemente la planta.

Por último, y ya que proteínas con actividad supresora están asociadas frecuentemente a interacciones de tipo sinérgico, el último objetivo de esta tesis consistió en estudiar el papel de p22 cuando era expresado de forma heteróloga a partir de los virus *Tobacco rattle virus* (TRV) y *Potato virus X* (PVX), en plantas de *N. benthamiana*. Aunque previamente se había descrito el efecto sinérgico de p22 cuando era expresado a partir de PVX, este estudio sólo consistió en la observación del incremento de la sintomatología (Cañizares *et al.*, 2008). Así, en este trabajo para poder tener una visión completa del papel de p22 en estos dos sistemas heterólogos, se expresó p22 tanto en las versiones silvestres de los virus como en las versiones mutadas para los supresores de silenciamiento 16K en el caso de TRV (TRV Δ 16K), y p25 en el caso de PVX (PVX Δ P25). La expresión de p22 a partir de TRV resultó en una fuerte interacción sinérgica consistente en un aumento de la agresividad y de la acumulación viral, que conducía a la muerte de la planta. Este aumento de la patogenicidad no estaba asociado, sin embargo, a una dispersión sistémica más eficiente del virus. El que la expresión de p22 resultara en un aumento de los niveles de acumulación de TRV, parecía indicar que el efecto sinérgico observado podría ser en parte debido a la acción combinada de diferentes supresores en múltiples pasos de la ruta de silenciamiento por RNA (MacDiarmid, 2005; Pruss *et al.*, 1997). Esta interacción podría contribuir a contrarrestar de un modo más eficiente una respuesta antiviral basada en el silenciamiento por RNA en planta, que podría resultar en el observado incremento de los niveles de acumulación viral. Así, el supresor 16K de TRV ha sido descrito como un supresor relativamente débil que suprime de un modo eficiente el silenciamiento por RNA sólo si los niveles de acumulación del dsRNA inductor son bajos (Martínez-Priego *et al.*, 2008). Ya que la actividad de este supresor sería sobrepasada cuando el inductor de dsRNA se acumulara, la presencia de p22, que actúa uniendo dsRNA de tamaño largo, parece constituir un apoyo idóneo en esta acción combinada. El que este aumento en los niveles de acumulación viral no vaya acompañado de una dispersión sistémica más rápida, podría ser debido a que el virus quimérico contiene una secuencia extra que podría estar afectando a esa dispersión. Por otra parte, aunque la presencia de p22 resultó en ese acusado efecto sinérgico cuando el supresor 16K de TRV estaba presente, no fue capaz de complementar funcionalmente al virus mutante deficiente en

la expresión del supresor 16K, como indicaban la suave sintomatología observada, la ausencia de incremento en los niveles de acumulación viral, o la lenta dispersión. Por el contrario, la expresión heteróloga de las proteínas supresoras 2b del cucumovirus *Cucumber mosaic virus* (CMV), 12K del tobnavirus *Pea early browning virus* (PEBV), 19K del furovirus *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV), y γ b del hordeivirus *Barley stripe mosaic virus* (BSMV), a partir de un mutante de TRV deficiente en la expresión de 16K, fueron capaces de compensar la ausencia de este supresor del virus (Liu *et al.*, 2002). Aunque, como se ha comentado anteriormente, el mecanismo de acción de p22 puede complementar la actividad del supresor 16K, probablemente otros factores son también importantes para que se pueda producir una intercambiabilidad funcional. De hecho, el que las proteínas 12K de PEBV, 19K de SBWMV, γ b de BSMV y 16K de TRV hayan sido clasificadas como ricas en cisteína, podría indicar que es importante tanto poseer una similaridad estructural como funcional para poder ser intercambiables. Esta conservación/complementación de acción, podría por ejemplo estar asociada a una cierta distribución subcelular, que podría ser necesaria para realizar una función. Por otra parte, aunque la proteína 29K codificada por TRV ha sido descrita como un supresor de silenciamiento además de la proteína 16K (Deng *et al.*, 2013), nuestros resultados en plantas infectadas con el virus recombinante mutante TRV Δ 16Kp22 parecen indicar que no existe una interacción sinérgica cuando las proteínas 29K y p22 son expresadas simultáneamente en TRV. Por otra parte, en el caso de la expresión heteróloga de p22 a partir de PVX, se produjo una acentuación de la sintomatología que derivaba en necrosis sistémica y acababa matando a la planta a 10-12 dpi. No se observaron, sin embargo, diferencias en los niveles de acumulación viral. Resultados similares han sido obtenidos en plantas de *N. benthamiana* infectada con PVX o PVX que expresa el supresor de silenciamiento HCPro de *Potato virus Y* (PVY) o *Tobacco etch virus* (TEV) (Pruss *et al.*, 1997; González-Jara *et al.*, 2005). El argumento empleado para explicar este hecho fue que el mantenimiento de los niveles de acumulación viral de PVX en *N. benthamiana* durante una interacción sinérgica podrían ser debidos a la existencia de un umbral de acumulación viral que no puede ser superado en este huésped, a pesar de que se produzca una inhibición de la respuesta antiviral por el supresor HCPro (González-Jara *et al.*, 2005). Por tanto, ya que el aumento de la patogenicidad asociada a la expresión heteróloga del supresor p22 a partir de PVX no parece ser consecuencia de una más eficiente acumulación viral, otros mecanismos deben estar implicados en la inducción del sinergismo. Resultados

recientes indican que la combinación de PVX con diferentes supresores virales capaces de inducir una respuesta necrótica sistémica en *N. benthamiana* no tiene ningún efecto en los niveles de acumulación del RNA genómico de PVX pero sí en los de RNAs subgenómicos, aumentándolos y/o estabilizándolos (Aguilar *et al.*, 2015). Aunque en nuestro caso no apreciamos un aumento evidente de los niveles de acumulación de los RNAs subgenómicos, hay que tener en cuenta que éstos son de mayor tamaño al tener incluida la secuencia correspondiente a p22. Así, estos autores proponen que la necrosis sistémica observada durante los sinergismos asociados a PVX es una respuesta sistémica de tipo hipersensible (HR) retrasada disparada por p25 una vez que ha alcanzado un nivel umbral como consecuencia de la acción del supresor de silenciamiento heterólogo (Aguilar *et al.*, 2015). Se ha sugerido que *Nicotiana spp.* podría ser portador de un gen R que podría reconocer específicamente a p25 y disparar la HR, donde la actividad supresora de p25 es necesaria. Basado en este modelo, podemos hipotetizar que la expresión heteróloga del supresor p22 podría ayudar a que p25 alcanzara un nivel umbral de expresión, probablemente mediante estabilización de los RNAs subgenómicos, disparándose de este modo una HR que resultaría en un drástico aumento de los síntomas necróticos y que llevaría a la muerte de la planta en un corto período de tiempo. De igual modo a lo observado para TRV, la expresión de p22 no fue capaz de compensar la falta del supresor p25 en el mutante PVX. Además, la expresión de p22 por el virus mutante defectivo en supresión parece limitar la dispersión del virus, probablemente debido al efecto debilitante de la inserción extra.

CONCLUSIONES





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. La proteína p22 de *Tomato chlorosis virus* (ToCV) de aislados de tomate y pimiento recolectados en epidemias españolas, muestra un alto grado de conservación en secuencia de aminoácidos donde la poca variabilidad observada se concentra en su extremo carboxilo terminal.
2. A pesar del alto grado de conservación, las proteínas p22 de los aislados españoles de ToCV muestran una clara diferenciación en dos grupos filogenéticos denominados Tipo I y Tipo II.
3. No se observa diferencia en la actividad supresora de silenciamiento de las proteínas p22 pertenecientes a los dos grupos filogenéticos descritos, que muestra una larga duración en ambos casos.
4. En ensayos *in vitro*, p22 une con gran afinidad RNAs de cadena sencilla (ssRNA) o de cadena doble (dsRNA) de tamaño largo, no presentando propiedades de unión a RNAs de tamaño pequeño (sRNAs), ni a DNA de cadena sencilla o doble.
5. p22 interfiere con la acción de corte de Dicer, al unirse y secuestrar el dsRNA precursor, inhibiéndose de este modo la generación de sRNAs.
6. El dominio en dedo de zinc de p22 no parece estar implicado en la unión a dsRNA *in vitro*, ni en la supresión de silenciamiento *in vivo*.
7. p22 se comporta de un modo diferente al supresor p19 en ensayos de supresión de silenciamiento inducidos por horquilla *in planta* a prolongados tiempos post-infiltración. Así, mientras que en presencia de p19 (supresor que actúa después de la generación de sRNAs), el proceso de silenciamiento se desencadena de un modo eficiente, en presencia de p22 éste no procede.
8. RDR6 está implicado en la respuesta de defensa de la planta frente a ToCV.
9. p22 es dispensable para la replicación del RNA1 de ToCV, pero en su ausencia se desregula el ratio de cadenas positivas y negativas del virus, incrementándose la acumulación de estas últimas.
10. El incremento de intermediarios replicativos en ausencia de p22 que podría resultar en un incremento de los niveles de acumulación de cadenas positivas a partir de las cuales podrían traducirse las proteínas implicadas en

replicación, no se correlaciona con un incremento en los niveles de acumulación del RNA2.

11. El mutante de delección de p22 de ToCV tiene una reducida capacidad de infectar sistémicamente plantas de *N. benthamiana* silvestres que es rescatada en plantas defectivas para la expresión de RDR6.
12. p22 determina un fuerte sinergismo en la expresión de síntomas en plantas de *N. benthamiana* cuando se expresa a partir de los virus heterólogos *Tobacco rattle virus* (TRV) y *Potato virus X* (PVX) que, aunque en ambos casos conduce a la muerte de la planta, sólo en TRV va acompañado de un aumento en los niveles de acumulación viral.
13. La expresión heteróloga de p22 no es capaz de complementar funcionalmente a mutantes de TRV y PVX deficientes en la expresión de los supresores de silenciamiento 16K o p25, respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

- Agranovsky, A.A., 1996. Principles of molecular organization, expression, and evolution of closteroviruses: Over the barriers. *Advances in Virus Research* 47, 119-158.
- Agranovsky, A.A., Boyko, V.P., Karasev, A.V., Koonin, E.V., Dolja, V.V., 1991. Putative 65 kDa protein of beet yellows closterovirus is a homologue of HSP70 heat shock proteins. *Journal of Molecular Biology* 217, 603-610.
- Agranovsky, A.A., Koonin, E.V., Boyko, V.P., Maiss, E., Frötschl, R., Lunina, N.A., Atabekov, J.G., 1994. Beet yellows closterovirus: complete genome structure and identification of a leader papain-like thiol protease. *Virology* 198, 311-324.
- Agranovsky, A.A., Lesemann, D.E., Maiss, E., Hull, R., Atabekov, J.G., 1995. "Rattlesnake" structure of a filamentous plant RNA virus built of two capsid proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 2470-2473.
- Aguilar, E., Almendral, D., Allende, L., Pacheco, R., Chung, B.N., Canto, T., Tenllado, F., 2015. The P25 protein of *Potato virus X* (PVX) is the main pathogenicity determinant responsible for systemic necrosis in PVX-associated synergisms. *Journal of Virology* 89, 2090-2103.
- Aguilar, J.M., Franco, M., Marco, C.F., Berdiales, B., Rodríguez-Cerezo, E., Truniger, V., Aranda, M.A., 2003. Further variability within the genus *Crinivirus*, as revealed by determination of the complete RNA genome sequence of *Cucurbit yellow stunting disorder virus*. *Journal of General Virology* 84, 2555-2564.
- Ahn, J.W., Yin, C.J., Liu, J.R., Jeong, W.J., 2010. *Cucumber mosaic virus* 2b protein inhibits RNA silencing pathways in green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Report* 29, 967-975.
- Al Rwahnih, M., Dolja, V.V., Daubert, S., Koonin, E.V., Rowhani, A., 2012. Genomic and biological analysis of *Grapevine leafroll-associated virus 7* reveals a possible new genus within the family *Closteroviridae*. *Virus Research* 163, 302-309.
- Alazem, M., Lin, K.Y., Lin, N.S., 2014. The abscisic acid pathway has multifaceted effects on the accumulation of *Bamboo mosaic virus*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 27, 177-189.
- Albuquerque, L.C., Villanueva, F., Resende, R.O., Navas-Castillo, J., Barbosa, J.C., Inoue-Nagata, A.K., 2013. Molecular characterization reveals Brazilian *Tomato chlorosis virus* to be closely related to a Greek isolate. *Tropical Plant Pathology* 38, 332-336.

- Ali, S.S., Gunupuru, L.R., Kumar, G.B., Khan, M., Scofield, S., Nicholson, P., Doohan, F.M., 2014. Plant disease resistance is augmented in uzu barley lines modified in the brassinosteroid receptor BRI1. *BMC Plant Biology* 14, 227.
- Alzhanova, D.V., Hagiwara, Y., Peremyslov, V.V., Dolja, V.V., 2000. Genetic analysis of the cell-to-cell movement of beet yellows closterovirus. *Virology* 268, 192-200.
- Alzhanova, D.V., Napuli, A.J., Creamer, R., Dolja, V.V., 2001. Cell-to-cell movement and assembly of a plant closterovirus: roles for the capsid proteins and Hsp70 homolog. *EMBO Journal* 20, 6997-7007.
- Alzhanova, D.V., Prokhnevsky, A.I., Peremyslov, V.V., Dolja, V.V., 2007. Virion tails of *Beet yellows virus*: coordinated assembly by three structural proteins. *Virology* 359, 220-226.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Smith, T.H., Vance, V.B., 1998. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 13079-13084.
- Andika, I.B., Kondo, H., Nishiguchi, M., Tamada, T., 2012. The cysteine-rich proteins of *Beet necrotic yellow vein virus* and *Tobacco rattle virus* contribute to efficient suppression of silencing in roots. *Journal of General Virology* 93, 1841-1850.
- Ángel, C.A., Schoelz, J.E., 2013. A survey of resistance to *Tomato bushy stunt virus* in the genus *Nicotiana* reveals that the hypersensitive response is triggered by one of three different viral proteins. *Molecular Plant Microbe Interactions* 26, 240-248.
- Asaoka, R., Shimura, H., Arai, M., Masuta, C., 2010. A progeny virus from a cucumovirus pseudorecombinant evolved to gain the ability to accumulate its RNA silencing suppressor leading to systemic infection in tobacco. *Molecular Plant Microbe Interactions* 23, 332-339.
- Ayllón, M.A., Gowda, S., Satyanarayana, T., Karasev, A.V., Adkins, S., Mawassi, M., Guerri, J., Moreno, P., Dawson, W.O., 2003. Effects of modification of the transcription initiation site context on *Citrus tristeza virus* subgenomic RNA synthesis. *Journal of Virology* 77, 9232-9243.
- Azevedo, J., García, D., Pontier, D., Ohnesorge, S., García, S., Braun, L., Bergdoll, M., Hakimi, M.A., Lagrange, T., Voinnet, O., 2010. Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes & Development* 24, 904-915.
- Bai, S., Liu, J., Chang, C., Zhang, L., Maekawa, T., Wang, Q., Xiao, W., Liu, Y., Chai, J., Takken, F.L.W., Schulze-Lefert, P., Shen, Q.H., 2012. Structure-function

- analysis of barley NLR immune receptor MLA10 reveals its cell compartment specific activity in cell death and disease resistance. *PLoS Pathogens* 8, e1002752.
- Barbosa, J.C., Teixeira, L.D.D., Rezende, J.A.M., 2010. First report on the susceptibility of sweet pepper crops to *Tomato chlorosis virus* in Brazil. *Plant Disease* 94, 374.
- Baulcombe, D., 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356–63.
- Baumberger, N., Tsai, C.H., Lie, M., Havecker, E., Baulcombe, D., 2007. The Ploverovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Current Biology* 17, 1609–1614.
- Bayne, E.H., Rakitina, D.V., Morozov, S.Y., Baulcombe, D., 2005. Cell-to-cell movement of *Potato petexvirus X* is dependent on suppression of RNA silencing. *Plant Journal* 44, 471-482.
- Bendahmane, A., Kanyuka, K., Baulcombe, D.C., 1999. The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* 11, 781-792.
- Blevins, T., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P.V., Beknazariants, D., Si-Ammour, A., Park, H.S., Vazquez, F., Robertson, D., Meins, F., Jr., Hohn, T., Pooggin, M.M., 2006. Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Research* 34, 6233-6246.
- Boorstein, W.R., Ziegelhoffer, T., Craig, E.A., 1994. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *Journal of Molecular Evolution* 38, 1-17.
- Bortolamiol, D., Pazhouhandeh, M., Marrocco, K., Genschik, P., Ziegler-Graff, V., 2007. The Ploverovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Current Biology* 17, 1615–1621.
- Boutet S, Vazquez F, Liu J, Beclin C, Fagard M, Gratias, A., Morel, J.B., Crete, P., Chen, X., Vaucheret, H., 2003. *Arabidopsis* HEN1: a genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance. *Current Biology* 13, 843–48.
- Boyko, V.P., Karasev, A.V., Agranovsky, A.A., Koonin, E.V., Dolja, V.V., 1992. Capsid protein gene duplication in a filamentous virus of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 9156-9160.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L.H., Ding, S.W., Baulcombe, D., 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO Journal* 17, 6739–6746.

- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y.Y., Sieburth, L., Voinnet, O., 2008. Widespread translation inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320, 1185-1190.
- Brosseau, C., Moffett, P., 2015. Functional and genetic analysis identify a role for *Arabidopsis* ARGONAUTE5 in antiviral RNA silencing. *Plant Cell* 27, 1742-1754.
- Buck, K. W. 1996. Comparison of the replication of positive-stranded RNA viruses of plants and animals. *Advances in Virus Research* 47, 159–251.
- Burgyán, J., Havelda, Z., 2011. Viral suppressors of RNA silencing. *Trends in Plant Science* 15, 265-272.
- Canto, T., Cillo, F., Palukaitis, P., 2002. Generation of siRNAs by T-DNA sequences does not require active transcription or homology to sequences in the plant. *Molecular Plant Microbe Interactions* 15, 1137-1146.
- Cañizares, M.C., Lozano-Durán, R., Canto, T., Bejarano, E.R., Bisaro, D.M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., 2013. Effects of the crinivirus coat protein-interacting plant protein SAHH on post-transcriptional RNA silencing and its suppression. *Molecular Plant Microbe Interactions* 26, 1004-1015.
- Cañizares, M.C., Navas-Castillo, J., Moriones, E., 2008. Multiple suppressors of RNA silencing encoded by both genomic RNAs of the crinivirus, *Tomato chlorosis virus*. *Virology* 379, 168-174.
- Cañizares, M.C., Taylor, K.M., Lomonosoff, G.O., 2004. Surface-exposed C-terminal amino acid of the small coat protein of *Cowpea mosaic virus* are required for suppression of silencing. *Journal of General Virology* 85, 3431-3435.
- Cao, X., Jacobsen, S.E., 2002. Role of the *Arabidopsis* DRM methyltransferases in *de novo* DNA methylation and gene silencing. *Current Biology* 12, 1138-1144.
- Carr, J.P., Lewsey, M.G., Palukaitis, P., 2010. Signaling in induced resistance. *Advances in Virus Research* 76, 57-121.
- Carrington, J.C., Ambros, V., 2003. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 301, 336-338.
- Chao, J.A., Lee, J.H., Chapados, B.R., Debler, E.W., Schneemann, A., Williamson, J.R., 2005. Dual modes of RNA-silencing suppression by *Flock House virus* protein B2. *Nature Structural & Molecular Biology* 12, 952-957.
- Chapman, E.J., Prokhnevsky, A.L., Gopinath, K., Valerian, V.D., Carrington, J.C., 2004. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes & Developmental* 18, 1179-1186.

- Che, X., Piestun, D., Mawassi, M., Yang, G., Satyanarayana, T., Gowda, S., Dawson W.O., Bar-Joseph, M., 2001. 5'-coterminally subgenomic RNAs in *Citrus tristeza virus*-infected cells. *Virology* 283, 374-381.
- Chellappan, P., Vanitharani, R., Fauquet, C.M., 2004. Short interfering RNA accumulation correlates with host recovery in DNA virus-infected hosts, and gene silencing targets specific viral sequences. *Journal of Virology* 78, 7465-7477.
- Chellappan, P., Vanitharani, R., Fauquet, C.M., 2005. MicroRNA-binding viral protein interfere with *Arabidopsis* development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 10381-10386.
- Chen, A.Y., Pavitrin, A., Ng, J.C., 2012. Agroinoculation of the cloned infectious cDNAs of *Lettuce chlorosis virus* results in systemic plant infection and production of whitefly transmissible virions. *Virus Research* 169, 310-315.
- Chen, H.Y., Yang, J., Lin, C., Yuan, Y.A., 2008. Structural basis for RNA-silencing suppression by *Tomato aspermy virus* protein 2b. *EMBO Reports* 9, 754-760.
- Chen, J., Li, W.X., Xie, D., Peng, J.R., Ding, S.W., 2004. Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but upregulates the role of microRNA in host gene expression. *Plant Cell* 16, 1302-1313.
- Chen, L., Zhang, L., Li, D., Wang, F., Yu, D., 2013. WRKY8 transcription factor functions in the TMV-cg defense response by mediating both abscisic acid and ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, E1963-E1971.
- Cheng, J., Koukiekolo, R., Kieliszewicz, K., Sagan, S.M., Pezacki, J.P., 2009. Cysteine residues of *Carnation italian ringspot virus* p19 suppressor of RNA silencing maintain global structural integrity and stability for siRNA binding. *Biochimica et Biophysica Acta* 1794, 1197-1203.
- Cheng, Y.Q., Liu, Z.M., Xu, J., Zhou, T., Wang, M., Chen, Y.T., Li, H.F., Fan, Z.F., 2008. HC-Pro protein of *Sugar cane mosaic virus* interacts specifically with maize ferredoxin-5 in vitro and in planta. *Journal of General Virology* 89, 2046-2054.
- Chiba, M., Reed, J.C., Prokhnovsky, A.I., Chapman, E.J., Mawassi, M., Koonin, E.V., Carrington, J.C., Dolja, V.V., 2006. Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replicon. *Virology* 346, 7-14.
- Chiba, S., Hleibieh, K., Delbianco, A., Klein, E., Ratti, C., Ziegler-Graff, V., Bouzoubaa, S., Gilmer, D., 2013. The benyvirus RNA silencing suppressor is essential for long distance movement, requires both zinc-finger and NoLS

- basic residues but not a nucleolar localization for its silencing suppression activity. *Molecular Plant Microbe Interactions* 26, 168-181.
- Chiu, M.H., Chen, I.H., Baulcombe, D., Tsai, C.H., 2010. The silencing suppressor P25 of *Potato virus X* interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Molecular Plant Pathology* 11, 641-649.
- Chu, M., Desvoyes, B., Turina, M., Noad, R., Scholthof, H.B., 2000. Genetic dissection of *Tomato bushy stunt virus* p19-protein-mediated host-dependent symptom induction and systemic invasion. *Virology* 266, 79-87.
- Chung, H.Y., Lacatus, G., Sunter, G., 2014. Geminivirus AL2 protein induces expression of, and interacts with, a calmodulin-like gene, an endogenous regulator of gene silencing. *Virology* 460-461, 108-118.
- Csorba, T., Bovi, A., Dalmay, T., Burgyán, J., 2007. The p122 subunit of *Tobacco mosaic virus* replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA- and microRNA-mediated pathways. *Journal of Virology* 81, 11768–11780.
- Csorba, T., Kontra, L., Burgyan, J., 2015. Viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology* 479-480, 85-103.
- Csorba, T., Lózsa, R., Hutvágner, G., Burgyán, J., 2010. Ploverovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1. *Plant Journal* 62, 463–472.
- Cuellar, W.J., Kreuze, J.F., Rajamäki, M.L., Cruzado, K.R., Untiveros, M., Valkonen, J.P.T., 2009. Elimination of antiviral defense by viral RNase III. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 10354–10358.
- Cuellar, W.J., Tairo, F., Kreuze, J.F., Valkonen, J.P.T., 2008. Analysis of gene content in *Sweet potato chlorotic stunt virus* RNA1 reveals the presence of the p22 RNA silencing suppressor in only a few isolates: implications for viral evolution and synergism. *Journal of General Virology* 89, 573-582.
- Cui, L., Wang, H., Ji, Y., Yang, J., Xu, S., Huang, X., Wang, Z., Qin, L., Tien, P., Zhou, X., Guo, D., Chen, Y., 2015. The nucleocapsid protein of coronaviruses acts as a viral suppressor of RNA silencing in mammalian cells. *Journal of Virology* 89, 9029-9043.
- Culver, J.N., Padmanabhan, M.S., 2007. Virus-induced disease: altering host physiology one interaction at a time. *Annual Review of Phytopathology* 45, 221-243.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., Baulcombe, D.C., 2000. An RNA-Dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for

- posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101, 543-553.
- Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K.D., Carrington, J., Voinnet, O., 2006. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313, 68–71.
- Delfosse, V.C., Agrofoglio, Y.C., Casse, M.F., Kresic, I.B., Hopp, H.E., Ziegler-Graff, V., Distéfano, A.J., 2014. The P0 protein encoded by *Cotton leafroll dwarf virus* (CLRDV) inhibits local but not systemic RNA silencing. *Virus Research* 180, 70–75.
- Deng, X., Kelloniemi, J., Haikonen, T., Vuorinen, A. L., Elomaa, P., Teeri, T. H., Valkonen, J.P., 2013. Modification of *Tobacco rattle virus* RNA1 to serve as a VIGS vector reveals that the 29K movement protein is an RNA silencing suppressor of the virus. *Molecular Plant Microbe Interactions* 26, 503-514.
- Deng, X.G., Peng, X.J., Zhu, F., Chen, Y.J., Zhu, T., Quin, S.B., Xi, D.H., Lin, H.H., 2015. A critical domain of *Sweet potato chlorotic fleck virus* nucleotide-binding protein (NaBp) for RNA silencing suppression, nuclear localization and viral pathogenesis. *Molecular Plant Pathology* 16, 365-375.
- Díaz-Pendón, J.A., Ding, S.W., 2008. Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 46, 303-326.
- Díaz-Pendón, J.A., Li, F., Li, W.X., Ding, S.W., 2007. Suppression of antiviral silencing by *Cucumber mosaic virus* 2b protein in *Arabidopsis* is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. *Plant Cell* 19, 2053–2063.
- Díaz-Pendón, J.A., Truniger, V., Nieto, C., García-Mas, J., Bendahmane, A., Aranda, M.A., 2004. Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. *Molecular Pathology* 5, 223-233.
- Ding, S.W., Voinnet, O., 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130, 413-426.
- Ding, X.S., Liu, J., Cheng, N.H., Folimonov, A., Hou, Y.M., Bao, Y., Katagi, C., Carter, S.A., 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, 583–592.
- Dolja, V. V. 2003. *Beet yellows virus*: the importance of being different. *Molecular Plant Pathology* 4, 91-98.
- Dolja, V.V., Kreuze, J.F., Valkonen, J.P.T., 2006. Comparative and functional genomics of Closteroviruses. *Virus Research* 117, 38-51.

- Donaire, L., Barajas, D., Martínez-García, B., Martínez-Priego, L., Pagán, I., Llave, C., 2008. Structural and genetic requirements for the biogenesis of *Tobacco rattle virus*-derived small interfering RNAs. *Journal of Virology* 82, 5167–5177.
- Donze, T., Qu, F., Twigg, P., Morris, T.J., 2014. *Turnip crinkle virus* coat protein inhibits the basal immune response to virus invasion in *Arabidopsis* by binding to the NAC transcription factor TIP. *Virology*, 449, 207–214.
- Dreher, T. W. 1999. Functions of the 3'-untranslated regions of positive strand RNA viral genomes. *Annual Review of Phytopathology* 37, 151-174.
- Dreher, T.W., Miller, W.A., 2006. Translational control in positive strand RNA plant viruses. *Virology* 344, 185-197.
- Du, P., Wu, J., Zhang, J., Zhao, S., Zhang, H., Gao, G., Wei, L., Li, Y., 2011. Viral infection induces expression of novel phased microRNAs from conserved cellular microRNA precursor. *PLoS Pathogens* 7, e1002176.
- Du, Z., Chen, A., Chen, W., Liao, Q., Zhang, H., Bao, Y., Roossinck, M.J., Carr, J.P., 2014. Nuclear-cytoplasmic partitioning of *Cucumber mosaic virus* protein 2b determines the balance between its roles as a virulence determinant and an RNA-silencing suppressor. *Journal of Virology* 88, 5228-5241.
- Duan, C.G., Fang, Y.Y., Zhou, B.J., Zhao, J.H., Hou, W.N., Zhu, H., Ding, S.W., Guo, H.S., 2012. Suppression of *Arabidopsis* ARGONAUTE1-mediated slicing, transgene-induced RNA silencing, and DNA methylation by distinct domains of the *Cucumber mosaic virus* 2b protein. *Plant Cell* 24, 259–274.
- Duggal, R., Lahser, F.C., Hall, T.C., 1994. Cis-acting sequences in the replication of plant-viruses with plus-sense RNA genomes. *Annual Review of Phytopathology* 32, 287-309.
- Dunoyer, P., Brosnan, C.A., Schott, G., Wang, Y., Jay, F., Alioua, A., Himber, C., Voinnet, O., 2010. An endogenous, systemic RNAi pathway in plants. *EMBO Journal* 29, 1699–1712.
- Dunoyer, P., Himber, C., Voinnet, O., 2005. DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nature Genetics* 37, 1356–6.
- Dunoyer, P., Lecellier, C.H., Parizotto, E.A., Himber, C., Voinnet, O., 2004. Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell* 16 1235–1250.
- Dunoyer, P., Pfeffer, S., Fritsch, C., Hemmer, O., Voinnet, O., Richards, K.E., 2002. Identification subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by *Peanut clump virus*. *Plant Journal* 29, 555-567.

- Eamens, A.L., Kim, K.W., Curtin, S.J., Waterhouse, P.M., 2012a. DRB2 is required for microRNA biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 7, e35933.
- Eamens, A.L., Wook, Kim, K., Waterhouse, P.M., 2012b. DRB2, DRB3 and DRB5 function in a non-canonical microRNA pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior* 7, 1224–1229.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & Development* 15, 188-200.
- Elena, S.F., 2011. Evolutionary constraints on emergence of plant RNA viruses. In: *Recent Advances in Plant Virology* (Caranta, C., Aranda, M.A., Tepfer, M., López-Moya, J.J., eds), pp. 283–300. Norfolk: Caister Academic Press.
- Endres, M.W., Gregory, B.D., Gao, Z., Foreman, A.W., Mlotshwa, S., Ge, X., Pruss, G.J., Ecker, J.R., Bowman, L.H., Vance, V., 2010. Two plant viral suppressors of silencing require the ethylene-inducible host transcription factor RAV2 to block RNA silencing. *PLoS Pathogens* 6, e1000729.
- English, J.J., Mueller, E., Baulcombe, D.C., 1996. Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *Plant Cell* 8, 179-188.
- Esau, K., 1960. Cytologic and histologic symptoms of beet yellows. *Virology* 10, 73-85.
- Esau, K., Hoefert, LL., 1971. Cytology of *Beet yellows virus* infection in *Tetragonia*. I Parenchyma cells in infected leaf. *Protoplasma* 72, 255-73.
- Febres, V., Ashoulin, L., Mawassi, M., Frank, A., Bar-Joseph, M., Manjunath, K., Lee, R., Niblett, C., 1996. The p27 protein is present at one end of *Citrus tristeza virus* particles. *Phytopathology* 86, 1331-1335.
- Feng, L., Duan, C.G., Guo, H.S., 2013. Inhibition of *in vivo* Slicer activity of Argonaute protein 1 by the viral 2b protein independent of its dsRNA-binding function. *Molecular Plant Pathology* 14, 617–622.
- Fenner, B.J., Gob, W., Kwang, J., 2006. Sequestration and protection of double-stranded RNA by the betanodavirus B2 protein. *Journal of Virology* 80, 6822-6833.
- Fischer, U., Dröge-Laser, W., 2004. Overexpression of NtERF5, a new member of the tobacco ethylene response transcription factor family enhances resistance to *Tobacco mosaic virus*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 17, 1162–1171.
- Fortes, I., Navas-Castillo, J., 2012. Potato, an experimental and natural host of the crinivirus *Tomato chlorosis virus*. *European Journal of Plant Pathology* 134, 81-86.

- Fortes, I.M., 2010. Huéspedes alternativos de *Tomato chlorosis virus*: epidemiología, patología y diversidad genética en pimiento, presencia en patata y desarrollo de un sistema genético en *Nicotiana benthamiana*. Tesis doctoral, Universidad de Málaga.
- Fortes, I.M., Moriones, E., Navas-Castillo, J., 2012. *Tomato chlorosis virus* in pepper: prevalence in commercial crops in southeastern Spain and symptomatology under experimental conditions. *Plant Pathology* 61, 994-1001.
- Freitas, D.M.S., Nardin, I., Shimoyama, N., Souza-Dias, J.A.C., Rezende, J.A.M., 2012. First report of *Tomato chlorosis virus* in potato in Brazil. *Plant Disease* 96, 593-593.
- Fu, Z. Q., Dong, X., 2013. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology* 64, 839–863.
- Fukunaga, R., Doudna, J.A., 2009. dsRNA with 5' overhangs contributes to endogenous and antiviral RNA silencing pathways in plants. *EMBO Journal* 28, 545–555.
- Fukuzawa, N., Itchoda, N., Ishihara, T., Goto, K., Masuta, C., Matsumura, T., 2010. HC-Pro, a potyvirus RNA silencing suppressor, cancels cycling of *Cucumber mosaic virus* in *Nicotiana benthamiana* plants. *Virus Genes*, 40, 440–446.
- Fusaro, A.F., Correa, R.L., Nakasugi, K., Jackson, C., Kawchuk, L., Vaslin, M.F.S., Waterhouse, P.M., 2012. The Enamovirus p0 protein is a silencing suppressor which inhibits local and systemic RNA silencing through AGO1 degradation. *Virology* 426, 178-187.
- García, J.A., Pallás, V., 2015. Viral factors involved in plant pathogenesis. *Current Opinion in Virology* 11, 21-30.
- García-Cano, E., Resende, R.O., Fernández-Muñoz, R. and Moriones, E., 2006. Synergistic interaction between *Tomato chlorosis virus* and *Tomato spotted wilt virus* results in breakdown of resistance in tomato. *Phytopathology* 96, 1263–1269.
- García-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E.J., Sullivan, C., Fahlgren, N., Brempelis, K.J., Carrington, J.C., 2010. *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during *Turnip mosaic virus* infection. *Plant Cell* 22, 481–496.
- Genovés, A., Navarro, J.A., Pallás, V., 2006. Functional analysis of the five *Melon necrotic spot virus* genome-encoded proteins. *Journal of General Virology* 37, 2371–2380.
- Genovés, A., Pallás, V., Navarro, J.A., 2011. Contribution of topology determinants of a viral movement protein to its membrane association, intracellular traffic, and viral cell-to-cell movement. *Journal of Virology* 85, 7797–7809.

- Geri, C., Love, A.J., Cecchini, E., Barrett, S.J., Laird, J., Covey, S.N., Milner, J.J., 2004. *Arabidopsis* mutants that suppress the phenotype induced by transgene-mediated expression of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) gene VI are less susceptible to CaMV-infection and show reduced ethylene sensitivity. *Plant Molecular Biology* 56, 111-124.
- Gillet, F.X., Cattoni, D.I., Petiot-Bécard, S., Delalande, F., Poignavent, V., Brizard, J.P., Bessin, Y., Dorsselaer, A., Declerck, N., Sanglier-Cianférani, S., Brugidou, C., Vignols, F., 2013. The RYMV-encoded viral suppressor of RNA silencing P1 is a zinc-binding protein with redox-dependent flexibility. *Journal of Molecular Biology* 425, 2423–2435.
- Giner, A., Lakatos, L., García-Chapa, M., López-Moya, J.J., Burguán, J., 2010. Viral protein inhibits RISC activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs. *PLoS Pathogens* 6, e1000996.
- Glick, E., Zrachya, A., Levy, Y., Mett, A., Gidoni, D., Belausov, E., Citovsky, V., Gafni, Y., 2008. Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by *Tomato yellow leaf curl virus* V2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 157–161.
- González, I., Martínez, L., Rakitina, D.V., Lewsey, M.G., Atencio, F.A., Llave, C., Kalinina, N.O., Carr, J.P., Palukaitis, P., Canto, T., 2010. *Cucumber mosaic virus* 2b protein subcellular targets and interactions: their significance to RNA silencing suppressor activity. *Molecular Plant Microbe Interactions* 23, 294-303.
- González, I., Rakitina, D., Semashko, M., Taliansky, M., Praveen, S., Palukaitis, P., Carr, J.P., Kalinina, N., Canto, T., 2012. RNA binding is more critical to the suppression of silencing function of *Cucumber mosaic virus* 2b protein than nuclear localization. *RNA*, 18, 771–782.
- González-Jara, P., Atencio, F.A., Martínez-García, B., Barajas, D., Tenllado, F., Díaz-Ruiz, J.R., 2005. A single amino acid mutation in the *Plum pox virus* helper component-proteinase gene abolishes both synergistic and RNA silencing suppression activities. *Phytopathology* 95, 894-901.
- González-Jara, P., Tenllado, F., Martínez-García, B., Atencio, F.A., Barajas, D., Vargas, M., Díaz-Ruiz, J., Díaz-Ruiz, J.R., 2004. Host-dependent differences during synergistic infection by potyviruses with *Potato virus X*. *Molecular Plant Pathology* 5, 29-35.
- Goswami, S., Sahana, N., Pandey, V., Doblaz, P., Jain, R.K., Palukaitis, P., Canto, T., Praveen, S., 2012. Interference in plant defense and development by non-structural protein NSs of *Groundnut bud necrosis virus*. *Virus Research* 163, 368–373.

- Goto, K., Kobori, T., Kosaka, Y., Natsuaki, T., Masuta, C., 2007. Characterization of silencing suppressor 2b of *Cucumber mosaic virus* based on examination of its small RNA-binding abilities. *Plant Cell Physiology* 48, 1050–1060.
- Gouveia, P., Dandlen, S., Costa, A., Marques, N., Nolasco, G., 2012. Identification of an RNA silencing suppressor encoded by *Grapevine leafroll-associated virus 3*. *European Journal Plant Pathology* 133, 237-245.
- Gouveia, P., Nolasco, G., 2012. The p19.7 RNA silencing suppressor from *Grapevine leafroll-associated virus 3* shows different levels of activity across phylogenetic groups. *Virus Genes* 45, 333-339.
- Gowda, S., Ayllón, M.A., Satyanarayana, T., Bar-Joseph, M., Dawson, W.O., 2003b. Transcription strategy in a Closterovirus: a novel 5′-proximal controller element of *Citrus tristeza virus* produces 5′- and 3′- terminal subgenomic RNAs and differs from 3′ open reading frame controller elements. *Journal of Virology* 77, 340-352.
- Gowda, S., Satyanarayana, T., Ayllón, M.A., Albiach-Martí, M.R., Mawassi, M., Rabindran, S., Garnsey, S.M., Dawson, W.O., 2001. Characterization of the *cis*-acting elements controlling subgenomic mRNAs of *Citrus tristeza virus*: production of positive- and negative-stranded 3′-terminal and positive-stranded 5′-terminal RNAs. *Virology* 286, 134-151.
- Gowda, S., Satyanarayana, T., Ayllón, M.A., Moreno, P., Flores, R., Dawson, W.O., 2003a. The conserved structures of the 5′ nontranslated region of *Citrus tristeza virus* are involved in replication and virion assembly. *Virology* 317, 50-64.
- Gowda, S., Tatineni, S., Folimonova, S.Y., Hilf, M.E., Dawson, W.O., 2009. Accumulation of a 5′ proximal subgenomic RNA of *Citrus tristeza virus* is correlated with encapsidation by the minor coat protein. *Virology* 389, 122-131.
- Gray, S., Gildow, F.E., 2003. Luteovirus-aphid interactions. *Annual Review of Phytopathology* 41, 539-666.
- Guan, H., Song, C., Simon, A.E., 1997. RNA promoters located on (-)-strands of a subviral RNA associated with *Turnip crinkle virus*. *RNA* 3, 1401-1412.
- Guilley, H., Bortolamiol, D., Jonard, G., Bouzoubaa, S., Ziegler-Graff, V., 2009. Rapid screening of RNA silencing suppressors by using a recombinant virus derived from *Beet necrotic yellow vein virus*. *Journal of General Virology* 90, 2536–2541.
- Guo, H.S., Ding, S.W., 2002. A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO Journal* 21, 398-407.

- Haag, J.R., Pikaard, C.S., 2011. Multisubunit RNA polymerases IV and V: Purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12, 483-492.
- Haas, G., Azevedo, J., Moissiard, G., Geldreich, A., Himber, C., Bureau, M., Fukuhara, T., Keller, M., Voinnet, O., 2008. Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. *EMBO Journal* 24, 2102-2112.
- Haikonen, T., Rajamaki, M.L., Tian, Y.P., Valkonen, J.P., 2013a. Interaction of the microtubule associated host protein HIP2 with viral helper component proteinase is important in infection with *Potato virus A*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 26, 734-744.
- Haikonen, T., Rajamaki, M.L., Tian, Y.P., Valkonen, J.P., 2013b. Mutation of a short variable region in HCpro protein of *Potato virus A* affects interactions with a microtubule-associated protein and induces necrotic responses in tobacco. *Molecular Plant Microbe Interactions* 26, 721-733.
- Hamera, S., Song, X., Su, L., Chen, X., Fang, R., 2012. *Cucumber mosaic virus* suppressor 2b binds to AGO4-related small RNAs and impairs AGO4 activities. *Plant Journal* 69, 104-115.
- Hamilton, A.J., Baulcombe, D.C., 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-52.
- Hammond, R.W., Hammond, J., 2013. Evaluating the silencing suppressor activity of proteins encoded by *Maize rayado fino virus*. APS-MSA, 2013, Joint meeting. Poster session: Molecular Plant-Microbe Interactions-Viruses, 623-P.
- Hammond-Kosack, K.E., Jones, J., 1997. Plant disease resistance genes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 575-607.
- Han, Y.H., Xiang, H.Y., Wang, Q., Li, Y.Y., Wu, W.Q., Han, C.G., Li, D.W., Yu, J., 2010. Ring structure amino acids affect the suppressor activity of *Melon aphid-borne yellows virus* P0 protein. *Virology* 406, 21-27.
- Hao, X., Lu, A., Sokal, N., Bhagwat, B., Leung, E., Mao, R., Reade, R., Wu, Y., Rochon, D., Xiang, Y., 2011. *Cucumber necrosis virus* p20 is a viral suppressor of RNA silencing. *Virus Research* 155, 423-432.
- Harries, P.A., Palanichelvam, K., Bhat, S., Nelson, R.S., 2008. *Tobacco mosaic virus* 126-kDa protein increases the susceptibility of *Nicotiana tabacum* to other viruses and its dosage affects virus-induced gene silencing. *Molecular Plant Microbe Interactions* 21, 1539-1548.

- Harris, K.F., Pesic-van Esbroek, Z., Duffus, J.E., 1996. Anatomy of a virus vector., pp. 289-317 "Bemisia 1995: taxonomy, biology, damage, control and management".
- Harvey, J.J., Lewsey, M.G., Patel, K., Westwood, J., Heimstädt, S., Carr, J.P., Baulcombe, D.C., 2011. An antiviral defense role of AGO2 in plants. PLoS ONE 6, e14639.
- Havelda, Z., Hornyik, C., Valoczi, A., Burgyán, J., 2005. Defective interfering RNA hinders the activity of a tombusvirus-encoded posttranscriptional gene silencing suppressor. Journal of Virology 79, 450–457.
- Hemmes, H., Lakatos, L., Goldbach, R., Burgyan, J., Prins, M., 2007. The NS3 protein of *Rice hoja blanca tenuivirus* suppresses RNA silencing in plant and insect hosts by efficiently binding both siRNAs and miRNAs. RNA 13, 1079-1089.
- Hendelman, A., Kravchik, M., Stav, R., Zik, M., Lugassi, N., Arazi, T., 2013. The developmental outcomes of P0-mediated ARGONAUTE destabilization in tomato. Planta 237, 363–377.
- Henderson, I.R., Deleris, A., Wong, W., Zhong, X., Chin, H.G., Horwitz, G.A., Kelly, K.A., Pradhan, S., and Jacobsen, S.E., 2010. The *de novo* cytosine methyltransferase DRM2 requires intact UBA domains and a catalytically mutated paralog DRM3 during RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. PLoS Genetics 6, e1001182.
- Henderson, I.R., Zhang, X., Lu, C., Johnson, L., Meyers, B.C., Green, P.J., Jacobsen, S.E., 2006. Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. Nature Genetics 38, 721-725.
- Hilf, M.E., Karasev, A.V., Pappu, H.R., Gumpf, D.J., Niblett, C.L., Garnsey, S.M., 1995. Characterization of *Citrus tristeza virus* subgenomic RNAs in infected tissue. Virology 208, 576-582.
- 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, 1-24.
- Hiraguri, A., Itoh, R., Kondo, N., Nomura, Y., Aizawa, D., Murai, Y., Koiwa, H., Seki, M., Shinozaki, K., Fukuhara, T., 2005. Specific interactions between dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology 57, 173–188.
- Hogenhout, S.A., Ammar, el-D, Whitfield, A.E., Redinbaugh, M.G., 2008. Insect vector interaction with persistently transmitted viruses. Annual Review of Phytopathology 46, 327-359.

- Hsieh, Y.C., Omarov, R.T., Scholthof, H.B., 2009. Diverse and newly recognized effects associated with short interfering RNA binding site modifications on the *Tomato bushy stunt virus* P19 silencing suppressor. *Journal of Virology* 83, 2188–2200.
- Hu, Q., Hollunder, J., Niehl, A., Korner, C.J., Gereige, D., Windels, D., Arnold, A., Kuiper, M., Vazquez, F., Pooggin, M., Heinlein, M., 2011. Specific impact of tobamovirus infection on the *Arabidopsis* small RNA profile. *PLoS ONE* 6: e19549.
- Hull, R., 2002. *Matthews' Plant Virology: Fourth Edition*. Academy Press.
- Inaba, J., Kim, B. M., Shimura, H., Masuta, C., 2011. Virus-induced necrosis is a consequence of direct protein-protein interaction between a viral RNA-silencing suppressor and a host catalase. *Plant Physiology* 156, 2026-2036.
- Incarbone, M., Dunoyer, P., 2013. RNA silencing and its suppression: novel insights from *in planta* analysis. *Trends in Plant Science* 18, 382-392.
- Jamous, R.M., Boonrod, K., Fuellgrabe, M.W., Ali-Shtayeh, M.S., Krczal, G., Wassenegger, M., 2011. The helper component-proteinase of the *Zucchini yellow mosaic virus* inhibits the Hua Enhancer 1 methyltransferase activity in vitro. *Journal of General Virology* 92, 2222–2226.
- Jaubert, M., Bhattacharjee, S., Mello, A.F.S., Perry, K.L., Moffett, P., 2011. ARGONAUTE2 mediates RNA-silencing antiviral defenses against *Potato virus X* in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 156, 1556-1564.
- Jay, F., Wang, Y., Yu, A., Tacconat, L., Pelletier, S., Colot, V., Renou, J.P., Voinnet, O., 2011. Misregulation of AUXIN RESPONSE FACTOR 8 underlies the developmental abnormalities caused by three distinct viral silencing suppressors in *Arabidopsis*. *PLoS Pathogens* 7, e1002035.
- Jeong, R.D., Chandra-Shekara, A.C., Kachroo, A., Klessig, D.F., Kachroo, P., 2008. HRT-mediated hypersensitive response and resistance to *Turnip crinkle virus* in *Arabidopsis* does not require the function of TIP, the presumed guard protein. *Molecular Plant Microbe Interactions* 21, 1316–1324.
- 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, 715–724.
- Jin, H., Zhu, J.K., 2010. A viral suppressor protein inhibits host RNA silencing by hooking up with Argonautes. *Genes & Development* 24, 853–856.
- Jin, Y., Ma, D., Dong, J., Li, D., Deng, C., Jin, J., Wang, T., 2007. The HC-Pro protein of *Potato virus Y* interacts with NtMinD of tobacco. *Molecular Plant Microbe Interactions* 20, 1505–1511.

- Johansen, L.K., Carrington, J.C., 2001. Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Physiology* 126, 930-938.
- Kalantidis, K., Schumacher, H.T., Alexiadis, T., Helm, J.M., 2008. RNA silencing movement in plants. *Biology of the Cell* 100, 13-26.
- Karasev, A.V., 2000. Genetic diversity and evolution of closteroviruses. *Annual Review of Phytopathology* 38, 293-324.
- Karasev, A.V., Boyko, V.P., Gowda, S., Nikolaeva, O.V., Hilf, M.E., Koonin, E.V., Niblett, C.L., Cline, K., Gumpf, D.J., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Lewandowski, D.J., Dawson, W.O., 1995. Complete sequence of the *Citrus tristeza virus* RNA genome. *Virology* 208, 511-520.
- Karasev, A.V., Hilf, M.E., Garnsey, S.M., Dawson, W.O., 1997. Transcriptional strategy of closteroviruses: mapping the 5' termini of the *Citrus tristeza virus* subgenomic RNAs. *Journal of Virology* 71, 6233-6236.
- Karlowski, W.M., Zielezinski, A., Carrere, J., Pontier, D., Lagrange, T., Cooke, R., 2010. Genome-wide computational identification of WG/GW Argonaute-binding proteins in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* 38, 4231-4245.
- Karran, R.A., Sanfaçon, H., 2014. *Tomato ringspot virus* coat protein binds to Argonaute 1 and suppresses the translation repression of a reporter gene. *Molecular Plant Microbe Interactions* 27, 933-944.
- Karyeija, R.F., Kreuze, J.F., Gibson, R.W. and Valkonen, J.P.T., 2000. Synergistic interactions of a potyvirus and a phloem-limited crinivirus in sweet potato plants. *Virology*, 269, 26-36.
- Kasschau, K.D., Carrington, J.C., 1998. A counter-defensive strategy of plant viruses: Suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95, 461-470.
- Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J., Krizan, K.A., Carrington, J.C., 2003. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interfere with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Developmental Cell* 4, 205-217.
- Kataya, A.R.A., Stavridou, E., Farhan, K., Livieratos, I.C., 2008. Nucleotide sequence analysis and detection of a Greek isolate of *Tomato chlorosis virus*. *Plant Pathology* 57, 819-824.
- Kataya, A.R.A., Suliman, M.N.S., Kalantidis, K., Livieratos, I.C., 2009. *Cucurbit yellow stunting disorder virus* p25 is a suppressor of post-transcriptional gene silencing. *Virus Research* 145, 48-53.

- Kazan, K., Lyons, R., 2014. Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors. *Plant Cell* 26, 2285–2309.
- Kim, V.N., 2005. Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Molecules and Cells* 19, 1-15.
- Kimberlin, C.R., Bornholdt, Z.A., Li, S., Woods, V.L., MacRae, I.J., Saphire, E.O., 2010. *Ebolavirus* VP35 uses a bimodal strategy to bind dsRNA for innate immune suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 314-319.
- King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J., 2012. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academy Press.
- Kiraly, L., Cole, A.B., Bourque, J.E., Schoelz, J.E., 1999. Systemic cell death is elicited by the interaction of a single gene in *Nicotiana clevelandii* and gene VI of *Cauliflower mosaic virus*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 12, 919-925.
- Kiss, Z.A., Medina, V., Falk, B.W., 2013. Crinivirus replication and host interactions. *Frontiers in Microbiology* 4, 99.
- Koonin, E.V., Dolja, V.V., 1993. Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 28, 375-430.
- Koukiekoloa, R., Sagana, S.M., Pezacki, J.P., 2007. Effects of pH and salt concentration on the siRNA binding activity of the RNA silencing suppressor protein p19. *FEBS Letters* 581, 3051–3056.
- Kozłowska-Makulska, A., Guilley, H., Szyndel, M.S., Beuve, M., Lemaire, O., Herrbach, E., Bouzoubaa, S., 2010. P0 proteins of European beet-infecting poleroviruses display variable RNA silencing suppression activity. *Journal of General Virology* 91, 1082–1091.
- Kreuze, J.F., Savenkov, E.I., Cuellar, W., Li, X., Valkonen, J.P.T., 2005. Viral class 1 RNase III involved in suppression of RNA silencing. *Journal of Virology* 79, 7227-7238.
- Kreuze, J.F., Savenkov, E.I., Valkonen, J.P.T., 2002. Complete genome sequence and analyses of the subgenomic RNAs of *Sweet potato chlorotic stunt virus* reveal several new features for the genus *Crinivirus*. *Journal of Virology* 76, 9260-9270.
- Kubota, K., Tsuda, S., Tamai, A., Meshi, T., 2003. *Tomato mosaic virus* replication protein suppressed virus-targeted posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology* 77, 11016-11026.

- Kumakura, N., Takeda, A., Fujioka, Y., Motose, H., Takano, R., Watanabe, Y., 2009. SGS3 and RDR6 interact and colocalize in cytoplasmic SGS3/RDR6-bodies. *FEBS Letters* 583, 1261–1266.
- 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, 2347-2352.
- Lacombe, S., Bangratz, M., Vignols, F., Brugidou, C., 2010. The *Rice yellow mottle virus* P1 protein exhibits dual functions to suppress and activate gene silencing. *Plant Journal* 61, 371–382.
- Lakatos, L., Csorba T., Pantaleo, V., Chapman, E.J., Carrington, C., Liu, Y.P., Dolja, V.V., Fernández-Calvino, L., López-Moya, J.J., Burguán, J., 2006. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO Journal* 25, 2768–2780.
- Landeo-Ríos, Y., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Cañizares, M.C., 2016. The p22 RNA silencing suppressor of the crinivirus *Tomato chlorosis virus* preferentially binds long dsRNAs preventing them from cleavage. *Virology* 488, 129-136.
- Law, S.M., Zhang, B.W, Brooks, C.L., 2013. pH-sensitive residues in the P19 RNA silencing suppressor protein from *Carnation italian ringspot virus* affect siRNA binding stability. *Protein Science* 22, 595–604.
- Lewsey, M., Robertson, F.C., Canto, T., Palukaitis, P., Carr, J.P., 2007. Selective targeting of miRNA-regulated plant development by a viral counter-silencing protein. *Plant Journal* 50, 240–252.
- Li, F., Ding, S.W., 2006. Virus counterdefense: Diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annual Review Microbiology* 60, 503–531.
- Li, F., Huang, C., Li, Z., Zhou, X., 2014. Suppression of RNA silencing by a plant DNA virus satellite requires a host calmodulin-like protein to repress RDR6 expression. *PLoS Pathogens* 10, e1003921.
- Li, H.W., Lucy, A.P., Guo, H.S., Li, W.X., Ji, L.H., Wong, S.M., Ding, S.W., 1999. Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. *EMBO Journal* 18, 2683- 2691.
- Lindbo, J.A., Dougherty, W.G., 1992. Pathogen-derived resistance to a potyvirus: immune and resistant phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. *Molecular Plant Microbe Interactions* 5, 144-53.

- Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E., Sattler, M., 2005. The structure of the *Flock house virus* B2 protein, a viral suppressor of RNA interference, shows a novel mode of double-stranded RNA recognition. *EMBO Reports* 6, 1149-1155.
- Liu, H., Reavy, B., Swanson, M., MacFarlane, S.A., 2002. Functional replacement of the *Tobacco rattle virus* cysteine-rich protein by pathogenicity proteins from unrelated plant viruses. *Virology* 298, 232-239.
- Liu, L., Grainger, J., Cañizares, M.C., Angell, S.M., Lomonosoff, G.P. 2004. *Cowpea mosaic virus* RNA1 acts as an amplicon whose effects can be counteracted by a RNA-2-encoded suppressor of silencing. *Virology*, 323, 37-48.
- Livieratos, I.C., Eliasco, E., Muller, G., Olsthoorn, R.C.L., Salazar, L.F., Pleij, C.W.A., Coutts, R.H.A., 2004. Analysis of the RNA of *Potato yellow vein virus*: evidence for a tripartite genome and conserved 3'-terminal structures among members of the genus *Crinivirus*. *Journal of General Virology* 85, 2065-2075.
- Llave, C., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., 2000. Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13401-13406.
- Loebenstein, G., 2009. Local lesions and induced resistance. *Advances in Virus Research* 75, 73-117.
- López, C., Ayllón M.A., Navas-Castillo, J., Guerri, J., Moreno, P., Flores, R., 1998. Molecular variability of the 5' - and 3' -terminal regions of *Citrus tristeza virus* RNA. *Phytopathology* 88, 685-691.
- López, C., Navas-Castillo, J., Gowda, S., Moreno, P., Flores, R., 2000. The 23-kDa protein coded by the 3'-terminal gene of *Citrus tristeza virus* is an RNA-binding protein. *Virology* 269, 462-470.
- Love, A.J., Laval, V., Geri, C., Laird, J., Tomos, A.D., Hooks, M.A., Milner, J.J., 2007. Components of *Arabidopsis* defense- and ethylene-signaling pathways regulate susceptibility to cauliflower mosaic virus by restricting long-distance movement. *Molecular Plant Microbe Interactions* 20, 659-670.
- Lozano, G. 2007. Caracterización molecular y diversidad genética de virus transmitidos por mosca blanca asociados a los amarillos de tomate y batata. Tesis Doctoral, Universidad de Málaga.
- Lozano, G., Grande-Pérez, A., Navas-Castillo, J., 2009. Populations of genomic RNAs devoted to the replication or spread of a bipartite plant virus differ in genetic structure. *Journal of Virology* 83, 12973-12983.
- Lozano, G., I. M. Fortes, E. García-Cano, R. Fernández-Muñoz, E. Moriones y J. Navas-Castillo. 2006b. El virus del amarilleo del tomate (*Tomato chlorosis*

- virus*, ToCV): una amenaza más para los cultivos protegidos de tomate y pimiento. *Agrícola Vergel* 293, 263-268.
- Lozano, G., Moriones, E., Navas-Castillo, J., 2004. First report of sweet pepper (*Capsicum annuum*) as a natural host plant for *Tomato chlorosis virus*. *Plant Disease* 88, 224-224.
- Lozano, G., Moriones, E., Navas-Castillo, J., 2006a. Complete nucleotide sequence of the RNA2 of the crinivirus *Tomato chlorosis virus*. *Archives of Virology* 151, 581-587.
- Lozano, G., Moriones, E., Navas-Castillo, J., 2007. Complete sequence of the RNA1 of a European isolate of *Tomato chlorosis virus*. *Archives of Virology* 152, 839-841.
- Lozano-Durán, R., Rosas-Díaz, T., Gusmaroli, G., Luna, A.P., Taconnat, L., Deng, X.W., Bejarano, E.R., 2011. Geminiviruses subvert ubiquitination by altering CSN-mediated derubylation of SCF E3 ligase complexes and inhibit jasmonate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23, 1014-1032.
- Lózsa, R., Csorba, T., Lakatos, L., Burgyán, J., 2008. Inhibition of 3' modification of small RNAs in virus-infected plants require spatial and temporal co-expression of small RNAs and viral silencing-suppressor proteins. *Nucleic Acids Research* 36, 4099-4107.
- Lu, R., Folimonov, A., Shintaku, M., Li, W.X., Falk, B.W., Dawson, W.O., Ding, S.W., 2004. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 15742-15747.
- Lukhovitskaya, N.I., Vetukuri, R.R., Sama, I., Thaduri, S., Solovyev, A.G., Savenkov, E.I., 2014. A viral transcription factor exhibits antiviral RNA silencing suppression activity independent of its nuclear localization. *Journal of General Virology* 95, 2831-2837.
- MacDiarmid, R., 2005. RNA silencing in productive virus infections. *Annual Review Phytopathology* 43, 523-544.
- Mallory, A.C., Ely, L., Smith, T.H., Marathe, R., Anandalakshmi, R., Fagard, M., Vaucheret, H., Pruss, G., Bowman, L., Vance, V.B., 2001. HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell* 13, 571-583.
- Mandadi, K.K., Scholthof, K.B., 2013. Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease? *Plant Cell* 25, 1489-1505.

- Mangwende, T., Wang, M.I., Borth, W., Hu, J., Moore, P.H., Mirkov, T.E., Albert, H.H., 2009. The P0 gene of *Sugarcane yellow leaf virus* encodes an RNA silencing suppressor with unique activities. *Virology* 384, 38-50.
- Martelli, G.P., Agranovsky, A.A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R.H.A., Dolja, V.V., Hu, J.S., Jelkmann, W., Karasev, A.V., Martin, R.R., Minafra, A., Namba, S., Vetten, H.J., 2012. *Closteroviridae*. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), *Virus taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 987-1001.
- Martínez-Priego, L., Donaire, L., Barajas, D., Llave, C., 2008. Silencing suppressor activity of the *Tobacco rattle virus*-encoded 16-kDa protein and interference with endogenous small RNA-guided regulatory pathways. *Virology* 376, 346-356.
- Martínez-Turiño, S., Hernández, C., 2009. Inhibition of RNA silencing by the coat protein of *Pelargonium flower break virus*: distinctions from closely related suppressors. *Journal of General Virology* 90, 519-525.
- Martín-Hernández, A.M., Baulcombe, D., 2008. *Tobacco rattle virus* 16-Kilodalton protein encodes a suppressor of RNA silencing that allows transient viral entry in meristems. *Journal of Virology* 82, 4064-4071.
- Mathioudakis, M.M., Rodríguez-Moreno, L., Sempere, R.N., Aranda, M.A., Livieratos, I., 2014. Multifaceted capsid proteins: multiple interactions suggest multiple roles for *Pepino mosaic virus* capsid protein. *Molecular Plant Microbe Interactions* 27, 1356–1369.
- Mathioudakis, M.M., Veiga, R.S., Cant, T., Medina, V., Mossialos, D., Makris, A.M., Livieratos, I., 2013. *Pepino mosaic virus* triple gene block protein 1 (TGBp1) interacts with and increases tomato catalase 1 activity to enhance virus accumulation. *Molecular Plant Microbe Interactions* 14, 589–601.
- Matzke, M., Kanno, T., Daxinger, L., Huettel, B., Matzke, A., 2009. RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Current Opinion in Cell Biology* 21, 367-376.
- Maule, A., Leh, V., Lederer, C., 2002. The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 279–284.
- Medina, V., Peremyslov, V.V., Hagiwara Y., Dolja V.V., 1999. Subcellular localization of the HSP70-homolog encoded by beet yellows closterovirus. *Virology* 260, 173-181.
- Medina, V., Tian, T., Wierzchos, J., Falk, B.W., 1998. Specific inclusion bodies are associated with replication of *Lettuce infectious yellows virus* RNAs in



- Nicotiana benthamiana* protoplasts. *Journal of General Virology* 78, 2325-2329.
- Melnyk, C.W., Molnár, A., Baulcombe, D.C., 2011. Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *EMBO Journal* 30, 3553-3563.
- Meng, C., Chen, J., Ding, S.W., Peng, J., Wong, S.M., 2008. *Hibiscus chlorotic ringspot virus* coat protein inhibits *trans*-acting small interfering RNA biogenesis in *Arabidopsis*. *Journal of General Virology* 89, 2349-2358.
- Meng, C., Chen, J., Peng, J., Wong, S.M., 2006. Host-induced avirulence of *Hibiscus chlorotic ringspot virus* mutants correlates with reduced gene-silencing suppression activity. *Journal of General Virology* 87, 451-459.
- Mérai, Z., Kerényi, Z., Kertész, S., Magna, Melinda, Lakatos, L., Silhavy, D., 2006. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *Journal of Virology* 80, 5747-5756.
- Mérai, Z., Kerényi, Z., Molnár, A., Barta, E., Válóczy, A., Bisztray, G., Havelda, Z., Burgyán, J., Silhavy, D., 2005. Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity. *Journal of Virology* 79, 7217-7226.
- Miller, W.A., Koev, G., 2000. Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. *Virology* 273, 1-8.
- Miller, W.A., Whitham, S.A., 2013. Plant viruses. In: Knipe, D.M., Howley, P. M., (Eds.), *Virology: Sixth Edition*. Volume two. Lippincott William and Wilkins, a Wolters Kluwer business, pp. 2289-2325.
- Moissiard, G., Voinnet, O., 2006. RNA silencing of host transcripts by cauliflower mosaic virus requires coordinated action of the four *Arabidopsis* Dicer-like proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 19593-19598.
- Molnár, A., Csorba, T., Lakatos, L., Várallyay, E., Lacomme, C., Burgyán, J., 2005. Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *Journal of Virology* 79, 7812-7818.
- Molnár, A., Melnyk, C.W., Bassett, A., Hardcastle, T.J., Dunn, R., Baulcombe, D., 2010. Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* 328, 872-875.
- Morel, J.B., Godon, C., Mourrain, P., Beclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F., Vaucheret, H., 2002. Fertile hypomorphic ARGONAUTE (*ago1*) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell* 14, 629-639.

- Morris, J., Steel, E., Smith, P., Boonham, N., Spence, N., Barker, I., 2006. Host range studies for *Tomato chlorosis virus*, and *Cucumber vein yellowing virus* transmitted by *Bemisia tabaci* (Gennadius). *European Journal of Plant Pathology* 114, 265-273.
- Mourrain, P., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Jouette, D., Lacombe, A.M., Nikic, S., Picault, N., Remoue, K., Sanial, M., Vo, T.A., Vaucheret, H., 2000. *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101, 533-542.
- Mukasa, S.B., Rubaihayo, P.R., Valkonen, J.P.T., 2006. Interactions between a crinivirus, an ipomovirus and a potyvirus in co-infected sweet potato plants. *Plant Pathology* 55, 458-467.
- Murphy, J.F., Bowen, K.L., 2006. Synergistic disease in pepper caused by the mixed infection of *Cucumber mosaic virus* and *Pepper mottle virus*. *Phytopathology* 96, 240-247.
- Nagy, P.D., Pogany, J., 2000. Partial purification and characterization of *Cucumber necrosis virus* and *Tomato bushy stunt virus* RNA-dependent RNA polymerases: similarities and differences in template usage between tombusvirus and carmovirus RNA-dependent RNA polymerases. *Virology* 276, 279-288.
- Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R., 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2, 279-289.
- Navas-Castillo, J., Albiach-Martí, M.R., Gowda, S., Hilf, M.E., Garnsey, S.M., Dawson, W.O., 1997. Kinetics of accumulation of *Citrus tristeza virus* RNAs. *Virology* 228, 92-97.
- Nemes, K., Gellert, A., Balazs, E., Salanki, K., 2014. Alanine scanning of *Cucumber mosaic virus* (CMV) 2b protein identifies different positions for cell-to-cell movement and gene silencing suppressor activity. *PloS ONE* 9, e11209.
- Ng, J.C.K., Falk, B.W., 2006. Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* 44, 183-212.
- Nicaise, V., 2014. Crop immunity against viruses: outcomes and future challenges. *Frontiers in Plant Science* 5, 660.
- Niehl, A., Heinlein, M., 2011. Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma* 248, 75-99.

- Oka, K., Kobayashi, M., Mitsuhashi, I., Seo, S., 2013. Jasmonic acid negatively regulates resistance to *Tobacco mosaic virus* in tobacco. *Plant Cell Physiology* 54, 1999–2010.
- Okano, Y., Senshu, H., Hashimoto, M., Neriya, Y., Netsu, O., Minato, N., Yoshida, T., Maejima, K., Oshima, K., Komatsu, K., Yamaji, Y., Namba S., 2014. *In planta* recognition of a double-stranded RNA synthesis protein complex by a potyviral RNA silencing suppressor. *Plant Cell* 26, 2168-2183.
- Olsper, A., Kamsol, K., Sarmiento, C., Gerassimenko, J., Truve, E., 2014. *Cocksfoot mottle virus* coat protein is dispensable for the systemic infection. *Virology Journal* 11, 19.
- Olsper, A., Paves, H., Toomela, R., Tamm, T., Truve, E., 2010. Cocksfoot mottle sobemovirus coat protein contains two nuclear localization signals. *Virus Genes*, 40, 423–431.
- Omarov, R., Sparks, K., Smith, L., Zindovic, J., Scholthof, H.B., 2006. Biological relevance of a stable biochemical interaction between the Tombusvirus-encoded P19 and short interfering RNAs. *Journal of Virology* 80, 3000–3008.
- Orlío, A.F., Fortes, I.M., Navas-Castillo, J., 2014. Infectious cDNA clones of the crinivirus *Tomato chlorosis virus* are competent for systemic plant infection and whitefly-transmission. *Virology* 464-465, 365-374.
- Orlío, A.F., Navas-Castillo, J., 2009. The complete nucleotide sequence of the RNA2 of the crinivirus *Tomato infectious chlorosis virus*: isolates from North America and Europe are essentially identical. *Archive of Virology* 154, 683-687.
- Pacheco, R., García-Marcos, A., Manzano, A., García de Lacoba, M., Camañes, G., García-Agustín, P., Díaz-Ruiz, J.R., Tenllado, F., 2012. Comparative analysis of transcriptomic and hormonal responses to compatible and incompatible plant–virus interactions that lead to cell death. *Molecular Plant Microbe Interactions* 2012, 25, 709-723.
- Pallás, V., García J.A., 2011. How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *Journal of General Virology* 92, 2691-2705.
- Panavas, T., Nagy, P.D., 2003. The RNA replication enhancer element of tombusviruses contains two interchangeable hairpins that are functional during plus-strand synthesis. *Journal of Virology* 77, 258-269.
- Panavas, T., Panaviene, Z., Pogany, J., Nagy, P.D., 2003. Enhancement of RNA synthesis by promoter duplication in tombusviruses. *Virology* 310, 118-129.

- Pappu, H.R., Karasev, A.V., Anderson, E.J., Pappu, S.S., Hilf, M.E., Febres, V.J., Eckloff, R.M., McCaffery, M., Boyko, V., Gowda, S., Dolja, V.V., Koonin, E.V., Gumpf, D.J., Cline, K.C., Garnsey, S.M., Dawson, W.O., Lee, R.F., Niblett, C.L., 1994. Nucleotide sequence and organization of eight 3' open reading frames of the citrus tristeza closterovirus genome. *Virology* 199, 35-46.
- Park, J.W., Faure-Rabasse, S., Robinson, M.A., Desvoyes, B., Scholthof, H.B., 2004. The multifunctional plant viral suppressor of gene silencing P19 interacts with itself and an RNA binding host protein. *Virology*, 323, 49–58.
- Pasquinelli, A. E., Ruvkun, G., 2002. Control of developmental timing by microRNAs and their targets. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 18, 495-513.
- Pazhouhandeh, M., Dieterle, M., Marrocco, K., Lechner, E., Berry, B., Brault, V., Hemmer, O., Kretsch, T., Richards, K.E., Genschik, P., Ziegler-Graff, V., 2006. F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proceedings of the Nacional Academy of Sciences of the United States of America* 103, 1994–1999.
- Peremyslov, V.V., Andreev, I.A., Prokhnevsky, A.I., Duncan, G.H., Taliansky, M.E., Dolja, V.V., 2004a. Complex molecular architecture of *Beet yellows virus* particles. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* 101, 5030-5035.
- Peremyslov, V.V., Hagiwara, Y., Dolja, V.V., 1998. Genes required for replication of the 15.5-kilobase RNA genome of a plant closterovirus. *Journal of Virology* 72, 5870-5876.
- Peremyslov, V.V., Pan, Dolja Y.W., V.V., 2004b. Movement protein of a closterovirus is a type III integral transmembrane protein localized to the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology* 78, 3704-3709.
- Pérez-Cañamás, M., Hernández, C., 2015. Key importance of small RNA binding for the activity of the glycine-tryptophan (GW) motif-containing viral suppressor of RNA silencing. *Journal of Biological Chemistry* 290, 3106-3120.
- Powers, J.G., Sit, T.L., Heinsohn, C., George, C.G., Kim, K.H., Lommel, S.A., 2008. The *Red clover necrotic mosaic virus* RNA-2 encoded movement protein is a second suppressor of RNA silencing. *Virology* 381, 277–286.
- Prokhnevsky, A.I., Peremyslov, V.V., Dolja, V.V., 2005. Actin cytoskeleton is involved in targeting of a viral Hsp70 homolog to the cell periphery. *Journal of Virology* 79, 14421-14428.

- Prokhnevsky, A.I., Peremyslov, V.V., Napuli, A.J., Dolja, V.V., 2002. Interaction between long-distance transport factor and Hsp70-related movement protein of *Beet yellows virus*. *Journal of Virology* 76, 11003-11011.
- Pruss, G., Ge, X., Shi, X.M., Carrington, J.C., Vance, V.B., 1997. Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* 9, 859-868.
- Pruss, G.J., Lawrence, C.B., Bass, T., Li, Q.Q., Bowman, L.H., Vance, V., 2004. The potyviral suppressor of RNA silencing confers enhanced resistance to multiple pathogens. *Virology* 320, 107-120.
- Qi, N., Cai, D., Qiu, Y., Xie, J., Wang, Z., Si, J., Zhang, J., Zhou, X., Hu, Y., 2011. RNA binding by a novel helical fold of B2 protein from Wuhan Nodavirus mediates the suppression of RNA interference and promotes B2 dimerization. *Journal of Virology* 85, 9543-9554.
- Qi, S., Bao, F.S., Xie, Z., 2009. Small RNA deep sequencing reveals role for *Arabidopsis thaliana* RNA-dependent RNA polymerases in viral siRNA biogenesis. *PLoS ONE* 4, e4971.
- Qu, F., Ren, T., Morris, T.J., 2003. The coat protein of *Turnip crinkle virus* suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *Journal of Virology* 77, 511-522.
- Qu, F., Ye, X., Hou, G., Sato, S., Clemente, T.E., Morris, T.J., 2005. RDR6 has a broad-spectrum but temperature-dependent antiviral defense role in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Virology* 79, 15209-15217.
- Qu, F., Ye, X., Morris, T.J., 2008. *Arabidopsis* DRB4, AG01, AG07, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 14732-14737.
- Rahim, M.D., Andika, I.B., Han, C., Kondo, H., Tamada, T., 2007. RNA4-encoded p31 of *Beet necrotic yellow vein virus* is involved in efficient vector transmission, symptom severity and silencing suppression in roots. *Journal of General Virology* 88, 1611-1619.
- Rajamäki, M.L., Streng, J., Valkonen, J.P.T., 2014. Silencing suppressor protein VPg of a potyvirus interacts with the plant silencing-related protein SGS3. *Molecular Plant Microbe Interactions* 27, 1199-1210.
- Rajamäki, M.L., Valkonen, J.P.T., 2009. Control of nuclear and nucleolar localization of nuclear inclusion protein a of picorna-like *Potato virus A* in *Nicotiana* species. *Plant Cell*, 21, 2485-2502.

- Ratcliff, F., Harrison, B.D., Baulcombe, D., 1997. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 276, 1558–1560.
- Rawlings, R.A., Krishnan, V., Walter, N.G., 2011. Viral RNAi suppressor reversibly binds siRNA to outcompete dicer and RISC via multiple-turnover. *Journal of Molecular Biology* 408, 262–276.
- Reed, J.C., Kasschau, K.D., Prokhnevsky, A.I., Gopinath, K., Pogue, G.P., Carrington, J.C., Dolja, V.V., 2003. Suppressor of RNA silencing encoded by *Beet yellows virus*. *Virology* 306, 203-209.
- Ren, B., Guo, Y., Gao, F., Zhou, P., Wu, F., Meng, Z., Wei, C., Li, Y., 2010. Multiple functions of rice dwarf phytoeovirus Pns10 in suppressing systemic RNA silencing. *Journal of Virology* 84, 12914-12923.
- Ren, T., Qu, F., Morris, T.J., 2000. HRT gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to *Turnip crinkle virus*. *Plant Cell* 12, 1917-1926.
- Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, B., Bartel, D.P., 2002. Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110, 513-520.
- Robaglia, C., Caranta, C., 2006. Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends in Plant Science* 11, 40-45.
- Ronde, D., Pasquier, A., Ying, Su., Butterbach, P., Lohuis, D., Kormelink, R., 2014. Analysis of *Tomato spotted wilt virus* NSs protein indicates the importance of the N-terminal domain for avirulence and RNA silencing suppression. *Molecular Plant Pathology* 15, 185–195.
- Rubio, L., Guerri, J., Moreno, P., 2013. Genetic variability and evolutionary dynamics of viruses of the family *Closteroviridae*. *Frontiers in Microbiology* 4, 1-15.
- Ruiz-Ferrer, V., Voinnet, O., 2009. Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annual Review Plant Biology* 60, 485-510.
- Ruiz-Ruiz, S., Soler, N., Sanchez-Navarro, J., Fagoaga, C., Lopez, C., Navarro, L., Moreno, P., Pena, L., Flores, R., 2013. *Citrus tristeza virus* p23: determinants for nucleolar localization and their influence on suppression of RNA silencing and pathogenesis. *Molecular Plant Microbe Interactions* 26, 306–318.
- Sahana, N., Kaur, H., Jain, R.K., Palukaitis, P., Canto, T., Praveen, S., 2014. The asparagine residue in the FRNK box of potyviral helper-component protease is critical for its small RNA binding and subcellular localization. *Journal of General Virology* 95, 1167–1177.

- Sarmiento, C., Gomez, E., Meier, M., Kavanagh, T.A., Truve, E., 2007. *Cocksfoot mottle virus* P1 suppresses RNA silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana tabacum*. *Virus Research* 123, 95–99.
- Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllón, M.A., Albiach-Martí, M.R., Dawson, W.O., 2002a. Mutational analysis of the replication signals in the 3′-nontranslated region of *Citrus tristeza virus*. *Virology* 300, 140-152.
- Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllón, M.A., Albiach-Martí, M.R., Rabindran, S., Dawson, W.O., 2002b. The p23 protein of *Citrus tristeza virus* controls asymmetrical RNA accumulation. *Journal of Virology* 76, 473-483.
- Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllón, M.A., Dawson, W.O., 2004. Closterovirus bipolar viri6n: evidence for initiation of assembly by minor coat protein and its restriction to the genomic RNA 5′ region. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 101, 799-804.
- Saxena, P., Lomonosoff, G.P., 2014. Virus infection cycle events couple to RNA replication. *Annual Review Phytopathology* 52, 197-212.
- Schnettler, E., Hemmes, H., Huismann, R., Goldbach, R., Prins, M., Kormelink, R., 2010. Diverging affinity of tospovirus RNA silencing suppressor proteins, NSs, for various RNA duplex molecules. *Journal of Virology* 84, 11542–11554.
- Schwach, F., Vaistij, F.E., Jones, L., Baulcombe, D., 2005. An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by *Potato virus X* and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiology* 138, 1842-1852.
- Senshu, H., Ozeki, J., Komatsu, K., Hashimoto, M., Hatada, K., Aoyama, M., Kagiwada, S., Yamaji, Y., Namba, S., 2009. Variability in the level of RNA silencing suppression caused by triple gene block protein 1 (TGBp1) from various potexviruses during infection. *Journal of General Virology* 90, 1014–1024.
- Senshu, H., Yamaji, Y., Minato, N., Shiraishi, T., Maejima, K., Hashimoto, M., Miura, C., Neriya, Y., Namba, S., 2011. A dual strategy for the suppression of host antiviral silencing: two distinct suppressors for viral replication and viral movement encoded by *Potato virus M*. *Journal of Virology* 85, 10269-10278.
- Seo, J.K., Kwon, S.J., Cho, W.K., Choi, H.S., Kim, K.H., 2014. Type 2C protein phosphatase is a key regulator of antiviral extreme resistance limiting virus spread. *Scientific Reports* 4, 5905.

- Shen, M., Xu, Y., Jia, R., Zhou, X., Ye, K., 2010. Size-independent and noncooperative recognition of dsRNA by the *Rice stripe virus* RNA silencing suppressor NS3. *Journal of Molecular Biology* 404, 665–679.
- Shen, W., Yan, P., Gao, L., Pan, X., Wu, J., Zhou, P., 2010. Helper component proteinase (HCPro) protein of *Papaya ringspot virus* interacts with papaya calreticulin. *Molecular Plant Pathology* 11, 335–346.
- Shiboleth, Y.M., Haronsky, E., Leibman, D., Arazi, T., Wassenegger, M., Whitham, S.A., Gaba, V., Gal-On, A., 2007. The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development. *Journal of Virology* 81, 13135–13148.
- Shimura, H., Masuta, C., Yoshida, N., Sueda, K., Suzuki, M., 2013. The 2b protein of *Asparagus virus 2* functions as an RNA silencing suppressor against systemic silencing to prove functional synteny with related cucumoviruses. *Virology* 442, 180–188.
- Shivaprasad, P.V., Chen, H.M., Patel, K., Bond, D.M., Santos, B.A., Baulcombe, D.C., 2012. A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site-leucine-rich repeats and other mRNAs. *Plant Cell* 24, 859–874.
- Shivaprasad, P.V., Rajeswaran, R., Blevins, T., Schoelz, J., Meins, F., Jr., Hohn, T., Pooggin, M.M., 2008. The CaMV transactivator/viroplasm interferes with RDR6-dependent *trans*-acting and secondary siRNA pathways in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* 36, 5896–5909.
- Silhavy, D., Burgyan, J., 2004. Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. *Trends in Plant Science* 9, 76–83.
- Silhavy, D., Molnár, A., Lucioli, A., Szittya, G., Hornyik, C., Tavazza, M., Burgyán, J., 2002. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO Journal* 21, 3070–3080.
- Sivakumaran, K., Kao, C.C., 1999. Initiation of genomic plus-strand RNA synthesis from DNA and RNA templates by a viral RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of Virology* 73, 6415–6423.
- Soosaar, J.L.M., Burch-Smith, T.M., Dinesh-Kumar, S.P., 2005. Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nature Reviews Immunology* 3, 789–798.
- Spoel, S.H., Dong, X., 2012. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology* 12, 89–100.
- Stewart, L.R., Medina, V., Tian, T., Turina, M., Falk, B.W., Ng, J.C., 2010. A mutation in the *Lettuce infectious yellows virus* minor coat protein disrupts whitefly transmission but not in planta systemic movement. *Journal of Virology* 84, 12165–12173.

- Sun, L., Andika, I.B., Kondo, H., Chen, J., 2013a. Identification of the amino acid residues and domains in the cysteine-rich protein of *Chinese wheat mosaic virus* that are important for RNA silencing suppression and subcellular localization. *Molecular Plant Pathology* 14, 265–278.
- Sun, L., Andika, I.B., Shen, J., Yang, D., Ratti, C., Chen, J., 2013b. The CUG-initiated larger form coat protein of *Chinese wheat mosaic virus* binds to the cysteine-rich RNA silencing suppressor. *Virus Research* 177, 66–74.
- Szabo, E.Z., Manczinger, M., Goblos, A., Kemeny, L., Lakatos, L., 2012. Switching on RNA silencing suppressor activity by restoring argonaute binding to a viral protein. *Journal of Virology* 86, 8324–8327.
- Taiwo, M.A., Kareem, K.T., Nsa, I.Y., Hughes, J.D'A., 2007. Cowpea viruses: effect of single and mixed infections on symptomatology and virus concentration. *Virology Journal* 4, 95.
- Takeda, A., Tsukuda, M., Mizumoto, H., Okamoto, K., Kaido, M., Mise, K., Okuno, T., 2005. A plant RNA virus suppresses RNA silencing through viral RNA replication. *EMBO Journal* 24, 3147-3157.
- Tatineni, S., Qu, F., Li, R., Morris, T.J., French, R., 2012. Triticum mosaic poacevirus enlists P1 rather than HC-Pro to suppress RNA silencing-mediated host defense. *Virology* 433, 104–115.
- Te, J., Melcher, U., Howard, A., Verchot-Lubicz, J., 2005. *Soilborne wheat mosaic virus* (SWMV) 19K protein belongs to a class of cysteine rich proteins that suppress RNA silencing. *Virology Journal* 2, 18.
- Thaler, J.S., Humphrey, P.T., Whiteman, N.K., 2012. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science* 17, 260–270.
- Theilmann, J., Mozafari, J., Reade, R., Wu, Z., Xie, W., Jespersen, G., Bernardy, M., Eastwell, K.C., Rochon, D., 2002. Partial nucleotide sequence and genome organization of a canadian isolate of *Little cherry virus* and development of an enzyme-linked immunosorbent assay-based diagnostic test. *Phytopathology* 92, 87-98.
- Thomas, C.L., Leh, V., Lederer, C., Maule, A.J., 2003. *Turnip crinkle virus* coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Virology*, 306, 33-41.
- Tian, T., Rubio, L., Yeh, H.H., Crawford, B., Falk, B.W., 1999. *Lettuce infectious yellows virus: in vitro* acquisition analysis using partially purified virions and the whitefly *Bemisia tabaci*. *Journal of General Virology* 80, 1111-1117.

- Torres-Barceló, C., Darós, J.A., Elena, S.F., 2010. HC-Pro hypo- and hypersuppressor mutants: differences in viral siRNA accumulation in vivo and siRNA binding activity in vitro. *Archives of Virology* 155, 251–254.
- Torres-Barceló, C., Martín, S., Darós, J.A., Elena, S.F., 2008. From Hypo-to Hypersuppression: effect of amino acid substitutions on the RNA silencing suppressor activity of the tobacco etch potyvirus HC-Pro. *Genetics* 180, 1039–1049.
- Trenado, H., Fortes, I., Louro, D., Navas-Castillo, J., 2007. *Physalis ixocarpa* and *P. peruviana*, new natural hosts of *Tomato chlorosis virus*. *European Journal of Plant Pathology* 118, 193–196.
- Tsuda, K., Sato, M., Glazebrook, J., Cohen, J.D., Katagiri, F., 2008. Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses. *Plant Journal* 53, 763–775.
- Tugume, A.K., Amayo, R., Weinheimer, I., Mukasa, S.B., Rubaihayo, P.R., Valkonen, J.P.T., 2013. Genetic variability and evolutionary implications of RNA silencing suppressor genes in RNA1 of *Sweet potato chlorotic stunt virus* isolates infecting sweetpotato and related wild species. *PLoS ONE* 8, e81479.
- Turner, R. L., Buck, K.W., 1999. Mutational analysis of *cis*-acting sequences in the 3′- and 5′- untranslated regions of RNA2 of *Red clover necrotic mosaic virus*. *Virology* 253, 115–124.
- Uhrig, J.F., Canto, T., Marshall, D., MacFarlane, S.A., 2004. Relocalization of nuclear ALY proteins to the cytoplasm by the *Tomato bushy stunt virus* P19 pathogenicity protein. *Plant Physiology* 135, 2411–2423.
- Untiveros, M., Fuentes, S., Salazar, L.F., 2007. Synergistic interaction of *Sweet potato chlorotic stunt virus* (*Crinivirus*) with carla-, cucumo-, ipomo-, and potyviruses infecting sweet potato. *Plant Disease* 91, 669–676.
- Valli, A., Dujovny, G., García, J.A., 2008. Protease activity, self-interaction, and small interfering RNA binding of the silencing suppressor P1b from *Cucumber vein yellowing ipomovirus*. *Journal of Virology* 82, 974–986.
- Valli, A., Martín-Hernández, A.M., López-Moya, J.J., García, J.A., 2006. RNA silencing suppression by a second copy of the P1 serine protease of cucumber vein yellowing ipomovirus, a member of the family *Potyviridae* that lacks the cysteine protease HCPro. *Journal of Virology* 80, 10055–10063.
- Valli, A., Oliveros, J.C., Molnar, A., Baulcombe, D.C., García, J.A., 2011. The specific binding to 21-nt double-stranded RNAs is crucial for the anti-silencing activity of *Cucumber vein yellowing virus* P1b and perturbs endogenous small RNA populations. *RNA* 17, 1148–1158.

- van der Krol, A.R., Mur, L.A., de Lange, P., Gerats, A.G.M., Mol, J.N.M., Stuitje, A.R., 1990. Antisense chalcone synthase genes in petunia: visualization of variable of transgene expression. *Molecular and General Genetics* 220, 204-212.
- van der Vlugt, R.A., Ruiters, R.K., Goldbach, R., 1992. Evidence for sense RNA-mediated protection to PVYN in tobacco plants transformed with the viral coat protein cistron. *Plant Molecular Biology* 20, 631-9.
- van Rij, R.P., Saleh M.C., Berry, B., Foo, C., Houk, A., Antoniewski, C., Andino, R., 2006. The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes & Development* 20, 2985-2995.
- Vance, V.B., 1991. Replication of *Potato virus X* RNA is altered in coinfections with *Potato virus Y*. *Virology* 182, 486-494.
- Vance, V.B., Berger, P.H., Carrington, J.C., Hunt, A.G., Shi, X.M., 1995. 5' proximal potyviral sequences mediate *Potato virus X*/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology* 206, 583-590.
- Várallyay, E., Havelda, Z., 2013. Unrelated viral suppressors of RNA silencing mediate the control of ARGONAUTE1 level. *Molecular Plant Pathology* 14, 567-575.
- Várallyay, E., Olah, E., Havelda, Z., 2014. Independent parallel functions of p19 plant viral suppressor of RNA silencing required for effective suppressor activity. *Nucleic Acid Research* 42, 599-608.
- Várallyay, E., Valoczi, A., Agyi, A., Burgyan, J., Havelda, Z., 2010. Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *EMBO Journal* 29, 3507-3519.
- Vargason, J., Szittyá, G., Burgyán, J., Tanaka-Hall, T.M., 2003. Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* 115, 799-811.
- Vaucheret, H., 2006. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes & Development* 20, 759-771.
- Villanueva, F., 2014. Caracterización molecular de virus emergentes patógenos de tomate y pimiento y virus persistentes de aguacate. Tesis doctoral, Universidad de Málaga.
- Vogler, H., Akbergenov, R., Shivaprasad, P.V., Dang, V., Fasler, M., Kwon, M.O., Zhanibekova, S., Hohn, T., Heinlein, M., 2007. Modification of small RNAs associated with suppression of RNA silencing by tobamovirus replicase protein. *Journal of Virology* 81, 10379-10388.
- Voinnet, O., 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in Genetics* 17, 449-459.

- Voinnet, O., 2005. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nature Reviews Genetics* 6, 206-220.
- Voinnet, O., 2008. Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends in Plant Science* 13, 317-328.
- Voinnet, O., Pinto, Y.M., Baulcombe, D., 1999. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 14147-14152.
- Wang, H., Buckley, K.J., Yang, X., Buckman, R.C., Bisaro, D.M., 2005. Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Journal of Virology* 79, 7410-7518.
- Wang, H., Hao, L., Shung, C.Y., Sunter, G., Bisaro, D.M., 2003. Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Plant Cell* 15, 3020-3032.
- Wang, K.D., Empleo, R., Nguyen, T.T., Moffett, P., Sacco, M.A., 2014. Elicitation of hypersensitive responses in *Nicotiana glutinosa* by the suppressor of RNA silencing protein P0 from poleroviruses. *Molecular Plant Pathology* 16, 435-448.
- Wang, L.Y., Lin, S.S., Hung, T.H., Li, T.K., Lin, N.C., Shen, T.L., 2012. Multiple domains of the *Tobacco mosaic virus* p126 protein can independently suppress local and systemic RNA silencing. *Molecular Plant Microbe Interactions* 25, 648-657.
- Wang, M.B., Masuta, C., Smith, N.A., Shimura, H., 2012. RNA silencing and plant viral diseases. *Molecular Plant Microbe Interactions* 25, 1275-1285.
- Wang, M.B., Metzloff, M., 2005. RNA silencing and antiviral defense in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 216-222.
- Wang, X.B., Jovel, J., Udomporn, P., Wang, Y., Wu, Q., Li, W.X., Gascioli, V., Vaucheret, H., Ding, S.W., 2011. The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative argonautes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23, 1625-1638.
- Wang, X.B., Wu, Q., Ito, T., Cillo, F., Li, W.X., Chen, X., Yu, J.L., Ding, S.W., 2010. RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 484-489.
- Wang, Y., Lee, K.C., Gaba, V., Wong, S.M., Palukaitis, P., Gal-On, A., 2004. Breakage of resistance to *Cucumber mosaic virus* by co-infection with *Zucchini yellow mosaic virus*: enhancement of CMV accumulation independent of symptoms expression. *Archives of Virology* 149, 379-396.

- Weber, H., Ohnesorge, S., Silber, M.V., Pfitzner, A.J.P., 2004. The *Tomato mosaic virus* 30 kDa movement protein interacts differentially with the resistance genes Tm-2 and Tm-22. *Archives of Virology* 149, 1499-1514.
- Weinheimer, I., Boonrod, K., Moser, M., Zwiebel, M., Füllgrabe, M., Krczal, G., Wassenegger, M., 2010. Analysis of an autoproteolytic activity of *Rice yellow mottle virus* silencing suppressor P1. *Journal of Biological Chemistry* 391, 271–281.
- Weinheimer, I., Jiu, Y., Rajamäki, M.L., 2015. Suppression of RNAi by dsRNA-degrading RNaseIII enzymes of viruses in animals and plants. *PLoS Pathogens* 11, e1004711.
- Wintermantel, W.M., Wisler, G.C., 2006. Vector specificity, host range, and genetic diversity of *Tomato chlorosis virus*. *Plant Disease* 90, 814-819.
- Wintermantel, W.M., Wisler, G.C., Anchieta, A.G., Liu, H.Y., Karasev, A.V., Tzanetakis, I.E., 2005. The complete nucleotide sequence and genome organization of *Tomato chlorosis virus*. *Archives of Virology* 150, 2287-2298.
- Wisler, G.C., Duffus, J.E., Liu, H.Y., Li, R.H., 1998a. Ecology and epidemiology of whitefly transmitted closteroviruses. *Plant Disease* 82, 270-280.
- Wisler, G.C., Li, R.H., Liu, H.Y., Lowry, D.S., Duffus, J.E., 1998b. *Tomato chlorosis virus*: A new whitefly-transmitted, phloem-limited, bipartite closterovirus of tomato. *Phytopathology* 88, 402-409.
- Xia, Z., Zhu, Z., Zhu, J., Zhou, R., 2009. Recognition mechanism of siRNA by viral p19 suppressor of RNA silencing: a molecular dynamics study. *Biophysical Journal* 496, 1761–1769.
- Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S.E., Carrington, J.C., 2004. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biology* 2, 0642-0652.
- Xiong, R., Wu, J., Zhou, Y., Zhou, X., 2009. Characterization and subcellular localization of an RNA silencing suppressor encoded by rice stripe tenuivirus. *Virology* 387, 29–40.
- Yaegashi, H., Takahashi, T., Isogai, M., Kobori, T., Ohki, S., Yoshikawa, N., 2007. *Apple chlorotic leaf spot virus* 50 kDa movement protein acts as a suppressor of systemic silencing without interfering with local silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of General Virology* 88, 316–324.
- Yaegashi, H., Tamura, A., Isogai, M., Yoshikawa, N., 2008. Inhibition of long-distance movement of RNA silencing signals in *Nicotiana benthamiana* by *Apple chlorotic leaf spot virus* 50 kDa movement protein. *Virology* 382, 199–206.

- Yambao, M.L., Yagihashi, H., Sekiguchi, H., Sekiguchi, T., Sasaki, T., Sato, M., Atsumi, G., Tacahashi, Y., Nakahara, K.S., Uyeda, I., 2008. Point mutations in helper component protease of *Clover yellow vein virus* are associated with the attenuation of RNA-silencing suppression activity and symptom expression in broad bean. *Archives of Virology* 153, 105-115.
- Yan, F., Lu, Y., Lin, L., Zheng, H., Chen, J., 2012. The ability of PVX p25 to form RL structures in plant cells is necessary for its function in movement, but not for its suppression of RNA silencing. *PLoS ONE* 7, e43242.
- Yang, J.Y., Iwasaki, M., Machida, C., Machida, Y., Zhou, X., Chua, N.H., 2008. bC1, the pathogenicity factor of TYLCCNV, interacts with AS1 to alter leaf development and suppress selective jasmonic acid responses. *Genes & Development* 22, 2564-2577.
- Yang, X., Xie, Y., Raja, P., Li, S., Wolf, J.N., Shen, Q., Bisaro, D.M., Zhou, X., 2011. Suppression of methylation-mediated transcriptional gene silencing by betaC1-SAHH protein interaction during geminivirus-betasatellite infection. *PLoS Pathogens* 7, e1002329.
- Ye, J., Qu, J., Zhang, J.F., Geng, Y.F., Fang, R.X., 2009. A critical domain of the *Cucumber mosaic virus* 2b protein for RNA silencing suppressor activity. *FEBS Letters* 583, 101-106.
- Ye, K., Malinina, L., Patel, D.J., 2003. Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature* 426, 874-878.
- Ye, K., Patel, D.J., 2005. RNA silencing suppressor p21 of *Beet yellows virus* forms an RNA binding octameric ring structure. *Structure* 13, 1375-1384.
- Yelina, N.E., Savenkov, E.I., Solovyev, A.G., Morozov, S.Y., Valkonen, J.P., 2002. Long-distance movement, virulence, and RNA silencing suppression controlled by a single protein in hordei- and potyviruses: complementary functions between virus families. *Journal of Virology* 76, 12981-12991.
- Yi, S.Y., Shirasu, K., Moon, J.S., Lee, S.G., Kwon, S.Y., 2014. The activated SA and JA signaling pathways have an influence on flg22-triggered oxidative burst and callose deposition. *PLoS ONE* 9, e88951.
- Young, B.A., Stenger, D.C., Qu, F., Morris, T.J., Tatineni, S., French, R., 2012. Tritimovirus p1 functions as a suppressor of RNA silencing and enhancer of disease symptoms. *Virus Research* 163, 672-677.
- Yu, B., Chapman, E.J., Yang, Z., Carrington, J.C., Chen, X., 2006. Transgenically expressed viral RNA silencing suppressors interfere with microRNA methylation in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* 580, 3117-3120.

- Zeng, R., Liao, Q., Feng, J., Li, D. and Chen, J., 2007. Synergy between *Cucumber mosaic virus* and *Zucchini yellow mosaic virus* on *Cucurbitaceae* hosts tested by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 39, 431–437.
- Zhai, Y., Bag, S., Mitter, N., Turina, M., Pappu, H.R., 2014. Mutational analysis of two highly conserved motifs in the silencing suppressor encoded by *Tomato spotted wilt virus* (genus *Tospovirus*, family *Bunyaviridae*). *Archives of Virology* 159, 1499–1504.
- Zhang, G., Chen, M., Li, L., Xu, Z., Chen, X., Guo, J., Ma, Y., 2009. Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. *Journal of Experimental Botany* 60, 3781–3796.
- Zhang, W., Gao, S., Zhou, X., Xia, J., Chellappan, P., Zhou, X., Zhang, X., Jin, H., 2010. Multiple distinct small RNAs originated from the same microRNA precursors. *Genome Biology* 11, R81.
- Zhang, X., Du, P., Lu, L., Xiao, Q., Wang, W., Cao, X., Ren, B., Wei, C., Li, Y., 2008. Contrasting effects on HCPro and 2b viral suppressors from *Sugarcane mosaic virus* and *Tomato aspermy cucumovirus* on the accumulation of siRNAs. *Virology* 374, 351–360.
- Zhang, X., Yuan, Y.R., Pei, Y., Lin, S.S., Tuschl, T., Patel, D.J., Chua, N.H., 2006. *Cucumber mosaic virus*-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes & Development* 20, 3255–3268.
- Zhang, X., Zhand, X., Singh, J., Li, D., Qu, F., 2012. Temperature-dependent survival of *Turnip crinkle virus*-infected *Arabidopsis* plants relies on an RNA silencing based defense that requires DCL2, AGO2 and HEN1. *Journal of Virology* 86, 6847–6854.
- Zhao, L.M., Li, G., Gao, Y., Liu, Y.J., Sun, G.Z., Zhu, X.P., 2014. Molecular detection and complete genome sequences of *Tomato chlorosis virus* isolates from infectious outbreaks in China. *Journal of Phytopathology* 162, 627–634.
- Zhou, Z.Sh., Dell’Orco, M., Saldarelli, P., Turturo C., Minafra, A., Martelli, G.P., 2006. Identification of an RNA silencing suppressor in the genome of *Grapevine virus A*. *Journal of General Virology* 87, 2387–2395.
- Zhu, F., Xi, D.H., Yuan, S., Xu, F., Zhang, D.W., Lin, H.H., 2014. Salicylic acid and jasmonic acid are essential for systemic resistance against *Tobacco mosaic virus* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant Microbe Interactions Journal* 27, 567–577.

- Zhu, S., Lim, G.H., Yu, K., Jeong, R.D., Kackroo, A., Kachroo, P., 2014. RNA silencing components mediate resistance signaling against *Turnip crinkle virus*. *Plant Signal Behaviour* 9, e28435.
- Zhu, S., Jeong, R.D., Lim, G.H., Yu, K., Wang, C., Chandra-Shekara, A.C., Navarre, D., Klessig, D.F., Kachroo, A., Kachroo, P., 2013. Double-stranded RNA-binding protein 4 is required for resistance signaling against viral and bacterial pathogens. *Cell Reports* 4, 1168–1184.
- Ziebell, H., Murphy, A.M., Groen, S.C., Tungadi, T., Westwood, J.H., Lewsey, M.G., Moulin, M., Kleczkowski, A., Smith, A.G., Stevens, M., Powell, G., Carr, J.P., 2011. *Cucumber mosaic virus* and its 2b RNA silencing suppressor modify plant-aphid interactions in tobacco. *Scientific Reports* 1, 187.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

