

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular

**MicroRNAs artificiales como fuente de  
resistencia antiviral y diversidad**

**Memoria presentada por Frida Mesel Casanova  
para optar al Título de Doctor**

*Esta tesis se ha realizado en el Departamento de Genética Molecular de Plantas del  
Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) bajo la dirección de los  
Drs. **Carmen Simón Mateo** y **Juan Antonio García Álvarez***

*El trabajo presentado en esta memoria ha sido posible gracias al disfrute de la beca  
pre doctoral de la **Fundación Obra Social La Caixa***

Madrid, Marzo de 2018

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento al Dr. Juan Antonio García y la Dra. Carmen Simón Mateo por la atención y por el tiempo dedicado en dirigir esta tesis.

A Dra. Mingmin Zhao por enseñarme y motivarme en el inicio de todo.

Al Dr. Lorenzo Burgos (CEBAS-Murcia) y su grupo, en particular a Nuria Albuquerque, por el tiempo y esfuerzo dedicado en la transformación de los árboles.

A mis compañeros del laboratorio 313: Beatriz, Araíz, Hongying, Sandra, Marta, Bernardo, Adrián y todos que han estado presentes durante mi estancia.

A todo el personal del CNB que de manera directa o indirectamente me han ayudado.

A la Fundación Obra Social La Caixa por la concesión de la beca pre doctoral.

A mi familia, aunque lejos, no dejan de estar presentes. Muito obligada!

A mi compañero de vida, por estar siempre a mi lado y no dudar nunca de mi capacidad.

Gracias.

## ABSTRACT

Sharka disease, caused by *Plum pox virus* (PPV), is a persistent threat to the production of stone fruit trees of the *Prunus* genus, and novel approaches for protection are needed. Artificial miRNAs (amiRNAs) technology exploits the natural miRNA-mediated RNA silencing mechanism to achieve effective post-transcriptional gene silencing (PTGS) against endogenous genes or pathogens. In order to study in detail this biotechnological tool to develop PPV resistance and understand how the virus can evolve to escape from antiviral pressure, we have developed *Nicotiana benthamiana* and *Prunus domestica* transgenic plants expressing amiRNAs targeting N1b, CP and 3'UTR PPV RNA regions. Several *N. benthamiana* transgenic lines expressing two of these amiRNAs showed complete protection against PPV-R and one *P. domestica* line showed preliminary results showing also resistance. A large diversity of virus variants with different mutations in the amiRNA targets emerged in some of the *N. benthamiana* infected transgenic plants. Several viral species, often with more than one mutation, appeared in independent infected plants and transition mutations were generated at higher frequency than transversions. Moreover, mutations at nucleotides 9 and 10 of the amiRNA target sequence in the PPV genome were favored. Sequence analyses of different escaping mutants suggest that targeting viral complementary RNA by the amiRNA star strand also contribute to the viral resistance. This hypothesis was confirmed by the analysis of RISC cleavage sites in infected *N. benthamiana* plants expressing high amounts of amiRNA targeting the complementary strand of the CP region in the viral RNA. Broadness of the antiviral infection was assessed by inoculating *N. benthamiana* transgenic plants with PPV isolates PPV-PS and PPV-SwCM, which differ in 1 to 3 nt from PPV-R in the amiRNA targets. Whereas one mismatch located only in the seed of the star strand does not prevent amiRNA antiviral activity, mismatches in the seeds of both facilitated virus infection in transgenic plants. Interestingly, some PPV-R escaping mutants at the amiRNA target sequence mimicked the nucleotide sequence of the natural PPV-PS and PPV-SwCM isolates, which could suggest the paths by which viruses evolve, by drift or under different selective pressures, are limited.

## RESUMEN

La sharka es probablemente la enfermedad más importante de frutales de frutos con hueso en Europa cuyo agente causal es el virus conocido como *Plum pox virus* (PPV). La enfermedad va acompañada de elevadas pérdidas económicas, de ahí la importancia de desarrollar procedimientos de prevención y tratamiento. La tecnología de los microRNAs artificiales (amiRNAs) utiliza el mecanismo natural de silenciamiento de RNA mediado por miRNAs para conseguir un efectivo silenciamiento genético post transcripcional (PTGS) contra genes endógenos, que también se puede usar como defensa contra patógenos. Con objeto de estudiar esta herramienta biotecnológica en detalle para desarrollar resistencia frente al PPV y entender cómo el virus evoluciona para escaparse de la presión antiviral, hemos desarrollado plantas transgénicas de *Nicotiana benthamiana* y *Prunus domestica* que expresan amiRNAs dirigidos a las regiones NIB, CP y 3' no codificante del RNA viral. Varias líneas transgénicas que expresan dos de estos amiRNAs mostraron protección completa contra PPV-R y resultados preliminares de una línea de *P. domestica* también mostró resistencia. En las plantas de líneas transgénicas de *N. benthamiana* no completamente resistentes se originó una gran variedad de variantes virales con diferentes mutaciones en las dianas de los amiRNAs. El análisis de la secuencia de los diferentes mutantes, que mostraba una preferencia por los cambios en las posiciones 9 y 10 de la diana de los amiRNAs en el genoma del PPV, sugería que la acción del amiRNA estrella sobre la secuencia complementaria del RNA viral también contribuye a la resistencia antiviral. Esta hipótesis fue confirmada mediante la caracterización por 5'-RACE de los sitios de corte por RISC en plantas de *N. benthamiana* que expresan altas cantidades del amiRNA dirigido a la hebra complementaria de la región CP del RNA viral. El alcance de la resistencia antiviral se evaluó inoculando plantas de *N. benthamiana* transgénicas con los aislados PPV-PS y PPV-SwCM, que pertenecen a razas distintas del aislado PPV-R. Las plantas transgénicas que expresan un amiRNA dirigido a una región de la secuencia codificante de la CP eran resistentes frente a los aislados de las tres razas del PPV analizadas. Es interesante que algunos mutantes con cambios en la diana de PPV-R que escapan de la acción de los amiRNAs imitan la secuencia nucleotídica natural de los aislados PPV-PS y PPV-SwCM, lo que sugiere que la manera por la cual los virus evolucionan, sea por deriva genética o bajo diferentes presiones selectivas, son limitadas.



# ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| ABREVIATURAS Y ANGLICISMO .....   | xiii      |
| VIRUS CITADOS .....   | xv        |
| <b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>  | <b>17</b> |
| <b>I.1 PPV y sharka .....</b>   | <b>17</b> |
| I.1.1 Epidemiología y razas del PPV.....  | 19        |
| I.1.2 Estructura genómica del PPV .....   | 19        |
| <b>I.2 Resistencia antiviral.....</b>   | <b>22</b> |
| I.2.1 Resistencia clásica.....  | 22        |
| I.2.2 Resistencia por ingeniería genética.....  | 22        |
| <b>I.3 Resistencia mediada por silenciamiento de RNA.....</b>   | <b>23</b> |
| I.3.1 Mecanismo molecular del silenciamiento de RNA .....   | 23        |
| I.3.2 Estrategias de resistencias por silenciamiento de RNA clásicas.....   | 29        |
| <b>I.4 Resistencia mediada por miRNAs artificiales (amiRNAs) .....</b>  | <b>31</b> |
| I.4.1 Biogénesis de los miRNAs y asimetría de carga en los complejos RISC.....  | 31        |
| I.4.2 Uso de amiRNAs como herramienta biotecnológica en plantas.....  | 33        |
| I.4.3 Uso de amiRNAs para generar resistencia viral frente a virus en plantas.....                                      | 34        |
| I.4.4 Uso de sRNAs artificiales como instrumento antiviral frente a virus animales ...                                  | 36        |
| <b>I.5 Resistencia antiviral mediante silenciamiento de RNA en agronomía.....</b>                                       | <b>38</b> |
| <b>II. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>  | <b>42</b> |
| <b>II.1 MATERIAL BIOLÓGICO .....</b>  | <b>42</b> |
| II.1.1 Plantas.....   | 42        |
| II.1.2 Bacterias .....  | 42        |
| II.1.3 Virus.....   | 43        |
| <b>II.2 ANTIBIÓTICOS .....</b>  | <b>43</b> |
| <b>II.3 INOCULACIÓN VIRAL DE PLANTAS.....</b>   | <b>44</b> |
| II.3.1 Inoculación manual .....   | 44        |
| II.3.2 Inoculación mediante agroinfiltración de <i>A. tumefaciens</i> .....   | 44        |
| <b>II.4 PREPARACIÓN Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....</b>   | <b>44</b> |
| II.4.1 Purificación de DNA.....   | 44        |
| II.4.2 Purificación de RNA .....  | 45        |
| II.4.3 Separación y extracción de fragmentos de DNA por electroforesis en geles de agarosa .....                        | 45        |
| II.4.4 Amplificación de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ...                                      | 46        |
| II.4.5 Amplificación de DNA complementario a un RNA viral mediante PCR precedida de transcripción reversa (RT-PCR)..... | 46        |
| II.4.6 Amplificación DNA complementario del RNA viral mediante inmunocaptura seguida de RT-PCR (IC-RT-PCR) .....        | 46        |
| II.4.7 RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) .....   | 47        |
| II.4.8 Cuantificación de la acumulación de pequeños RNAs por análisis de Northern blot.....                             | 49        |
| II.4.9 Secuenciación de DNA.....  | 51        |
| II.4.10 Secuenciación masiva por el método MiSeq.....   | 51        |
| <b>II.5 CLONACIÓN EN PLÁSMIDOS .....</b>  | <b>52</b> |
| II.5.1 Construcción de los plásmidos que codifican a los precursores de amiRNAs (pre-amiRNAs).....                      | 52        |
| II.5.2 Clonación del cDNA de los extremos 5' de fragmentos de RNA viral.....  | 55        |
| <b>II.6 TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS DE <i>N. benthamiana</i> y <i>P. domestica</i>.....</b>                               | <b>57</b> |
| <b>II.7 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....</b>  | <b>58</b> |
| II.7.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida y detección por Western Blot .....                                     | 58        |

|  |            |
|--|------------|
| II.7.2 Detección de la proteína fluorescente verde (GFP) .....   | 59         |
| <b>III. RESULTADOS .....</b>   | <b>60</b>  |
| <b>III.1. Distintos microRNAs artificiales difieren en su capacidad de proteger frente al PPV.....</b>   | <b>60</b>  |
| III.1.1 La expresión transgénica de amiR-C y amiR-D, individual o conjunta, pero no la de amiR-H, es capaz de proteger a <i>N. benthamiana</i> frente a la infección por el PPV ...  | 61         |
| III.1.2 La resistencia antiviral está positivamente correlacionada con los niveles de acumulación del amiRNA .....   | 66         |
| <b>III.2 Diversas mutaciones en la diana del amiRNA permiten al PPV escapar de su acción antiviral .....</b>   | <b>73</b>  |
| III.2.1 Aunque la infección de plantas parcialmente resistentes como consecuencia de la expresión de amiRNAs crea una amplia diversidad de especies del PPV, algunas mutaciones, diferentes para cada amiRNA, parecen favorecerse.....                 | 73         |
| III.2.2 Varias especies del PPV, por lo general con más de una mutación, se seleccionan en las plantas que expresan amiRNAs infectadas .....   | 77         |
| III.2.3 La resistencia frente al PPV causada por amiR-D es de amplio espectro .....  | 78         |
| <b>III.3 La banda de RNA anti-genómica (negativa) del PPV puede ser diana efectiva de amiRNAs .....</b>  | <b>81</b>  |
| III.3.1 Las plantas de <i>N. benthamiana</i> que expresan amiR-Di son capaces de generar cierta resistencia frente a la infección por PPV .....  | 82         |
| III.3.2 La banda predicha como amiRNA maduro, complementaria del RNA anti-genómico del PPV, es la que se acumula preferentemente en las plantas transformadas con la construcción amiR-Di.....   | 84         |
| III.3.3 La expresión de amiR-Di tiene un efecto antiviral que promueve la emergencia de variantes del PPV con mutaciones en la diana del amiRNA.....   | 86         |
| III.3.4. En una planta transgénica que expresa amiR-Di, se corta la hebra anti-genómica del RNA del PPV en el sitio esperado para el procesamiento por RISC dirigido por este amiRNA.....  | 92         |
| <b>III.4 Potencial evolutivo de las especies del PPV surgidas bajo la presión selectiva de amiRNAs .....</b>   | <b>94</b>  |
| III.4.1 Las mutaciones seleccionadas bajo la presión selectiva de amiRNAs pueden mantenerse en plantas silvestres .....  | 94         |
| III.4.2 La población viral generada en plantas que expresan amiRNAs puede ver aumentada su complejidad cuando se propaga en las mismas líneas transgénicas....   | 98         |
| III.4.3 Las mutaciones seleccionadas en líneas amiR-D poco resistentes pueden facilitar la infección por PPV de líneas transformadas con el mismo amiRNA con resistencia fuerte .....  | 102        |
| <b>III.5. Pequeños cambios en la diana elegida pueden mejorar la eficacia de las acciones antivirales mediadas por amiRNAs.....</b>  | <b>103</b> |
| III.5.1 La plantas que expresan amiR-H <sub>+3</sub> son más resistentes al PPV que las que expresan amiR-H, amiR-H <sub>-1</sub> o amiR-Hm .....  | 105        |
| III.5.2 Las mutaciones que permiten al PPV escapar de la resistencia mediada por amiRNAs de la familia H afectan preferentemente a las mismas posiciones relativas de sus respectivas dianas.....  | 108        |
| III.5.3 Mutaciones aparecidas bajo la presión selectiva de un amiRNA H facilitan la infección en presencia de otro amiRNA de la misma familia con una diana cercana, pero no impiden la emergencia de variantes virales con mutaciones adicionales.... | 110        |
| III.5.4 El nivel de expresión de amiRNA-H <sub>+3</sub> se correlaciona positivamente con la resistencia antiviral .....   | 113        |
| <b>III.6 La resistencia frente al PPV causada por amiRNAs puede resultar eficiente en <i>P. domestica</i> .....</b>  | <b>115</b> |
| III.6.1 Algunas líneas de <i>P. domestica</i> transformadas con la construcción amiR-C+D presentan resistencia frente al PPV.....  | 116        |

|   |            |
|---|------------|
| III.6.2 La resistencia frente al PPV en líneas de <i>P. domestica</i> transformadas con la construcción amiR-C+D se correlaciona con un mayor nivel de acumulación de, al menos, amiR-C ..... | 118        |
| <b>IV. DISCUSIÓN .....</b>  | <b>120</b> |
| IV.1 ¿Por qué diferentes amiRNAs confieren diferentes niveles de resistencia antiviral? .....   | 120        |
| IV.2 ¿Qué nos dice acerca de la acción de los amiRNAs el análisis de la secuencia de los virus mutantes que se escapan de ella? .....   | 126        |
| IV.3 ¿Cuál es el potencial evolutivo de las especies virales surgidas bajo la presión selectiva de amiRNAs? .....   | 134        |
| IV.4 ¿La actividad antiviral de amiRNAs frente al PPV en <i>N. benthamiana</i> es extrapolable a sus huéspedes naturales del genero <i>Prunus</i> ? .....                                     | 139        |
| <b>V. CONCLUSIONES .....</b>  | <b>142</b> |
| <b>VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>144</b> |

## ABREVIATURAS

aa: aminoácidos  
AGO: Proteínas Argonautas  
Amp: Ampicilina  
amiRNA: microRNA artificial  
BAP: Benzil amino purina  
cDNA: DNA complementario  
CI: Proteína de inclusión cilíndrica  
CP: Proteína de la cápsida  
C-terminal: Carboxilo terminal  
CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio  
DCL: Enzima tipo Dicer  
DNA: Ácido desoxirribonucleico  
dpi: Días después de la inoculación  
dsDNA: DNA bicatenario  
EDTA: Ácido etilén-diamino tetra-acético  
g: fuerza de la gravedad  
Gen: gentamicina  
GFP: Proteína de fluorescencia verde  
IGg: Inmunoglobulina G  
HCPro: Componente auxiliar  
hpRNA: RNA de doble cadena en forma de horquilla  
IC-RT-PCR: Inmunocaptura precedida de RT-PCR  
Kan: Kanamicina  
LB: Medio de cultivo Luria-Bertani  
MES: Ácido 4-morfolinetanosulfónico  
MOPS: Ácido 4-morfolinpropanonosulfónico  
miRNA: microRNA  
mRNA: RNA mensajero  
NAA: Ácido 1-naftalen acético  
NCR: Región no codificante  
NIa: Proteína de inclusión nuclear a  
NIb: Proteína de inclusión nuclear b  
nt: Nucleótido  
N-terminal: Amino terminal  
PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida  
PAP: Poli A polimerasa  
pb: pares de base  
PBS: Tampón fosfato salino  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
PIPO: *Pretty Interesting Potyviridae ORF*  
PTGS: Silenciamiento génico post-transcripcional

PVPP: Polivinilpolipirrolidona  
RACE: Amplificación rápida de extremos cDNA  
RDR: RNA polimerasa dependiente de RNA  
Rif: Rifampicina  
RISC: Complejo de silenciamiento inducido por RNA  
RNA: Ácido ribonucleico  
RNAi: Interferencia por RNA  
RT: Transcriptasa reversa  
RT-PCR: PCR precedida de transcripción reversa  
RT-qPCR: PCR en tiempo real precedida de transcripción reversa  
SDS: Dodecilsulfato sódico  
SGS3: *Supressor Gene Silencing 3*  
SSC: Solución citrato salina  
ssDNA: DNA monocatenario  
gRNA: RNA genómico  
ssRNA(+): RNA monocatenario de sentido positivo  
ssRNA(-): RNA monocatenario de sentido negativo  
siRNA: Pequeños RNAs interferentes  
tasiRNA: siRNA activo en *trans*  
TGS: Silenciamiento génico transcripcional  
UV: Ultravioleta  
VSR: Supresor de silenciamiento de RNA viral

## VIRUS CITADOS

|        |                                       |
|--------|---------------------------------------|
| BaMV   | <i>Bamboo mosaic virus</i>            |
| BGMV   | <i>Bean golden mosaic virus</i>       |
| BCTV   | <i>Beet curly top virus</i>           |
| BMV    | <i>Brome mosaic virus</i>             |
| CaLCuV | <i>Cabbage leaf curl virus</i>        |
| CaMV   | <i>Cauliflower mosaic virus</i>       |
| CMV    | <i>Cucumber mosaic virus</i>          |
| HCV    | <i>Hepatitis C virus</i>              |
| HDV    | <i>Hepatitis delta virus</i>          |
| HIV    | <i>Human immunodeficiency virus</i>   |
| IAV    | <i>Influenza A virus</i>              |
| PRSV   | <i>Papaya ringspot virus</i>          |
| PBNV   | <i>Peanut bud necrosis virus</i>      |
| PPV    | <i>Plum pox virus</i>                 |
| PVY    | <i>Potato virus Y</i>                 |
| PVX    | <i>Potato virus X</i>                 |
| RSV    | <i>Respiratory syncytial virus</i>    |
| TCV    | <i>Turnip crinkle virus</i>           |
| TYMV   | <i>Turnip yellow mosaic virus</i>     |
| TuMV   | <i>Turnip mosaic virus</i>            |
| TMV    | <i>Tobacco mosaic virus</i>           |
| TRV    | <i>Tobacco rattle virus</i>           |
| TEV    | <i>Tobacco etch virus</i>             |
| TVMV   | <i>Tobacco vein mottling virus</i>    |
| TBSV   | <i>Tomato bushy stunt virus</i>       |
| TSWV   | <i>Tomato spotted wilt virus</i>      |
| WSMoV  | <i>Watermelon silver mottle virus</i> |

## I. INTRODUCCIÓN

Los virus de plantas se encuentran entre las principales causas de pérdidas económicas en la producción de cultivos en todo el mundo. Además, los cambios ecológicos y el calentamiento global junto con las prácticas intensivas agronómicas hacen que el problema muy probablemente se acentúe en el futuro por la aparición de nuevos virus de plantas (Elena *et al.*, 2014).

Dentro del grupo de los 10 virus de plantas que se han considerado más relevantes desde los puntos de vista científico y económico (Scholthof *et al.*, 2011b) ocho de ellos tienen un genoma de RNA: *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Potato virus Y* (PVY), *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), *Brome mosaic virus* (BMV), *Potato virus X* (PVX) y, por último, *Plum pox virus* (PPV), que ha sido el objeto de estudio de esta tesis.

### I.1 PPV y sharka

El grupo más numeroso de virus de plantas con genoma de RNA, que incluye miembros de gran relevancia socioeconómica, es el formado por la familia *Potyviridae* que engloba más de 200 especies, clasificadas en 10 géneros (Wylie *et al.*, 2017; <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>). La mayoría de los virus de la familia *Potyviridae* pertenecen al género *Potyvirus*, que comprende 168 especies diferentes descritas hasta la fecha (<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>). De modo que los potyvirus constituyen cerca del 20% de todos los virus de plantas y muchos de ellos se encuentran entre los que producen grandes pérdidas agrícolas y económicas a nivel mundial. Un ejemplo de esto es la enfermedad conocida como sharka, causada por el potyvirus PPV, que afecta a frutales de hueso como albaricoqueros, melocotoneros y ciruelos, aunque también se ha detectado en otras especies del género *Prunus* cultivadas o silvestres (García *et al.*, 2014) y en condiciones experimentales se puede propagar en diferentes especies herbáceas, como *Pisum sativum*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana clevelandii* o *Arabidopsis thaliana* (Llácer, 2006).

Cinco factores principales contribuyen a las elevadas pérdidas económicas que causa el PPV: (1) el virus se transmite eficientemente a través de numerosas especies de pulgones, lo que facilita la propagación de la epidemia y dificulta su control; (2) los síntomas de la enfermedad pueden ser desde prácticamente imperceptibles, ayudando a

su fácil propagación, a muy severos, llegando a causar pérdidas del 100% de la producción en las variedades más susceptibles; (3) los huéspedes se propagan vegetativamente, lo que facilita la propagación del virus a escala local y global; (4) los huéspedes son altamente susceptibles y hay muy pocos sistemas de resistencia identificados, lo que dificulta los esfuerzos para obtener cultivos resistentes; (5) la implantación de cuarentena en la mayoría de las regiones productoras requiere de una alta vigilancia y altos costes lo que provoca una limitada eficacia en la prevención de la entrada de PPV en regiones que no se han visto afectadas (Scholthof *et al.*, 2011b).

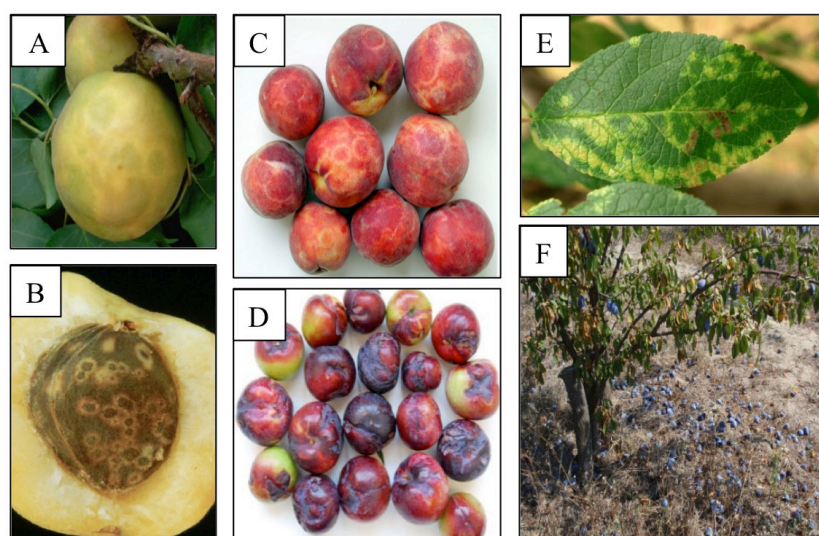


Figura I.1. Síntomas típicos causados por el PPV. Síntomas típicos inducidos en fruto de albaricoque (A), hueso de albaricoque (B), frutos de melocotón (C), frutos de ciruelo (D) y hojas de ciruelo (E). F) Caída prematura de los frutos de un ciruelo. Las fotos están tomadas de (García *et al.*, 2014).

La enfermedad fue detectada por primera vez en ciruelos en Bulgaria en 1915 y la naturaleza viral del problema se describió en 1932 (Atanasoff, 1932). Desde entonces, el virus se ha propagado progresivamente a casi toda Europa y también a otros continentes como América y Asia. Los síntomas pueden aparecer en tallos, cortezas, pétalos, frutos e incluso en huesos (Figura I.1) y difieren según el aislado viral, la especie y variedad de la planta huésped, y la estación del año (Dosba *et al.*, 1986). Los frutos infectados presentan manchas cloróticas o anillos de color amarillo, adquieren formas irregulares y pueden llegar a desarrollar áreas necróticas de color marrón, lo cual impide su comercialización (Dosba *et al.*, 1986).



### I.1.1 Epidemiología y razas del PPV

El tráfico no controlado como consecuencia de los insuficientes controles de intercambio de material vegetal en el mercado global es la principal vía de dispersión del PPV a largas distancias. El PPV también se transmite mediante injertos, y la multiplicación vegetativa de plantas infectadas aumenta sustancialmente la propagación del virus en áreas que no están certificadas como libre de virus. La introducción de plantas infectadas por la mano del hombre va seguida de la diseminación natural del virus por numerosas especies de pulgones capaces de transmitirlo por un mecanismo no persistente. *Myzus persicae*, *Aphis spiricola* y *Hyalopterus pruni* han mostrado ser los principales vectores naturales del PPV (Cambra *et al.*, 2006; Gildow *et al.*, 2004). No hay evidencias que confirmen la transmisión del PPV por semillas o polen en ningún huésped de *Prunus* (Pasquini y Barba, 2006).

La eficiencia de la transmisión natural por pulgones y el modelo espacial de diseminación de la sharka difieren entre las diferentes cepas del PPV y entre los diferentes cultivares implicados (Dallot *et al.*, 2003; Sutic *et al.*, 1976). Las cepas del PPV más prevalentes son M (Marcus), D (Dideron) y Rec (Recombinante), que infectan principalmente ciruelos, melocotoneros y albaricoqueros (Candresse y Cambra, 2006). Otras cepas, como EA (El Amar), (Wetzel *et al.*, 1991), W (Winona) (James y Varga, 2005) y T (Turkey) (Serçe *et al.*, 2009), son minoritarias y tienen una distribución geográfica limitada, o están más restringidos en cuanto al huésped natural como son los casos de las cepas C (Cherry) (Crescenzi *et al.*, 1997; Nemchinov y Hadidi, 1996) y CR (Cherry-Russia) (Glasa *et al.*, 2013). Más reciente, se ha descrito lo que podría ser una tercera cepa del PPV capaz de infectar especies de cerezos en la naturaleza (Chirkov *et al.*, 2017).

### I.1.2 Estructura genómica del PPV

El genoma del PPV es una hebra de RNA de cadena sencilla (ss) y polaridad positiva [RNA (+)] formado por entre 9741 y 9795 nt, dependiendo de la cepa, con una proteína (VPg) unida a su extremo 5' y un extremo 3' poliadenilado (Riechmann *et al.*, 1989). La traducción del RNA genómico comienza en su segundo codón AUG (Riechmann *et al.*, 1991; Simón-Buela *et al.*, 1997a), dando lugar a una poliproteína de aproximadamente 3140 aa. El procesamiento proteolítico de la poliproteína se lleva a

cabo por las proteasas P1, HCPro y NIaPro para dar lugar a 10 proteínas maduras: P1, HCPro (componente auxiliar para la transmisión por pulgones), P3, 6K1, CI (RNA helicasa), 6K2, NIa (VPg + proteasa), NIb (RNA replicasa), CP (proteína de la cápsida) (García *et al.*, 2014; Revers y García, 2015). Además del marco de lectura abierto principal, recientemente se descubrió otro diferente que se genera por un resbalón de la RNA polimerasa viral en el motivo conservado G<sub>2</sub>A<sub>6</sub> que está presente en la región central de la secuencia que codifica a P3. El RNA producido por este resbalón, aunque muy minoritario, se traduce para generar una proteína conocida como P3N-PIPO (Chung *et al.*, 2008; Olsper *et al.*, 2015; Rodamilans *et al.*, 2015) (Figura I.2). En otro potyvirus, se ha descrito la producción de una proteína adicional, P3N-ALT, por un resbalón alternativo de la polimerasa en el mismo sitio de la secuencia codificante de P3 (Hagiwara-Komoda *et al.*, 2016), pero la relevancia funcional de esta proteína en el conjunto de los potyvirus, no se ha estudiado aún en detalle. Datos obtenidos para otros potyvirus, muy probablemente extrapolables al PPV sugieren que varios productos intermedios que resultan de un procesamiento parcial de la poliproteína también tienen relevancia funcional en la infección viral (Léonard *et al.*, 2004; Merits *et al.*, 2002).

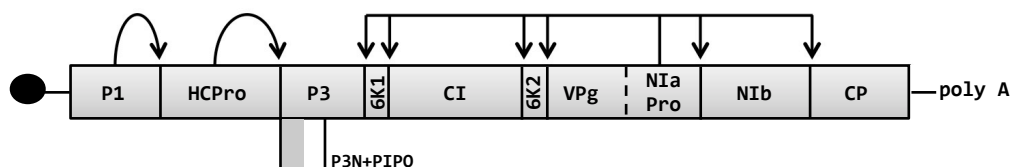


Figura I.2. Esquema del procesamiento proteolítico de las poliproteínas codificadas por el RNA genómico del PPV. Los rectángulos grises representan los productos finales obtenidos como resultado del procesamiento proteolítico. En el caso de P3N-PIPO su región C-terminal, producto de un salto de fase, se representa en blanco. La elipse negra en el lado izquierdo representa a la proteína terminal VPg. Las flechas negras indican los sitios de corte de las proteasas P1, HCPro y NIaPro.

La región 5' no traducida (5' UTR) del genoma del PPV tiene 146 nt que comienzan con un tramo de cuatro residuos de adenina (A), pero aparentemente un extremo 5' intacto no es esencial para la replicación del PPV ya que RNAs con mutaciones que alteran el número de residuos de A terminales fue capaz de infectar plantas de *N. clevelandii*, reparándose el extremo 5' mediante un mecanismo independiente de molde que aún no se conoce (Simón-Buela *et al.*, 2000). Los residuos de la 5' UTR del genoma del PPV esenciales para la replicación del virus están confinados a los primeros 35 nucleótidos, mientras que la delección de secuencias más

largas localizadas entre los nucleótidos 39 y 145 no altera la infectividad ni la acumulación viral (Simón-Buela *et al.*, 1997b). Sin embargo, estas deleciones afectan la capacidad de la infección y la patogenicidad. La región 3' no traducida (3' UTR) del PPV tiene 220 nucleótidos y no hay datos acerca de su relevancia en la infección viral, aunque se ha descrito un determinante de patogenicidad que incrementa la severidad de los síntomas en la región 3' UTR de otro potyvirus, *Tobacco vein mottling virus* (TVMV) (Rodríguez-Cerezo *et al.*, 1991).

La maquinaria necesaria para la replicación de los virus RNA (+) no está disponible en la partícula viral ni está preformada en la planta sana (Carbonell *et al.*, 2016). De modo que, una vez que el virus entra en la célula del huésped al que infecta, el RNA genómico (gRNA) se libera de la cápsida y se traduce de una manera acoplada (Mundry *et al.*, 1991). Los componentes virales de la maquinaria de replicación interaccionan con factores de la planta dando lugar a estructuras complejas que llevan a cabo el proceso replicativo y que se conocen como complejos de replicación. La replicación del genoma de los virus RNA (+) ocurre en dos etapas: primero tiene lugar la síntesis de cadenas de RNA complementarias al RNA encapsulado [banda (-)], que a continuación, sirven de molde para la producción de nuevas cadenas de gRNA [banda (+)]. Estas moléculas pueden comenzar otro ciclo replicativo o encapsidarse para dar lugar a la nueva generación de partículas virales. Sin embargo, hay dudas acerca de qué moléculas intermedias desempeñan un papel en el proceso. Aunque se suele encontrar abundante cantidad de formas de RNA de banda doble en las muestras de ácidos nucleicos preparadas a partir de plantas infectadas, se sospecha que estas moléculas pueden representar callejones sin salida que se originan por apareamiento de bandas positivas y negativas en la célula o durante el proceso de aislamiento (Buck, 1996). Hay datos que sugieren que el RNA formado *in vivo* está mayoritariamente en forma de banda simple y que los verdaderos intermediarios replicativos están formados por una molécula molde completa de banda (-) y varias cadenas nacientes de polaridad (+) sucesivas con regiones de interacción de banda doble limitada (Buck, 1996; Garnier *et al.*, 1980; Hayes y Buck, 1990). En cualquier caso, el resultado de la replicación del RNA de estos virus es siempre un exceso de cadenas de polaridad (+) (Buck, 1996), aunque un aspecto importante en relación a algunos de los resultados obtenidos en esta tesis es que en la célula infectada se encuentran moléculas de RNA de las dos polaridades.

## **I.2 Resistencia antiviral**

### **I.2.1 Resistencia clásica**

Hasta el surgimiento de las tecnologías de ingeniería genética, los virus de plantas se controlaban por fuentes de resistencia monogénicas o poligénicas seleccionadas por técnicas de mejora genética convencionales de las variedades cultivadas, incluyendo también, en ocasiones, genes procedentes de especies silvestres relacionadas. También contribuía al control de las enfermedades virales el uso técnicas agronómicas apropiadas, como la rotación de cultivos, la erradicación temprana de las plantas infectadas, gracias a programas de detección precoz, o el control químico de los vectores transmisores del virus (Hull, 2014). Otro abordaje empleado para proteger a los cultivos frente a infecciones virales ha sido el uso de la protección cruzada, un fenómeno que tiene lugar cuando una planta se infecta con un aislado débil antes de encontrarse con el aislado viral más severo (Ponz y Bruening, 1986; Zhang *et al.*, 2018; Ziebell y Carr, 2010).

### **I.2.2 Resistencia por ingeniería genética**

La mayoría de los casos de éxito conseguidos en la biotecnología de plantas en el área de resistencia viral se basan en el principio de resistencia derivada del patógeno (PDR) (Ritzenthaler, 2005; Simón-Mateo y García, 2011). El concepto de PDR fue propuesto por Sanford y Johnston hace más de 30 años utilizando el bacteriófago Q $\beta$  como modelo. Propusieron que se puede conseguir resistencia expresando elementos genéticos del patógeno fuera del contexto de la infección (Sanford y Johnston, 1985). Este abordaje abrió interesantes posibilidades para el control práctico de las enfermedades.

En el caso de virus de plantas, la primera demostración de la validez del concepto de PDR fue con plantas de tabaco transformadas con el gen de la CP del TMV (Abel *et al.*, 1986). Más tarde, esta observación fue confirmada expresando otras CPs y otras proteínas virales tales como replicasas, proteinasas y proteínas de movimiento (Gottula y Fuchs, 2009; Prins *et al.*, 2008). El mecanismo de PDR basada en la expresión de proteínas virales posee algunas características generales: i) no es muy específica y protege contra una gran variedad de aislados virales; ii) muestra una correlación positiva entre los niveles de acumulación del producto viral y la eficiencia

en la resistencia; iii) normalmente es superada por altas dosis del inóculo. Pero pronto aparecieron indicaciones de que en la mayoría de los casos atribuidos inicialmente a PDR mediada por proteínas la resistencia funcionaba por mecanismos mediados por RNA (Baulcombe, 1994; Baulcombe, 1996; Lindbo *et al.*, 1993). Más recientemente, los resultados que implican directamente a proteínas específicas del virus en la restricción a la superinfección, un fenómeno estrechamente ligado al concepto de cross-protección (Zhang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018), han devuelto el interés por la PDR mediada por proteínas.

### **I.3 Resistencia mediada por silenciamiento de RNA**

#### **I.3.1 Mecanismo molecular del silenciamiento de RNA**

Los primeros indicios de la existencia de silenciamiento de RNA datan de principios de la década de los 90, y provienen de trabajos dirigidos a sobreexpresar el gen de la chalcona sintasa (CHS) en plantas de petunia transgénicas (Napoli *et al.*, 1990; van der Krol *et al.*, 1990). En lugar de obtener petunias con un aumento en la pigmentación, que era lo que los autores de estos trabajos pretendían, obtuvieron plantas con el fenotipo contrario al esperado: algunas flores sin pigmentación y otras con pigmentación reducida. Este efecto se origina porque, aunque haya múltiples copias del transgén CHS integradas en el genoma, los niveles de expresión de su mRNA están reducidos drásticamente. De alguna manera, el transgén silencia no solo su expresión sino también la de su gen endógeno homólogo. A este fenómeno se le dio el nombre de co-supresión. Más tarde, se observó que en *Caenorhabditis elegans* la presencia de RNA de doble cadena (dsRNA) potenciaba el silenciamiento de genes con secuencia similar a la suya (Montgomery *et al.*, 1998; Tabara *et al.*, 1998) y se denominó interferencia por RNA (RNAi).

Desde que el conocimiento del silenciamiento de RNA se extendió a sistemas modelo animales, el esclarecimiento de las bases moleculares que lo gobiernan avanzó con considerable rapidez. Ahora sabemos que el silenciamiento de RNA engloba a un conjunto de mecanismos fundamentales de control de la expresión génica en los que juegan un papel fundamental los RNAs de pequeño tamaño (sRNAs) (Brodersen y Voinnet, 2006; Mello y Conte Jr, 2004; Xie *et al.*, 2004). Y ahora se conoce que existe en casi todos los organismos eucariotas incluyendo protozoos, invertebrados,

vertebrados, hongos y algas (Cerutti, 2003; Hannon, 2002).

En plantas, hay varios procesos que producen sRNAs que dirigen la degradación específica o el bloqueo traduccional de moléculas de RNA con las que comparten complementariedad de secuencia (Axtell, 2013; Bologna y Voinnet, 2014). Muy resumidamente, los sRNAs pueden ser: (1) microRNAs (miRNAs), procesados a partir de horquillas de ssRNA, implicados en la regulación génica; (2) sRNAs interferentes (siRNAs) heterocromáticos derivados de regiones intergénicas y/o altamente repetitivas, incluyendo transposones; (3) siRNAs secundarios, la síntesis de cuyo dsRNA precursor depende de la acción previa de otro sRNA y de una RNA polimerasa dependiente de RNA (RDR) [incluye a los “*trans acting*” sRNAs (tasiRNAs) y otros sRNAs producidos como una serie en fase] y (4) siRNAs cuyos precursores dsRNA se forman por la hibridación de RNAs transcritos de manera independiente (nat-siRNAs). Para el objeto de esta tesis es de particular interés otro grupo de siRNAs, en este caso de carácter exógeno, el de los derivados de virus (Llave, 2010).

Todos los siRNAs proceden del procesamiento de precursores con regiones de estructura de banda doble por miembros de una familia de RNAsas de tipo III, descubierta en *Drosophila* (Bernstein *et al.*, 2001) y denominada Dicer en animales y Dicer-like (DCL) en plantas. Estas RNAsas son proteínas que contienen típicamente uno o más dominios de unión al dsRNA, uno RNA helicasa DExH, otro PIWI/ARGONAUTE/ZWILLE (PAZ) y dos dominios RNasa tipo III (Zhang *et al.*, 2004). El producto de corte de Dicer es un dúplex de RNA con el extremo 5' fosforilado y 2 nucleótidos protuberantes en el extremo 3'. Es interesante resaltar que mientras que el genoma de mamíferos codifica solamente a una proteína Dicer, el de *Drosophila* codifica a dos (Bernstein *et al.*, 2001) y el de *Arabidopsis* a cuatro DCLs (Schauer *et al.*, 2002). Estas últimas producen sRNAs de diferentes tamaños: típicamente 20-22 nt (DCL1), 22 nt (DCL2), 24 nt (DCL3) y 21 nt (DCL4) (Borges y Martienssen, 2015).

En general, los miRNAs se generan por una reacción en dos pasos que lleva a cabo DCL1 a partir de un precursor inicial transcrito por la RNA polimerasa II (pri-miRNA), que en una primera etapa de procesamiento da lugar al precursor inmediato (pre-miRNA) (Kurihara y Watanabe, 2004). La mayoría de siRNAs heterocromáticos tienen 23-24 nt y dependen de RDR2, DCL3 y, muchos de ellos, de una RNA polimerasa dependiente de RNA, Pol IV, para su biogénesis; estos siRNAs están implicados en procesos de metilación de DNA y de histonas que dan lugar a

modificaciones de la cromatina (Matzke y Mosher, 2014). En cuanto a los siRNAs secundarios, hay una gran variedad de ellos y requieren diferentes grupos de factores para su biogénesis. Muchos siRNAs secundarios están en fase y derivan del procesamiento de moléculas largas de dsRNA por cortes sucesivos a partir de un extremo fijo (Axtell, 2013); entre ellos se encuentran los tasiRNAs, que juegan un papel principal en el desarrollo en las plantas. En general, tiene 21 nt y requieren para su biogénesis de RDR6 y DCL4 (Yoshikawa *et al.*, 2005), pero DCL2 puede también generar tasiRNA de 22 nt cuando la actividad de DCL4 está comprometida (Gascioli *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2005). No son muchos los estudios realizados acerca de los nat-siRNAs, y sugieren una notable heterogeneidad en su mecanismo de biogénesis. Los primeros que se describieron tenían 24 nt, dependían de RDR2 para su formación y, a pesar de su tamaño, parecían estar generados por DCL2 (Borsani *et al.*, 2005). Más adelante, Katiyar-Agarwal *et al.* (2006) describieron nat-siRNAs de 22 nt inducidos específicamente por bacterias patógenas que dependían para su síntesis de RDR6 y DCL1. Y los nat-siRNAs que describieron después Ron *et al.* (2010) tenían 21 nt y en su biosíntesis parecían participar RDR2 y DCL1. Recientemente se ha descrito una nueva clase de siRNAs endógenos que se inducen por diferentes especies virales, que requieren RDR1 y DCL4 para su biogénesis (Cao *et al.*, 2014), pero es poca la información existente acerca de la relevancia funcional de estos siRNAs.

En *Arabidopsis* las cuatro DCLs son capaces de sintetizar siRNAs virales de 21 nt (DCL1 y DCL4), 22 nt (DCL2) y 24 nt (DCL3). DCL2 y DCL4 son las dos DCLs que más contribuyen al silenciamiento de RNA antiviral dirigido a los virus con genoma RNA, mientras que las cuatro DCLs son relevantes para la defensa frente a los virus con genoma DNA (Akbergenov *et al.*, 2006; Aregger *et al.*, 2012; Blevins *et al.*, 2011; Blevins *et al.*, 2006; Bouché *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2004). Aunque las DCL pueden procesar directamente dsRNAs producidos como resultado de la replicación de los virus RNA o de la transcripción bidireccional de los virus DNA, dando lugar a siRNAs primarios, la producción de siRNAs virales secundarios a partir de dsRNA viral sintetizado principalmente por RDR1, RDR2 y RDR6, es fundamental para un silenciamiento de RNA antiviral eficiente, en especial frente a virus con genoma RNA (Aregger *et al.*, 2012; Donaire *et al.*, 2008; Vaistij y Jones, 2009; Wang *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2004).

Independientemente de las diferentes maneras de generarse los siRNA por Dicer

y de su destino final, el modo de acción consiste en que una de las hebras del dúplex de siRNA se incorpora en un complejo conocido como RISC, que son las siglas de su nombre en inglés (*RNA-induced silencing complex*), que es finalmente el efector que degrada el mRNA diana o detiene su traducción (Tolia y Joshua-Tor, 2007). También puede cargarse en complejos efectores de silenciamiento transcripcional que se denominan RITS (*RNA-induced transcriptional silencing*) (Verdel *et al.*, 2004). Tanto RISC como RITS son complejos proteicos con varios componentes, pero su componente principal son miembros de la familia ARGONAUTA (AGO), que son las que tienen la actividad endonucleasa (*slicer*) y que producen el corte en el mRNA diana (Baumberger y Baulcombe, 2005; Carbonell *et al.*, 2012). Pero es importante destacar que los complejos RISC implicados en la inhibición de la traducción y RITS causantes de remodelación de la cromatina incluyen proteínas AGO que también pueden tener actividad slicer (Carbonell *et al.*, 2012; Qi *et al.*, 2006). Hay también que mencionar que en circunstancias particulares complejos tipo RISC que incluyen una proteína AGO y un miRNA pueden tener un efecto activador sobre la traducción (Vasudevan *et al.*, 2007). La selección de la banda del sRNA dúplex que se carga en el complejo efector y la elección del complejo que contiene una u otra proteína AGO dependen del tamaño, estructura y nucleótidos terminales del dúplex (Khvorova *et al.*, 2003; Kim, 2008; Schwarz *et al.*, 2003; Steiner *et al.*, 2007).

En un principio se asumió que la represión de la traducción y la desestabilización del mRNA eran las actividades de silenciamiento de RNA predominantes en animales y que el procesamiento endonucleolítico del RNA era el modo principal de regulación post-traducciona mediada por sRNAs en plantas. Además, se pensaba que el grado de complementariedad entre el sRNA y la secuencia diana era la que determinaba qué tipo de mecanismo actuaba (Hutvagner y Zamore, 2002). Sin embargo, más tarde se comprobó que la represión de la traducción también actúa en plantas y ocurre aunque haya un alto nivel de complementariedad entre el sRNA y su diana (Brodersen *et al.*, 2008; Chen, 2004; Gandikota *et al.*, 2007).

Aunque las actividades de las proteínas AGO son parcialmente redundantes, la expansión de esta familia probablemente ha contribuido a la diversidad y especialización de las vías de silenciamiento de RNA. El número de proteínas AGO en diferentes organismos es muy variable, por ejemplo, hay una en *S. pombe*, cinco en *Drosophila*, ocho en humanos, diez en *Arabidopsis* y veintisiete en *C. elegans* (Höck y



Meister, 2008).

Todos los miembros de la familia AGO de *Arabidopsis* contienen un motivo catalítico de tipo RNase H. AGO1 es responsable de la degradación de mRNA en varios tipos de silenciamiento de RNA (Baumberger y Baulcombe, 2005; Vaucheret *et al.*, 2004) y también participa en la represión de la traducción de una serie de dianas de miRNAs (Brodersen *et al.*, 2008). AGO10, el parálogo más cercano a AGO1 está también implicada en la represión de la traducción mediada por miRNA, aunque parece afectar a un subgrupo diferente de dianas de miRNAs (Brodersen *et al.*, 2008). AGO5 pertenece al mismo subgrupo de AGO1 y AGO10, pero muestra predilección por un nucleótido 5' terminal diferente del preferido por AGO1, y su función no está bien establecida (Mi *et al.*, 2008; Oliver *et al.*, 2014; Shao *et al.*, 2014; Takeda *et al.*, 2008). AGO4 y AGO6 forman parte del mismo subgrupo y tienen funciones parcialmente redundantes en el control de cambios epigenéticos de la cromatina implicados en el silenciamiento génico transcripcional de determinados loci genómicos (Zheng *et al.*, 2007; Zilberman *et al.*, 2003). AGO8 y AGO9, que parecen provenir una duplicación génica reciente, forman también parte del grupo de AGO4 y AGO6 (Vaucheret, 2008), si bien AGO8 podría ser un pseudogen (Mallory y Vaucheret, 2010; Vaucheret, 2008); AGO9 también está implicado en modificaciones de la cromatina, aunque los loci en que participa parecen ser diferentes de los reconocidos por otros AGOs (Havecker *et al.*, 2010; Oliver *et al.*, 2014; Olmedo-Monfil *et al.*, 2010). AGO2 y AGO3 también parece derivar de una duplicación genómica reciente, y se agrupan con AGO7 (Vaucheret, 2008); AGO7 desempeña un papel clave en la formación de una serie de tasiRNAs (Adenot *et al.*, 2006; Jouannet *et al.*, 2012; Qu *et al.*, 2008), pero no hay datos ciertos sobre las posibles funciones de AGO2 y AGO3 en la fisiología de plantas sanas.

Múltiples proteínas AGOs participan en la respuesta antiviral de la planta mediada por silenciamiento de RNA (Carbonell y Carrington, 2015). Cada miembro de la familia parece tener su propia especificidad para diferentes virus. Por ejemplo, AGO1 es fundamental para la resistencia contra *Turnip crinkle virus* (TCV) y CMV (García-Ruiz *et al.*, 2015; Morel *et al.*, 2002; Qu *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011). AGO2 es activo contra PVX, TCV y CMV en *Arabidopsis*, y su homólogo de *N. benthamiana* lo es frente a *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) (Scholthof *et al.*, 2011a). AGO4 tiene actividad antiviral frente a virus RNA, como *Tobacco rattle virus* (TRV) (Ma *et al.*, 2015) y DNA, como los geminivirus *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) y *Beet curly*

*top virus* (BCTV) (Raja *et al.*, 2014). Hay evidencias de que AGO5, AGO7 y AGO10 también están implicadas en la defensa antiviral pero con un papel menos importante (Brosseau y Moffett, 2015; Garcia-Ruiz *et al.*, 2015; Qu *et al.*, 2008). Muy recientemente se ha observado que AGO2 y AGO3 participan en la resistencia frente a *Bamboo mosaic virus* (BaMV) que induce el ácido abscísico (ABA) (Alazem *et al.*, 2017).

Aunque en general el silenciamiento de RNA es usado por la planta como una estrategia antiviral, es también posible que complejos efectores cargados con siRNAs virales actúen contra mRNAs propios del huésped. Los casos más claros involucran a siRNAs de elementos subvirales (Navarro *et al.*, 2012; Shimura *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2011), pero también hay evidencias de que siRNAs de virus pueden encontrar dianas en el genoma del huésped (Miozzi *et al.*, 2013). En cualquier caso, no hay aún pruebas de que la acción de estos siRNAs esté encaminada a facilitar la infección del virus, y no constituya simplemente un efecto colateral de la estrategia defensiva del huésped.

Ante la acción antiviral de silenciamiento de RNA, los virus han desarrollado como estrategia de contra defensa proteínas especializadas capaces de combatirlo. Estas proteínas son conocidas como supresores de silenciamiento de RNA (VSRs) (Csorba *et al.*, 2015; Mingot *et al.*, 2017). Los VSRs pueden: i) bloquear su biogénesis uniéndose al dsRNA precursor e inhibiendo la actividad de factores implicados en la generación de los siRNAs primarios o secundarios, como DCL (Lacombe *et al.*, 2010) RDR6 (Guo *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2015) o SGS3 (Du *et al.*, 2011; Okano *et al.*, 2014; Rajamäki *et al.*, 2014) o impidiendo la estabilidad de los siRNAs virales (Weinheimer *et al.*, 2015); ii) degradar o secuestrar los dúplex de siRNA, evitando su carga en RISC (Lakatos *et al.*, 2006; Valli *et al.*, 2011; Vargason *et al.*, 2003; Weinheimer *et al.*, 2015); iii) inactivar a las proteínas AGO o promover su degradación (Azevedo *et al.*, 2010; Baumberger *et al.*, 2007; Bortolamiol *et al.*, 2007; Giner *et al.*, 2010; Várallyay *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2006). Una estrategia que se ha descrito para el CaMV para inhibir la defensa antiviral mediada por silenciamiento de RNA en la que no interviene una proteína VSR, es la producción masiva de siRNAs a partir de una región de un RNA viral poco accesible a RISC que sirve de señuelo para desviar la maquinaria de silenciamiento de regiones de RNA más vulnerables (Blevins *et al.*, 2011).

### I.3.2 Estrategias de resistencias por silenciamiento de RNA clásicas

Mientras que el conjunto de mecanismos reguladores que se engloban bajo el término silenciamiento de RNA tienen lugar de manera natural en plantas silvestres, tanto el silenciamiento transcripcional (TGS) como el post-transcripcional (PTGS) se suelen activar en respuesta a la invasión que supone la introducción de transgenes por técnicas de ingeniería genética (Baulcombe, 2004). El TGS está en general asociado con la metilación de DNA dirigida por RNA (RdDM) del promotor del gen. Se comprobó que, como consecuencia de la naturaleza artificial de los transgenes, se pueden producir transcritos de la región de sus promotores, inducirse la metilación de estos y dar lugar al bloqueo de su transcripción (Mette *et al.*, 2000; Mette *et al.*, 1999).

Hay dos mecanismos por los que se puede producir el PTGS de un transgén. El primero, que suele ser el más eficiente, ocurre cuando la estructura del transgén da lugar a que se forme dsRNA, que, al ser procesado por un DCL produce los siRNAs que inician el proceso. Inicialmente, este proceso tenía lugar cuando, por azar, se insertaban varias copias del transgén en forma de repeticiones invertidas. Más adelante, se diseñaron transgenes que directamente producían RNAs en forma de horquilla (hpRNA), a veces con un intrón en el bucle de cadena sencilla (ihpRNA) (Smith *et al.*, 2000). Los siRNAs primarios derivados del procesamiento del dsRNA del transgén no sólo se cargan en complejos efectores, sino que, además, una parte de ellos, los de 22 nt generados por DCL2, priman la síntesis de nuevas moléculas de dsRNA, fundamentalmente por la acción de RDR6 con la colaboración de SGS3, pudiendo sobrepasar los límites del dsRNA inicial, que se procesa por diferentes DCL produciendo siRNAs en un proceso de amplificación conocido como transitividad, similar al que da lugar a la formación de los tasiRNAs (Baulcombe, 2007; Mlotshwa *et al.*, 2008; Parent *et al.*, 2015a).

No es necesario que el RNA forme por sí mismo estructuras de doble cadena. Se ha comprobado que determinados mRNAs pueden generar PTGS por un mecanismo similar al de la fase de amplificación del silenciamiento descrito en el párrafo anterior, en el que participan RDR6, SGS3 y DCL4. La señal original que desencadena que el mRNA de un transgén induzca este tipo de PTGS (“*sense*”) todavía no se conoce con detalle. Se trata de algún tipo de “aberración” que la planta siente como elemento extraño y que marca al mRNA para ser reconocido tanto por la maquinaria de *nonsense*

*RNA decay* (NRD) como por la de síntesis de RNA de RDR6 y SGS3, de manera que ambos procesos compiten por actuar sobre el RNA aberrante (Gazzani *et al.*, 2004) (Conti *et al.*, 2017; Herr *et al.*, 2006; Luo y Chen, 2007; Parent *et al.*, 2015b; Zhang *et al.*, 2015).

A pesar de que el silenciamiento de RNA es un mecanismo de defensa antiviral universal (Ding y Voinnet, 2007), son muchos los virus que lo evitan y son capaces de establecer infecciones productivas. A finales del siglo pasado English *et al.* (1996) demostraron que el silenciamiento de un transgén nuclear era capaz de suprimir la acumulación de un virus recombinante que incluía en su genoma secuencias del transgén. Este resultado explicaba por qué muchas plantas transgénicas transformados con un gel viral en las que no se detectaba ni proteína ni RNA producidos por el transgén, eran resistentes al virus, identificándolas como casos de PTGS *sense* (Baulcombe, 1996; Dougherty y Parks, 1995). Es importante destacar que un transgén viral no silenciado, que por tanto no confería resistencia constitutiva, a veces daba lugar a fenotipos de resistencia retrasada, al inducirse su silenciamiento por una infección inicial (Al-Kaff *et al.*, 1998; Covey *et al.*, 1997; Guo y García, 1997; Swaney *et al.*, 1995).

A pesar de que la PTGS por transgenes virales *sense* resultó un método útil para generar plantas resistentes frente a virus, presentaba la importante limitación de que era impredecible saber cuándo una línea iba a tener silenciado al transgén, y, por tanto, iba ser resistente, y cuándo no. El desarrollo de la PTGS mediada por hpRNA e ihpRNA consiguió resultados mucho más consistentes y reproducibles (Wang y Waterhouse, 2002), y esta tecnología es la que más se ha empleado para la generación de plantas transgénicas resistentes a virus a lo largo de los años que llevamos de este siglo.

La generación de plantas resistentes a virus utilizando transgenes consistente en secuencias relativamente largas del genoma viral se ha aplicado con éxito a numerosas especies de virus y de plantas, incluyendo casos que implican enfermedades con alta relevancia agronómica (Gottula y Fuchs, 2009; Prins *et al.*, 2008; Simón-Mateo y García, 2011).

## I.4 Resistencia mediada por miRNAs artificiales (amiRNAs)

### I.4.1 Biogénesis de los miRNAs y asimetría de carga en los complejos RISC

Como se ha mencionado anteriormente, el control de la expresión génica mediado por silenciamiento de RNA se lleva a cabo por los siRNAs y los miRNAs (Bartel, 2004). Aunque similares en tamaño son muy diferentes en su biogénesis y modo de acción (Axtell, 2013). Los miRNAs son sRNAs endógenos de 20-22 nt que juegan un papel regulador importante en animales y plantas actuando sobre los mRNA diana para cortarlo o para reprimir su traducción (Bartel, 2004). Se descubrieron en 1993 por Víctor Ambros y colaboradores cuando observaron que *lin-4*, un gen conocido por controlar uno de los estadios del desarrollo de la larva de *C. elegans*, no codificaba a una proteína, sino que producía RNAs de pequeño tamaño, el más pequeño de los cuales actuaba sobre la región 3' no traducida del mRNA de *lin-14* (Lee *et al.*, 1993). Este sRNA fue el miembro fundador de la clase de los miRNAs (Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001).

En plantas, miles de genes que codifican a miRNAs (MIR), localizados principalmente en regiones intergénicas del genoma, han sido anotados en la base de datos miRBase (Taylor *et al.*, 2014). Los genes MIR se transcriben por la RNA II polimerasa generando un RNA primario (pri-miRNA) que se procesa en el núcleo por la enzima DCL1 en dos etapas, la primera dando lugar a una estructura en horquilla de 60-70 nt conocida como precursor de miRNA (pre-miRNA) y la segunda produciendo el duplex de miRNA (Jones-Rhoades *et al.*, 2006; Kurihara y Watanabe, 2004). El modelo aceptado hasta hace muy poco postulaba que este dúplex de miRNA era transportado por una proteína tipo exportina-5, conocida como HASTY, en el caso de *A. thaliana* era transportado al citoplasma donde se cargaba en complejos RISC formados por AGO1, que seleccionaban la banda que actuaría como guía en el reconocimiento del mRNA diana (en esta tesis le hemos llamado miRNA maduro), y expulsaban o degradaban la otra banda (llamada en esta tesis banda estrella, pero también conocida como pasajera). Sin embargo, datos publicados mientras se escribía esta memoria, han demostrado que AGO1 puede viajar entre el citoplasma y el núcleo, de manera que el dúplex de miRNA es madurado, metilado (por la metil transferasa HEN2 y cargado en AGO1 en el núcleo, y el complejo AGO1:miRNA es exportado al citosol gracias a una señal de exportación del núcleo (NES) de AGO1 que queda al descubierto cuando carga al miRNA (Bologna

*et al.*, 2018) (Fig. I.3).

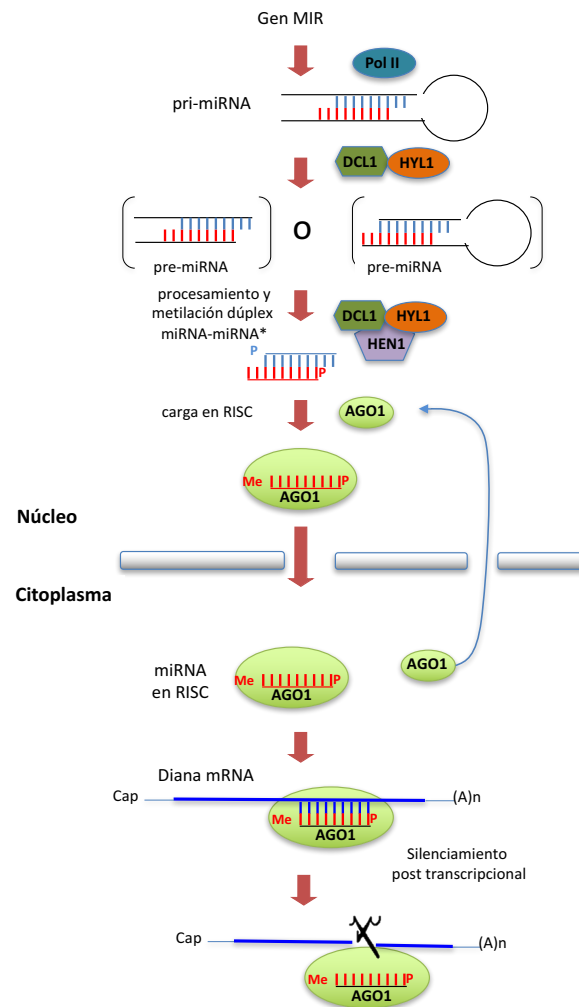


Figura I.3. Esquema de la biogénesis de miRNA en *Arabidopsis* y modo de acción. Modificado de Jones-Rhoades *et al.* (2006), incluyendo datos de Bologna *et al.* (2018).

La ruta de biogénesis de los miRNAs de animales es bastante diferente. El pri-miRNA es digerido por la RNAsa III Drosha en el núcleo y el pre-miRNA resultante es transportado al citosol por EXPORTIN5 (EXPO5). Allí es procesado por Dicer para dar lugar al dúplex de miRNA maduro (Ha y Kim, 2014).

La selección de la banda que se mantiene en RISC para guiarlo a la diana correcta necesita estar perfectamente regulada. Un factor que se ha mostrado como fundamental en el caso de los miRNAs de animales es la estabilidad termodinámica de los extremos del dúplex (Tomari *et al.*, 2007). Todo apunta a que la hebra del dúplex que posee el extremo 5' con puentes de hidrogeno más débiles se retiene más fácilmente en RISC mientras que la otra es degradada (Khvorova *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003). Sin embargo, la evidencia de que este factor de selección es también relevante en

los miRNAs de plantas, no es tan fuerte. Un factor que sí parece contribuir sin duda a la selección por AGO1 de la hebra madura de los miRNA de plantas es la preferencia por U en su extremo 5' (Mi *et al.*, 2008).

Finalmente, el complejo RISC cargado con el miRNA maduro reprime la traducción (Brodersen *et al.*, 2008; Chen, 2004) o corta el mRNA diana (Llave *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2003) para silenciar el gen correspondiente. Entre los genes cuya expresión se controla por miRNA predominan los que codifican factores de transcripción, factores implicados en la regulación hormonal y en respuestas a estrés abiótico y al ataque de patógenos, y componentes de las rutas de silenciamiento de RNA (Jones-Rhoades y Bartel, 2004; Jones-Rhoades *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2012; Navarro *et al.*, 2006; Rhoades *et al.*, 2002; Shivaprasad *et al.*, 2012; Xin *et al.*, 2010; Zhai *et al.*, 2011).

La mayoría de los miRNAs de animales actúan inhibiendo la traducción de sus mRNAs diana, en los que frecuentemente se aparean con motivos de la región 3' no traducida, pero con bastantes nucleótidos desapareados. Por el contrario, las dianas de los miRNAs de plantas, independientemente de que estén implicadas en represión de la traducción o en la rotura del mRNA, suelen estar situadas en secuencias codificantes y permiten apareamientos casi completos (Axtell, 2013; Brodersen *et al.*, 2008), lo que facilita la predicción de dianas mediante herramientas bioinformáticas.

#### **I.4.2 Uso de amiRNAs como herramienta biotecnológica en plantas**

Poco después de que se caracterizaran los miRNAs como reguladores de la expresión génica se describió su utilidad biotecnológica en el silenciamiento de genes en plantas (Alvarez *et al.*, 2006; Schwarz *et al.*, 2003). Básicamente, la estrategia consiste en reemplazar la secuencia del miRNA y miRNA\* de un pre-miRNA natural por la secuencia correspondiente a la diana que se pretende silenciar. En la nueva construcción se mantiene la estructura en forma de lazo del esqueleto del precursor original, lo que permite que se procese de la misma manera, dando lugar al miRNA artificial (amiRNA) deseado. La principal ventaja de los amiRNAs con respecto a los hpRNAs para silenciar genes es que la secuencia que se utiliza para el silenciamiento es una única especie de RNA de pequeño tamaño (normalmente, 21 nt), lo que reduce drásticamente los posibles efectos colaterales (*off-target*) sobre dianas no deseadas (Tiwari *et al.*, 2014). Además, en teoría, el silenciamiento por amiRNAs no debería

generar siRNAs secundarios, lo que permitiría conseguir silenciamientos muy específicos incluso cuando se trate de genes que pertenecen a familias multigénicas muy conservadas (Schwarz *et al.*, 2003).

Se han utilizado los esqueletos de los precursores de diferentes familias de miRNA para la construcción de amiRNAs. Los más frecuentemente utilizados han sido los de las familias ath-miR159a, ath-miR167b, ath-miR169d, ath-miR171a, ath-miR172a, ath-miR219a, de *A. thaliana* y osa-miR528 y os-miR395 de *Oriza sativa* (Tiwari *et al.*, 2014).

#### I.4.3 Uso de amiRNAs para generar resistencia viral frente a virus en plantas

En el caso de virus animales se ha demostrado que algunos miRNAs, tanto codificados por el virus como por el huésped, participan en la infección, facilitándola unas veces o participando en los mecanismos de defensa del huésped en otras (Berkhout y Jeang, 2007; Cullen, 2011; Ding, 2010; Grey, 2015). Aunque hasta el momento no hay evidencias fehacientes ni de la existencia de miRNAs de virus de plantas ni de la acción directa de miRNAs del huésped sobre estos virus, sí que se ha demostrado que los miRNAs endógenos pueden actuar sobre virus modificados genéticamente en los que se ha incluido su secuencia diana de reconocimiento (Simón-Mateo y García, 2006). Este resultado, abría la posibilidad de utilizar amiRNAs para generar plantas resistentes a infecciones virales.

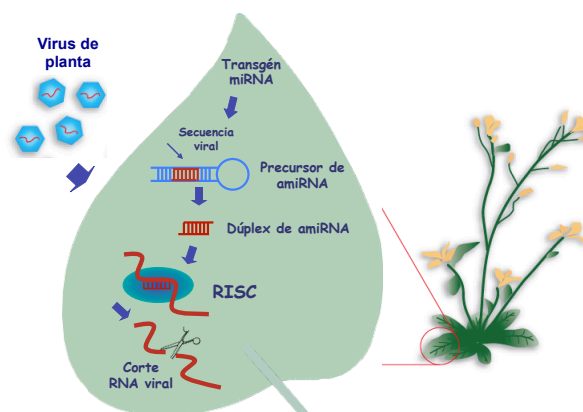


Figura I.4: Representación esquemática de la actividad antiviral conferida por la expresión transgénica del amiRNA en *A. thaliana*. Región del dúplex del transgén de miRNA reemplazada por una secuencia de 21nt derivada del virus y su secuencia totalmente complementaria (en rojo). El amiRNA resultante corta el RNA viral por la acción de RISC previniendo la infección viral. Modificado de García and Simón Mateo (2006).



La primera demostración de que esta estrategia funcionaba fue la obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis* resistentes al tymovirus *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) y al potyvirus TuMV gracias a la expresión de amiRNAs dirigidos a secuencias de RNA que codifican a sus supresores de silenciamiento (Niu *et al.*, 2006). En seguida, aparecieron otros estudios que confirmaban la efectividad de esta técnica dirigida a otras secuencias diana, en diferentes especies virales y huéspedes (Ai *et al.*, 2011; Duan *et al.*, 2008; Fahim *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2011; Kung *et al.*, 2012; Qu *et al.*, 2007; Wagaba *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2011a). Además, Niu *et al.* (2006) demostraron la posibilidad de utilizar una construcción doble con amiRNAs dirigidos a secuencias de dos virus diferentes para conferir resistencia a ambos virus en una única planta transgénica. La producción de múltiples amiRNAs virales en la misma planta permite en teoría, ampliar la resistencia a un número mayor de virus.

Aunque en algunos casos se observó una resistencia antiviral mediada por amiRNA muy eficiente, en otros casos se obtuvieron plantas transgénicas que mostraban diferentes respuestas frente a la infección: resistencia completa, retraso de la infección, recuperación o susceptibilidad (Qu *et al.*, 2007). Mientras que los diferentes niveles de resistencia de diferentes líneas transgénicas transformadas con la misma construcción amiRNA parecen deberse a diferencias en los niveles de expresión del transgén (Ai *et al.*, 2011; Lafforgue *et al.*, 2011; Qu *et al.*, 2007), las causas de la diferencia de eficiencia de diferentes amiRNA no se han estudiado sistemáticamente.

La efectividad de los sRNAs, tanto naturales como artificiales no solo dependen de la secuencia nucleotídica de su diana, sino también de su localización en el RNA diana (Li *et al.*, 2014; Luo y Chang, 2004; Overhoff *et al.*, 2005; Schubert *et al.*, 2005; Simón-Mateo y García, 2006; Westerhout *et al.*, 2005). Esto puede indicar que algunos sitios son más accesibles que otros a la maquinaria de silenciamiento de RNA o que el procesamiento está de alguna manera influenciado por las secuencias que flanquean las dianas. Para intentar evitar los defectos en el procesamiento por la posición de la diana, Duan *et al.* (2008) desarrollaron un abordaje para que las dianas estuvieran situadas en sitios del genoma viral probablemente accesibles a RISC, y de esta manera conseguir un silenciamiento de RNA efectivo y la consiguiente resistencia frente al virus.

Un recurso interesante para la construcción de amiRNAs con una actividad antiviral potencialmente mayor es diseñar dúplex amiRNA/amiRNA\* perfectos, aunque

el dúplex del miRNA natural al que estén reemplazando en el precursor endógeno tenga algún nucleótido desapareado. Hay evidencias que indican que el silenciamiento de RNA mediado por miRNAs puede actuar sobre ambas hebras del RNA viral (Simón-Mateo and García, 2006). De manera que este tipo de dúplex perfectamente apareado produciría un amiRNA maduro complementario al RNA genómico y un amiRNA\* con complementariedad con la banda negativa del RNA viral, ambos podrían cargarse en RISC y las dos hebras del RNA viral podrían ser alcanzadas con los productos de un único transgén.

Un inconveniente del uso de amiRNAs como arma antiviral, ya advertido la primera vez que se describió (García y Simón-Mateo, 2006), es que es esperable que la combinación de la gran especificidad de corte y la alta capacidad de mutación de los virus de plantas conduzca a la aparición de variantes virales que escapen de la acción de los amiRNAs y, por tanto, de la resistencia viral. El estudio con quimeras del PPV con secuencias diana de miRNAs endógenos fue la primera evidencia que mostró que el virus puede escapar de la presión negativa de la actividad del miRNA introduciendo mutaciones en su diana (Simón-Mateo y García, 2006).

Una evidencia más directa de los problemas de durabilidad de la resistencia mediada por amiRNA la proporcionó la aparición de mutantes de TuMV en plantas transgénicas que expresaban un amiRNA dirigido a una secuencia del genoma viral (Lin *et al.*, 2009). La progenie viral que escapaba de la resistencia contenía deleciones que eliminaban parte de los 21 nt de la diana o mutaciones puntuales que afectaban principalmente a los nucleótidos que hibridan con la región central y 5' terminal del amiRNA. Resultados posteriores demostraron que también los virus silvestres pueden variar su secuencia para superar la resistencia mediada por amiRNAs a través de la selección de variantes virales con mutaciones dentro de la secuencia diana del amiRNA (Elena, 2016). Orientar al amiRNA a una región altamente conservada del genoma viral o combinar la acción de varios amiRNAs dirigidos a diferentes dianas del mismo virus son estrategias que pueden ayudar a paliar este problema (Lafforgue *et al.*, 2013).

#### **I.4.4 Uso de sRNAs artificiales como instrumento antiviral frente a virus animales**

La utilización de las vías de silenciamiento de RNA (más conocido como RNAi en la literatura sobre animales) para el desarrollo de terapias antivirales efectivas en mamíferos es anterior a su empleo en plantas (Coburn y Cullen, 2002; Jacque *et al.*,

2002; Lee *et al.*, 2002). En estos estudios, en lugar de usar de expresar precursores de amiRNA como fuente de los sRNA antivirales, se han usado otros tipos de construcciones. Lo más habitual ha sido administrar directamente siRNAs maduros sintetizados químicamente, o RNAs de pequeño tamaño con forma de lazo (shRNAs) similares a los pre-miRNAs, expresados en plásmidos (Hannon y Rossi, 2004; Liu y Berkhout, 2011). El tratamiento de las células de mamíferos con siRNA antivirales específicos programa los complejos RISC para la destrucción específica del RNA viral. En consecuencia, a pesar de que en muchos casos el RNA genómico y la replicación viral están protegidos por estructuras membranosas, la replicación de un gran número de virus humanos con diferentes estrategias de replicación puede inhibirse eficientemente mediante el pre tratamiento de cultivos de tejido con siRNAs o shRNAs. Pero en el caso de virus de RNA de cadena negativa como el *Influenza A virus* (IAV), *Hepatitis delta virus* (HDV) o *Respiratory syncytial virus* (RSV) (Bitko y Barik, 2001; Chang y Taylor, 2003; Ge *et al.*, 2004) y de doble cadena como los rotavirus (Silvestri *et al.*, 2004) solo se ha identificado el mRNA como diana del tratamiento exógeno por RNAi. En estos casos parece que los RNA genómicos se pueden esconder de la acción de RISC gracias a su localización nuclear (IAV, HDV), su replicación en inclusiones no membranosas (rotavirus) o asociaciones con las proteínas en las nucleocápsidas (RSV). En el caso de los virus RNA de cadena positiva como picornavirus o el *Hepatitis C virus* (HCV), en los que el RNA genómico viral se utiliza como mensajero para la traducción y como molde para la síntesis de la banda complementaria, los datos sugerían que solo la cadena positiva era alcanzada por la maquinaria de RNAi (Gitlin *et al.*, 2005; Lisowski *et al.*, 2013; Schubert *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2005).

La mayor parte de los estudios sobre la actividad antiviral de sRNAs artificiales sobre virus de mamíferos se han realizado usando cultivos celulares, pero hay también estudios que muestran su eficacia *in vivo* (Bitko *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005), incluyendo tratamientos de primates no humanos (Geisbert, 2014; Geisbert *et al.*, 2010; Thi *et al.*, 2017; Thi *et al.*, 2015). Se han llevado a cabo, incluso ensayos clínicos en humanos con resultados prometedores (DeVincenzo *et al.*, 2010), sin embargo, su aplicación clínica de pacientes infectados con el *Ébola virus*, no tuvo éxito (Dunning *et al.*, 2016). Aunque esta tecnología aún está en sus primeros pasos, los resultados obtenidos hasta el momento auguran que estrategias profilácticas y terapéuticas basadas en RNAi pueden resultar efectivas frente a infecciones virales crónicas y agudas.

## I.5 Resistencia antiviral mediante silenciamiento de RNA en agronomía

Aunque la mayoría de los estudios acerca del silenciamiento de RNA se ha realizado en *A. thaliana* y otras especies modelo, su aplicación como estrategia antiviral se ha extendido a especies de alta relevancia agronómica (Reyes *et al.*, 2011; Shekhawat *et al.*, 2012; Zracha *et al.*, 2007). Resulta interesante que, de los casos reportados en la sección de plantas resistentes a enfermedades de la base de datos de organismos genéticamente modificados aprobados para su uso en algún país del mundo (<http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/>) todos excepto uno corresponden a plantas resistentes a virus. Varias de estas plantas transgénicas se obtuvieron en la década de los 90 mediante la transformación de genes virales traducibles. Sin embargo, en varios casos la resistencia se obtuvo como resultado de la activación del silenciamiento de RNA, como en los casos más intensivamente estudiados de la papaya 55-1 (Rainbow y SunUp) y el ciruelo C5 (HoneySweet).

El de la papaya es un cultivo ampliamente distribuido en las regiones tropicales y subtropicales y el *Papaya ringspot virus* (PRSV) es uno de los virus más devastadores que lo afectan. En 1989, se obtuvo la línea de papaya transgénica 55-1 introduciendo el gen de la CP de una raza leve del PRSV (HA 5-1) (Gonsalves, 1998). En esta línea transgénica se acumulaban bajos niveles del mRNA de la CP, lo que indicaba que la resistencia al PRSV estaba mediada por silenciamiento de RNA. Dos cultivares comerciales, "SunUp" y "Rainbow" (homocigóticas y heterocigóticas para el transgén de la CP, respectivamente) se obtuvieron a partir de la línea 55-1. "Rainbow" era resistente al aislado PRSV de Hawaii mientras que "SunUp" era resistente a la mayoría de los aislados de PRSV. En 1997 la papaya 55-1 y sus derivados se aprobaron para su comercialización. La superficie de cultivo de la papaya transgénica en Hawaii aumentó de 39% en 2000 a 85% en 2012, lo que refleja el profundo potencial social y económico de la tecnología del silenciamiento de RNA (Gonsalves, 2014).

La línea transgénica C5 del ciruelo Stanley, renombrada "HoneySweet", resistente al PPV se obtuvo en 1994 y se aprobó para su comercialización en USA en 2009 (Scorza *et al.*, 2013). Su resistencia al PPV está mediada por silenciamiento de RNA. Esta línea transgénica posee múltiples copias del transgén de la CP metilado, acumula bajos niveles de mRNA de la CP, no produce cantidades detectables de la proteína y acumula siRNAs específicos de la región que codifica a la CP. La resistencia de la línea C5 se ha estudiado extensivamente durante más de 10 años en campo en

varios países, en regiones caracterizadas por tener infección endémica del PPV, verificándose su alta efectividad (Scorza *et al.*, 2013). Existen evidencias obtenidas en condiciones experimentales de que la resistencia frente a un virus derivada de silenciamiento de un transgén viral puede suprimirse por la infección de un virus heterólogo (Al-Kaff *et al.*, 2000; Simón-Mateo *et al.*, 2003). Sin embargo, las plantas C5 inoculadas mediante injerto con diferentes virus heterólogos conservaban la resistencia frente al PPV (Zagrai *et al.*, 2008).

Otro ejemplo reciente de planta cultivable transgénica resiste a un virus, es la línea de judía EMBRAPA 5.1, resistente al begomovirus *Bean golden mosaic virus* (BGMV), que ha sido el primer producto comercializado obtenido por silenciamiento de RNA con un transgén productor de hpRNA (Aragão *et al.*, 2013). BGMV es el virus más importante que infecta judías en las regiones tropicales y subtropicales, y produce pérdidas de hasta el 100%. La línea transgénica EMBRAPA 5.1, que expresa la secuencia AC1 en forma de hpRNA fue aprobada para su comercialización en Brasil en 2011. Plantas homocigotas F2 para el transgén resultaron resistentes cuando se inocularon con moscas blancas virulentas, y la resistencia fue estable en pruebas de campo realizados en distintas regiones. Además, la resistencia se mantuvo después de 8 generaciones de autopolinización y cruces con variedades comerciales no transgénicas (Aragão *et al.*, 2013).

## OBJETIVOS

En vista de que la actividad de los amiRNAs para generar resistencia antiviral en plantas está bien establecida, pero es poco lo que se conoce acerca de su mecanismo de acción, de los factores que afectan a su efectividad y de sus posibles efectos sobre la evolución de las poblaciones virales, en esta Tesis nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Comprobar si es posible interferir con la infección causada por el PPV mediante la expresión transgénica de amiRNAs específicos y comparar la actividad de varios de ellos dirigidos a diferentes dianas en el genoma del virus.

Una vez establecido que la expresión de amiRNAs era capaz de proporcionar inmunidad frente al PPV en algunas líneas transgénicas, pero no siempre confería protección completa, se establecieron los siguientes objetivos:

2. Caracterizar las mutaciones que se acumulan en el PPV bajo la presión selectiva de los diferentes amiRNAs, con objeto de deducir cómo los amiRNAs afectan a las dos cadenas del RNA del virus.

3. Verificar la accesibilidad de la hebra negativa del RNA del PPV a la maquinaria de silenciamiento y valorar el potencial antiviral de dirigir un amiRNA preferentemente sobre esta hebra del RNA viral.

4. Estimar la estabilidad genética de las especies virales surgidas bajo la presión selectiva causada por la expresión de amiRNAs y valorar su contribución al desarrollo evolutivo de la población viral.

5. Analizar si pequeños cambios en el amiRNA pueden afectar significativamente a su eficiencia.

Todos los objetivos anteriores se plantearon en el contexto de la infección de un huésped experimental del PPV, *Nicotiana benthamiana*, como último objetivo de la tesis nos hemos propuesto:

6. Verificar si la resistencia frente al PPV derivada de la expresión de amiRNAs que es activa en la especie herbácea modelo puede ser aplicada a la especie natural arbórea.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### II.1 MATERIAL BIOLÓGICO

#### II.1.1 Plantas

Los ensayos de infectividad viral y de expresión de los amiRNAs se llevaron a cabo en plantas de *Nicotiana benthamiana* y *Prunus domestica* variedad Stanley y Claudia. Las semillas de *N. benthamiana* silvestre se germinaron sobre vermiculita estéril. Las semillas de *N. benthamiana* transgénicas se germinaron *in vitro* en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con 1% de sacarosa y 40 mg/L del antibiótico higromicina. Una vez germinadas, las plántulas de aproximadamente 1 cm se transfirieron a una mezcla de tierra con vermiculita en la proporción 3:1 y se cultivaron en invernadero entre 18-23°C, con humedad relativa del 67-70% y períodos de 16 horas de luz y 8 de oscuridad durante el tiempo necesario para cada ensayo.

Los árboles de *P. domestica* con tamaño aproximado de 12-15 centímetros se obtuvieron del Departamento de Mejora Vegetal (CEBAS-CSIC) en Murcia y se mantuvieron en las mismas condiciones citadas anteriormente hasta la realización del experimento.

#### II.1.2 Bacterias

Para la propagación y purificación de los plásmidos empleados se utilizó la cepa DH10 $\alpha$  de *Escherichia coli* (Sambrook *et al.*, 1989). Para los experimentos de expresión transitoria por agroinfiltración se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 portadora del plásmido pTiB6S3 (De Greve *et al.*, 1981).

Las cepas DH10 $\alpha$  de *E. coli* y C58C1 de *A. tumefaciens* se cultivaron a 37°C y 28°C, respectivamente, en medio Luria-Bertani (LB) (bacto-triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y cloruro sódico 10 g/L), al que se añadieron 18 g/L de agar para los cultivos en medio sólido. En el caso de *A. tumefaciens*, al medio LB se le añadió rifampicina 50  $\mu$ g/ml. Las células DH10 $\alpha$  competentes, preparadas por el método de Inoue *et al.* (1990), se transformaron mediante choque térmico con plásmidos completos o con los fragmentos ligados *in vitro* (Sambrook *et al.*, 1989).

Los plásmidos que se pretendían transferir a la planta se purificaron a partir de células de *E. coli*, y se introdujeron por electroporación en células de *A. tumefaciens*



siguiendo los protocolos descritos en el manual de instrucciones del aparato “Electro cell manipulator 600” de BTX. En todos los casos los clones deseados se identificaron por análisis de restricción del DNA del plásmido. La conservación de las cepas originales y de los transformantes de *E. coli* y *A. tumefaciens* se realizó a partir de las células en medio LB con glicerol al 15% y manteniéndolas a -80°C.

### II.1.3 Virus

En este trabajo se emplearon vectores virales basados en clones de cDNA infecciosos desarrollados previamente en el laboratorio (Tabla II.1). Estos clones derivan de un aislado original PPV-R cuya secuencia completa es conocida (Laín *et al.*, 1989). La progenie viral de estos clones y de otros clones construidos en este trabajo se conservó en hojas de plantas infectadas a -80°C después de congelarse en nitrógeno líquido.

**Tabla II.1 Plásmidos virales utilizados**

| <b>Nombre</b>    | <b>Resistencia</b> | <b>Referencia</b>                           |
|------------------|--------------------|---|
| pBIN-PPV-nk-GFP  | Kan <sup>R</sup>   | (Lucini, 2004)                              |
| pSN-5'BD-PPV-GFP | Kan <sup>R</sup>   | Pasin, F. and García, J.A.,<br>sin publicar |
| pIC-PPV-PSes     | Amp <sup>R</sup>   | (Salvador, 2007)                            |
| pIC-PPV-SwCM     | Amp <sup>R</sup>   | (Calvo <i>et al.</i> , 2014)                |

## II.2 ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos ampicilina (100 mg/ml), kanamicina (50 mg/ml), higromicina (40 mg/ml) y gentamicina (10 mg/ml) se disolvieron en agua y se esterilizaron por filtración. La rifampicina se disolvió en dimetilsulfóxido (50 mg/ml) y no se esterilizó. Todos los antibióticos se conservaron a -20°C.

## II.3 INOCULACIÓN VIRAL DE PLANTAS

### II.3.1 Inoculación manual

Para las inoculaciones con extractos de plantas infectadas, se pulverizó el tejido en morteros con nitrógeno líquido y se añadió tampón fosfato sódico 5 mM pH 7.5 en una relación de 2  $\mu$ l/ 1 mg de tejido. Los restos de tejido se eliminaron por centrifugación y se emplearon 10  $\mu$ l de extracto para inocular cada una de las dos hojas de *N. benthamiana* que previamente se habían espolvoreado con Carborundo.

### II.3.2 Inoculación mediante agroinfiltración de *A. tumefaciens*

Para llevar a cabo la agroinoculación se cultivaron en medio de cultivo LB células de *A. tumefaciens* transformadas con el plásmido de interés a 28°C durante 48 horas en 2.5 ml con los antibióticos necesarios. Doscientos  $\mu$ l de este cultivo se usaron para inocular 20 ml de medio LB con los mismos antibióticos durante 16 horas a 28°C. El cultivo se centrifugó a 1000 x g durante 15 minutos a 4°C y el sedimento se resuspendió en una solución de sulfato de magnesio 10 mM, MES 10 mM y acetosiringona 150  $\mu$ M en el volumen necesario para que la densidad óptica (DO) a 600 nanómetros (DO<sub>600</sub>) fuera 1.0. La suspensión de células se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente y se infiltró aproximadamente 1 ml del cultivo en los espacios intercelulares de 2 hojas del huésped presionando con una jeringa de 1 ml sobre el envés de cada hoja.

## II.4 PREPARACIÓN Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

### II.4.1 Purificación de DNA

La purificación de DNA genómico se llevó a cabo utilizando el método de Edwards *et al.*, (1991). La extracción y purificación de DNA plasmídico a partir de cultivos de *E. coli* se realizó por el método tradicional de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). El DNA plasmídico de cultivos de *A. tumefaciens* se obtuvo utilizando “QIAprep Spin Miniprep kit” (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. En todos los casos los plásmidos purificados se analizaron mediante el uso de enzimas de restricción apropiada.

#### II.4.2 Purificación de RNA

La purificación de RNAs de pequeño tamaño para los análisis de Northern Blot se realizó utilizando el método de Lagrimini *et al.* (1987) con modificaciones. Las modificaciones se refieren a que una vez precipitada la muestra con cloruro de litio 8 M, el sobrenadante con los RNAs de pequeño tamaño se recuperó y precipitó con etanol absoluto durante 16 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A continuación, las muestras se centrifugaron a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos, el precipitado se lavó con etanol 80% y en seguida se resuspendió en agua estéril.

La purificación de RNAs totales de *N. benthamiana* para los análisis por transcriptasa reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR) se realizó utilizando Trizol (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Para la purificación de los RNAs totales de *P. domestica* se hizo un tratamiento previo a la purificación por Trizol para reducir los compuestos fenólicos con tampón CTAB 2% (m/v), Tris-HCl pH 8.5 100 mM, EDTA 25 mM, cloruro sódico 2 M, PVPP 2% (v/v) y  $\beta$ -mercaptoetanol 2% (Peng *et al.*, 2014). Los ácidos nucleicos se cuantificaron usando el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 con el programa ND-1000 v3.3.0 (Coleman Technologies Inc.).

#### II.4.3 Separación y extracción de fragmentos de DNA por electroforesis en geles de agarosa

La separación de fragmentos de DNA se realizó mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa en tampón TBE 0.5X (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8) con concentraciones de agarosa que variaban entre 0.8-1.5 % según el tamaño del DNA. Los geles llevaban además 0.1 mg/ml de bromuro de etidio con objeto de teñir al DNA, Como electrolito se utilizó el mismo tampón TBE 0.5X. Los geles se fotografiaron en un captador de imágenes “Gel Doc 2000” (Bio-Rad) con transiluminador de radiación UV.

Los fragmentos de DNA se extrajeron del gel y se purificaron utilizando el estuche comercial “NZY GelPure” (NZYTech) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **II.4.4 Amplificación de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Las amplificaciones de DNA mediante PCR, se realizaron en un termociclador PTC-100<sup>TM</sup> (MJ Research). Las reacciones se realizaron con la Amplitaq DNA polimerasa (Perkin Elmer) en el tampón suministrado por el fabricante, siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor. Como iniciadores de la elongación se emplearon diferentes oligodeoxinucleótidos sintéticos a una concentración final de 0.5  $\mu$ M. El número y las condiciones de cada ciclo fueron fijados según la pareja de oligodeoxinucleótidos utilizados y de la longitud del fragmento a amplificar. La introducción de sitios de restricción en los extremos de las secuencias de DNA amplificadas se llevó a cabo incluyendo en los iniciadores las modificaciones de secuencia apropiadas.

#### **II.4.5 Amplificación de DNA complementario a un RNA viral mediante PCR precedida de transcripción reversa (RT-PCR)**

La amplificación de RNA viral mediante RT-PCR se realizó con muestras procedentes de plantas inoculadas y se llevó a cabo empleando la enzima "M-MuLV Reverse Transcriptase" (Termo Fisher Scientific) siguiendo el protocolo del fabricante.

#### **II.4.6 Amplificación DNA complementario del RNA viral mediante inmunocaptura seguida de RT-PCR (IC-RT-PCR)**

La amplificación del RNA viral por IC-RT-PCR se realizó con muestras procedentes de extractos de plantas infectadas. Este material se homogeneizó en tampón fosfato sódico 5 mM pH 7.5. Cincuenta  $\mu$ L de estas muestras se incubaron durante 2 horas a 37°C o toda la noche a 4°C en tubos previamente tapizados con inmunoglobulina G (IgG) anti-CP del PPV, preparada a partir de suero inmune de conejo por el método descrito por Steinbuch and Audran, (1969). A continuación, tras tres lavados con tampón PBS-Tween 0.05%, se llevaron a cabo conjuntamente las reacciones de RT y PCR empleando el estuche comercial "OneStep Titan PCR System" (Roche) con oligodeoxinucleótidos para la región de interés siguiendo las instrucciones del fabricante. La región N1b fue amplificada utilizando los oligodeoxinucleótidos #1669 y #1668; la región de la CP con los oligodeoxinucleótidos #1328 y #1329 y la región 3' no traducida con los oligonucleótidos #1253 y #1254 (Tabla II.2). Los

fragmentos de DNA obtenidos mediante IC-RT-PCR se purificaron a partir de geles de agarosa utilizando el estuche comercial “QIAEX II Gel extraction kit” (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante y se secuenciaron utilizando los oligonucleótidos reverso correspondiente de cada reacción de RT-PCR a través de los servicios de MacroGen Europe.

Cuando necesario, algunos fragmentos se clonaron en el vector pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) linearizado con *Sma*I.

**Tabla II.2. Listado de los oligodeoxinucleótidos utilizados para la detección de secuencias del RNA viral mediante IC-RT-PCR**

| Número | Secuencia (5'-3')             |
|--------|-------------------------------|
| 1253   | AGGAGCTCGGTGATGTTAATCGCAACATG |
| 1254   | AGGAGCTCTTCGACAATAACAGACTAGAA |
| 1328   | AGGAGCTCGGAAACACAAGTGGAGTATCC |
| 1329   | AGGAGCTCCCATCCAAGCCAAATAAACGA |
| 1668   | TCGCTCAATTTCTGTCTC            |
| 1669   | TATACACCAATTGCTACA            |

#### II.4.7 RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Los análisis de la acumulación de las bandas madura y estrella de los miRNA artificiales fueron realizados por RT-qPCR en el aparato ABI 7300 (Applied Biosystems) utilizando el estuche comercial “5X HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus” (ROX) (Solis BioDyne) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El protocolo específico que se utilizó fue el descrito por Balcells *et al.*, (2011) en el que se utilizan oligodeoxinucleótidos de DNA para amplificar miRNAs específicos (Fig. II.1).

Para la síntesis del cDNA de todos los amiRNA analizados se ha utilizado como iniciador reverso el 3'RACE Adapter disponible en el kit “FirstChoice RLM-RACE” (Ambion), que incluye una secuencia etiqueta a continuación de una cola poli-T. En los experimentos con amiR-D, para la amplificación de la banda madura se ha utilizado la pareja de oligodeoxinucleótidos #2686 y #2687 y para la banda estrella la pareja #2688 y #2689. En los experimentos de acumulación de las distintas construcciones amiR-H, la amplificación de amiR-H maduro se realizó utilizando la pareja #3106 y #3107, para amiR-H estrella la pareja #3108 y #3109, para amiR-Hm maduro la pareja #3110 y #3111, para amiR-Hm estrella la pareja #3112 y #3113, para amiR-H<sub>1</sub> maduro la

pareja #3114 y #3115, para amiR-H<sub>1</sub> estrella la pareja #3116 y #3117, para amiR-H<sub>+3</sub> maduro la pareja #3118 y #3119 y para amiR-H<sub>+3</sub> estrella la pareja #3120 y #3121. Como control del experimento para normalizar la acumulación de las distintas muestras se amplificó el RNA 5.8 S ribosomal utilizando los oligodeoxinucleótidos #2730 y #2731. Los oligonucleótidos empleados en las reacciones de RT-qPCR se muestran en la Tabla II.3).

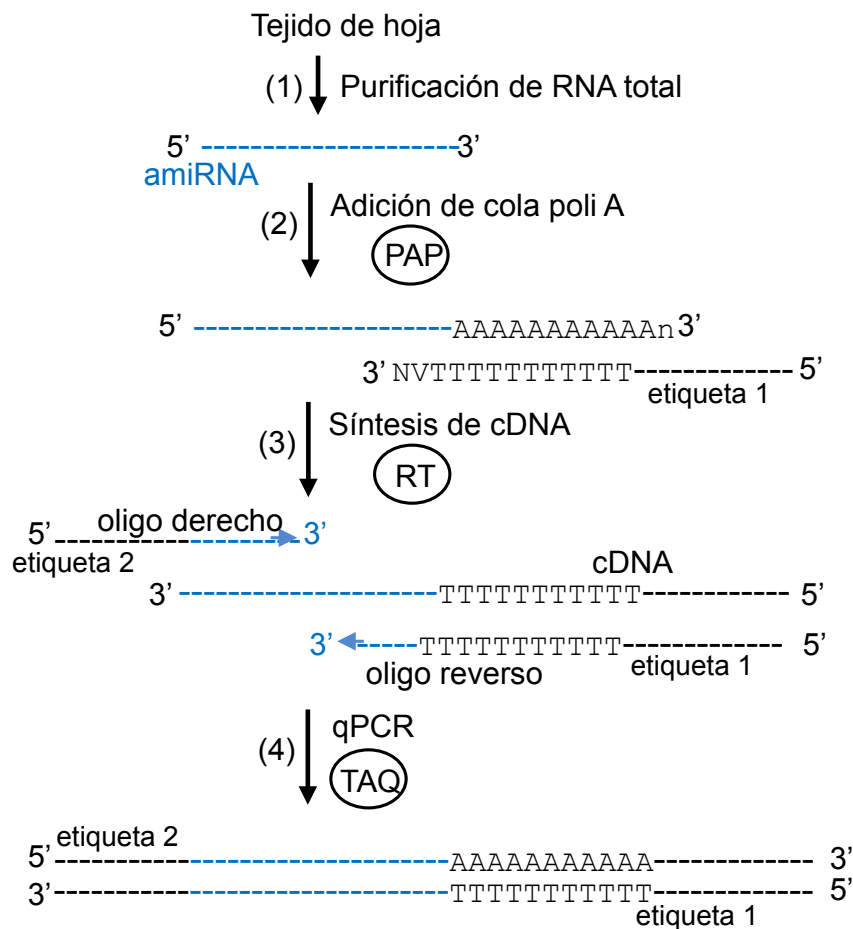


Figura II.1. RT-qPCR de miRNAs utilizando como iniciadores oligonucleótidos etiquetados [modificado de (Balcells *et al.*, 2011)]. El método consiste de 4 etapas. 1: Purificación de RNA total incluyendo amiRNAs y demás RNAs pequeños. 2: Adición de colas poli-A en el extremo 3' del amiRNA utilizando la enzima poli-A polimerasa (PAP). 3: Síntesis de cDNA con transcriptasa reversa (RT), usando como iniciador un oligodeoxinucleótido que posee una secuencia oligo-T en su extremo 3' precediendo a una etiqueta que aumenta la longitud del amiRNA. 4: qPCR con Taq polimerasa usando como iniciadores oligodeoxinucleótidos que posee etiquetas en sus extremos 5' y parte de la secuencia del miRNA de interés en el extremo 3'.

**Tabla II.3. Listado de oligodeoxinucleótidos utilizados para los análisis de RT-qPCR**

| Nombre/Número  | Secuencia (5'-3')                     |
|----------------|---------------------------------------|
| 3'RACE Adapter | GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGGT12VN |
| 2686           | cgcagTTGGCATGTATGCTT                  |
| 2687           | cgactcactataggTTTTTTTTTTTTTATGA       |
| 2688           | gcgagGAAAAGCATAACAT                   |
| 2689           | gactcactataggTTTTTTTTTTTTTGTT         |
| 2730           | gcgagGCACGTCT                         |
| 2731           | ctcactataggTTTTTTTTTTTTTGAC           |
| 3106           | cgcgagATGATTAGACTCTCA                 |
| 3107           | tcactataggTTTTTTTTTTTTCTGG            |
| 3108           | cgagTGGGTGAGAGTCTAATC                 |
| 3109           | cgactcactataggTTTTTTTTTTTTTGAT        |
| 3110           | cgcgagTTGATTAGACTCTCAC                |
| 3111           | cgactcactataggTTTTTTTTTTTTCT          |
| 3112           | cgagTGGGTGAGAGTCTAATC                 |
| 3113           | cgactcactataggTTTTTTTTTTTTTGT         |
| 3114           | cgagTGATTAGACTCTCACCA                 |
| 3115           | cgactcactataggTTTTTTTTTTTTTACCT       |
| 3116           | cgagCTGGGTGAGAGTCT                    |
| 3117           | actcactataggTTTTTTTTTTTTTGTA          |
| 3118           | gcgagTGGATGATTAGACTCT                 |
| 3119           | actcactataggTTTTTTTTTTTTGGGT          |
| 3120           | gcgagGTGAGAGTCTAATCAT                 |
| 3121           | cgactcactataggTTTTTTTTTTTTTGT         |

Las letras mayúsculas subrayadas corresponden a secuencias que hibridan con los amiRNAs y las letras minúsculas a colas añadidas.

Los análisis han sido realizados utilizando dos grupos de plantas para cada muestra y cada grupo fue analizado con tres replicas experimentales. Se han calculado los promedio de la Ct (Cycle threshold) de cada muestra y restado el valor del promedio de la Ct del gene endógeno 5.8 S obteniendo el valor de ( $\Delta Ct$ ). La acumulación del amiRNA se estimó como el valor  $2^{-\Delta Ct}$ .

#### II.4.8 Cuantificación de la acumulación de pequeños RNAs por análisis de Northern blot

Para los análisis de Northern blot de las bandas maduro y estrella de los amiRNA, las fracciones de RNA de pequeño tamaño se separaron en geles de poliacrilamida 12% conteniendo urea 8M y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Hybond™ -N<sup>+</sup> (GE Healthcare). Los RNAs se fijaron a la membrada por

irradiación ultravioleta, se lavaron con tampón "ULTRAhyb™ Oligo Buffer" (Ambion) y se hibridaron a 42°C durante 16 horas en la misma solución con 100 ng de un oligodeoxinucleótido específico marcado radiactivamente. El marcaje se realizó con g<sup>32</sup>P-ATP (Perkin Elmer) (5 µCi, 3000 Ci/mmol) y T4 polinucleótido kinasa (Termo Fisher Scientific). Las sondas marcadas se purificaron en columnas "Illustra MicroSpin G-25" (GE Healthcare) para eliminar el g<sup>32</sup>P-ATP no incorporado. Solo se emplearon sondas con más de 1 millón de cuentas por minuto. Las membranas se lavaron tres veces con una solución 2X SSC (NaCl 3 M, citrato sódico 0.3M) + 0.2% SDS a 40°C para eliminación de los oligodeoxinucleótidos no hibridados. Las membranas se expusieron durante 16 horas en la pantalla de almacenamiento de fósforo Molecular Dynamics durante 16-18 horas y esta fue escaneada utilizando el aparato "Molecular Image FX System" (Bio-Rad).

Como patrones de calibración, todos los geles incluían muestras con cantidades conocidas de oligodeoxinucleótidos de 19 nt con la secuencia de los amiRNAs analizados: #1579, #1935, #2366 para los amiRNAs maduros y #1580, #2019, #2399 para las bandas estrellas, de amiR-C, D y H, respectivamente (Tabla II.4). Las membranas se hibridaron dos veces, cada una con una sonda diferente, una para detectar el amiRNA maduro y otra para el amiRNA estrella. Entre cada hibridación la membrana se sometió a cuatro lavados de 20 minutos a 100°C con una solución 0.5% SDS, 0.1X SSC. Después de los lavados las membranas fueron expuestas durante 16-18 horas para asegurar la completa remoción de las sondas. Para la detección de las bandas estrella y madura de amiR-C se utilizaron los oligodeoxinucleótidos #1579 y #1580, respectivamente; para las de amiR-D, los oligodeoxinucleótidos #1935 y #2019; y para las de amiR-H con los oligodeoxinucleótidos #2366 y #2399 (Tabla II.4).

La densitometría de las señales y la estimación de cantidad de amiRNA acumulado en cada muestra se realizó con el programa "Quantity One" (Bio-Rad).

El análisis de la acumulación de las bandas de amiR-Di se realizó de manera ligeramente diferente. Para poder comparar su acumulación con la de las bandas de amiR-D, se utilizó como sonda un oligodeoxinucleótido con los 19 nt comunes a los dos amiRNAs (#3250 para amiR-D maduro y la banda estrella de amiR-Di, y #1935 para amiR-Di maduro y la banda estrella de amiR-D, Tabla II.4). Sin embargo, como patrones de calibración se utilizaron los oligodeoxinucleótidos con los 21 nt



correspondientes a cada una de las cuatro bandas analizadas (#3222 y 3218 para amiR-D y Di maduros, y #3224 y #3220 para sus bandas estrellas, Tabla II.4).

**Tabla II.4. Listado de oligodeoxinucleótidos utilizados para los análisis de acumulación de los amiRNAs por Northern blot**

| Número | Secuencia (5'-3')      |
|--------|------------------------|
| 1579   | TACGGGGCTTTTCCATCTT    |
| 1580   | AAGATGGAAAAGCCCCGTA    |
| 1935   | TTGGCATGTATGCTTTTTC    |
| 2019   | GAAAAAGCATAACATGCCAA   |
| 2366   | TGGGTGAGAGTCTAATCAT    |
| 2399   | ATGATTAGACTCTCACCCA    |
| 3218   | TGAAAAAGCATAACATGCCAAG |
| 3220   | TGGCATGTATGCTTTTTCACA  |
| 3222   | TTGGCATGTATGCTTTTTCAT  |
| 3224   | GAAAAAGCATAACATGCCAACA |
| 3250   | TGAAAAAGCATAACATGCCA   |

#### II.4.9 Secuenciación de DNA

La secuenciación de DNA de plásmidos y productos de amplificación por PCR se realizó por el método de Sanger por la compañía MacroGen Europe.

#### II.4.10 Secuenciación masiva por el método MiSeq

La secuenciación masiva de la progenie viral se realizó por la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid. Los productos obtenidos por IC-RT-PCR de las plantas transgénicas infectadas con PPV se analizaron por el método de secuenciación de DNA por "Pair-end" 2x300 pb utilizando el sistema MiSeq de Illumina (Illumina Inc.) según el protocolo de la casa comercial. La propuesta de este método es añadir a los extremos de los fragmentos de DNA adaptadores generales para generar librerías de secuencias. También se les añaden secuencias específicas que actúan como código de barras para distinguir entre las distintas muestras. Una vez eliminadas las secuencias de los adaptadores y los códigos de barras, se generan secuencias de 235 nt.

La metodología "Pair-end" obtiene la secuencia a partir de ambos extremos, 5' y 3', del producto de PCR generando dos librerías de secuencias por muestra. Las

lecturas coincidentes en los cien nucleótidos centrales (desde el nucleótido 50 al 150) se agruparon en especies únicas, dejando de lado posibles errores debidos a la baja calidad en el inicio y final de las lecturas. Este agrupamiento se realizó mediante la siguiente línea de comandos Bash:

```
file in `ls *fastq.gz`; do zcat < $file|grep -P "[ACGTN]{100,}"|awk '{print substr($0,50,length($0)-100)}'|sort|uniq -c|awk '{printf ("%s\t%s\n",$2,$1)}'|sort -k2,2nr > $file'.csv'; done
```

Las especies agrupadas con menos de 10 lecturas se excluyeron del análisis posterior. Un análisis preliminar de la muestra control (plantas transformadas con el vector vacío) estableció un umbral de 100 lecturas como el valor de cambios de nucleótido introducidos por azar o como ruido de fondo derivado de la naturaleza de cuasiespecie de la población viral. Se eliminaron también, como posibles artefactos, las especies que aparecían en una sola de las dos colecciones de la misma muestra, aunque se detectara con un número superior a 100 lecturas.

## II.5 CLONACIÓN EN PLÁSMIDOS

### II.5.1 Construcción de los plásmidos que codifican a los precursores de amiRNAs (pre-amiRNAs)

Los precursores de amiRNAs empleados en este trabajo tenían como esqueleto el pre-miRNA159 de *A. thaliana*, de 273 nt, que incluyen una región de doble banda de 19 nt formada por el apareamiento del miRNA maduro y su banda estrella, con 2 nt sin emparejar (Fig. II.2). Los precursores recombinantes se obtuvieron sustituyendo el dúplex y los dos nucleótidos que lo flanquean en sus extremos 3' terminales por secuencias de 21 nucleótidos complementarios en sus 19 nt 5' terminales (Fig. II.2). La secuencia del dúplex localizada en la región 3' terminal del pre-amiRNA (la que se espera que constituya el amiRNA maduro) era perfectamente complementaria con la diana del RNA viral elegida, mientras que los 2 nt 3' terminales de la secuencia 5' proximal podían no aparearse con el RNA viral, al haberse mantenido los dos nucleótidos 3' terminales de miR159\* para favorecer el correcto procesamiento del pre-amiRNA (Fig. II.2).

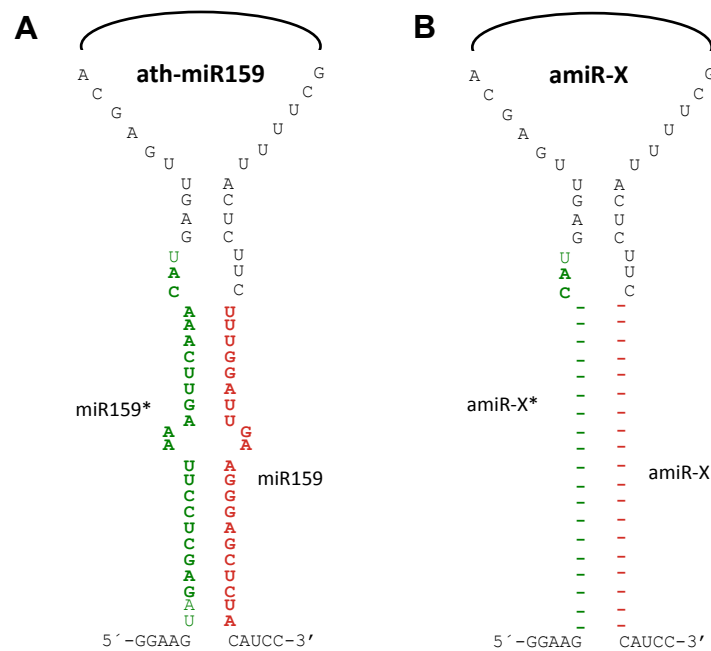


Figura II.2. Estructura del precursor del miR159 de *A. thaliana* (A) y del esqueleto de los amiRNAs construidos para esta tesis (*amiR-X*) (B). En rojo se muestra el miR159 maduro y las rayas que representan a los nucleótidos de las presuntas bandas maduras de los diferentes amiRNAs. En verde se representan las correspondientes bandas estrella.

Como molde para las distintas construcciones se ha utilizado el plásmido pGEM-miR159 (Amp<sup>+</sup>), que contiene la secuencia codificante del pre-miR159 endógeno de *A. thaliana*, flanqueada por los sitios de recombinación attB1 y attB2 del sistema Gateway (Thermo Fisher Scientific) clonada en el vector pGEM-T (Promega) (M. Zhao, J.A. García y C. Simón-Mateo, resultados sin publicar). Los plásmidos pGEM-amiR-C, pGEM-amiR-D, pGEM-amiR-H, y pGEM-Hm empleados en esta tesis, se habían obtenido reemplazando la secuencia codificante del dúplex miR159 por los de amiR-C, amiR-D, amiR-H y amiR-Hm en pGEM-miR159 (M. Zhao, J.A. García y C. Simón-Mateo, resultados sin publicar). Para la construcción de pGEM-amiR-H<sub>+3</sub> y pGEM-amiR-H<sub>-1</sub> se amplificaron fragmentos de DNA por PCR usando como molde pGEM-amiR-H y como iniciadores las parejas de oligodeoxinucleótidos #2770/#2771 (H<sub>+3</sub>) y #2768/ #2769 (H<sub>-1</sub>). Para la construcción de pGEM-amiR-Di en la PCR se usó como molde pGEM-amiR-D y como iniciadores los oligodeoxinucleótidos #2858 y #2859. En todos los casos, los iniciadores incluían las secuencias codificantes de los correspondientes amiRNAs maduros y sus bandas estrella (Tabla II.5). Los productos de

PCR se digirieron con *Bgl*III y *Xma*I y se clonaron en pGEM-miR159 digerido con las mismas enzimas.

Para la construcción de pGEM-amiR-C+D, se amplificaron por PCR individualmente las secuencias codificantes de pre-amiR-C y pre-amiR-D, utilizando como moldes los plásmidos pGEM-amiR-C y pGEM-amiR-D y como iniciadores las parejas de oligodeoxinucleótidos #1191/#1748 (amiR-C) y #1749/#1194 (amiR-D) (Tabla II.5). Los productos de PCR de las construcciones amiR-C y amiR-D se digirieron con las parejas de enzimas de restricción *Bgl*III/ *Spe*I y *Spe*I/*Xma*I, respectivamente y se clonaron mediante una triple ligación en pGEM-miR159 digerido con *Bgl*III y *Xma*I. Los productos de las digestiones se purificaron de gel y los dos fragmentos del amiR-C y amiR-D se ligaron mediante una triple ligación al vector generando la construcción doble pGEM-amiR-C+D. Del mismo modo que con las construcciones individuales, la construcción doble se digirió con la enzima *Eco*RV (New England Biolabs) y se clonó en el vector binario mediante recombinación por *Gateway* conforme descrito por el fabricante para generar el vector pMDC-amiR-C+D.

A continuación, las construcciones pre-amiRNAs de los clones pGEM-amiR-H<sub>+3</sub>, pGEM-amiR-H<sub>1</sub> y pGEM-amiR-C+D fueron transferidos primero al vector de entrada GATEWAY pDONR207 (Gen<sup>+</sup>), y a continuación al vector de destino pMDC32 (Kan<sup>+</sup>) (Curtis y Grossniklaus, 2003) utilizando los kits "BP Clonase II enzyme mix" y "LR Clonase II enzyme mix" (Thermo Fisher Scientific). Los clones resultantes, pMDC-amiR-H<sub>+3</sub>, pMDC-amiR-H<sub>1</sub> y pMDC-amiR-C+D, junto con los previamente obtenidos empleando una estrategia similar pMDC-amiR-C, pMDC-amiR-D, pMDC-amiR-H y pMDC-amiR-Hm (M. Zhao, J.A. García and C. Simón-Mateo, resultados sin publicar), se utilizaron para la transformación de *N. benthamiana*. El mismo protocolo GATEWAY se usó para transferir la construcción pre-amiR-C+D al vector pGWB2 (Kan<sup>+</sup>) (Nakagawa *et al.*, 2007), y el plásmido resultante se empleó para la transformación de *P. domestica*.

Las enzimas de restricción se emplearon según las especificaciones de cada proveedor (New England Biolabs o Thermo Fisher Scientific). Para la ligación de fragmentos de DNA se utilizó la ligasa de DNA del bacteriófago T4 (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Tabla II.5. Listado de los oligodeoxinucleótidos utilizados para la construcción de plásmidos que codifican pre-miRNAs**

| Número | Secuencia (5'-3')   |
|--------|---|
| 1191   | CGGA <b><i>A</i></b> <u><i>GATCTT</i></u> GATCTGACGATGGAAGAAAAGATGGAAAAGCCCCGT<br><u>ACATGAGTTGAGCAGGGTA</u>    |
| 1194   | TCCCCC <b><i>G</i></b> <u><i>GGG</i></u> GATGATGAAAAAGCATACATGCCAAGAAGAGTAAAAGC<br>CATT                         |
| 1748   | GAT <b><i>A</i></b> <u><i>CTAGTCT</i></u> CGATGAAAAGATGGAAAAGCCCCGTAG   |
| 1749   | CGAG <b><i>A</i></b> <u><i>CTAGT</i></u> GATCTTGATCTGACGATGGAAG   |
| 2768   | CGGA <b><i>A</i></b> <u><i>GATCTT</i></u> GATCTGACGATGGAAG <u>ACCTGGGTGAGAGTCTAATCA</u><br>CATGAGTTGAGCAGGGTA   |
| 2769   | TCCCCC <b><i>G</i></b> <u><i>GGG</i></u> GATGACCTGGGTGAGAGTCTAATCAGAAGAGTAAAAGC<br>CATT                         |
| 2770   | CGGA <b><i>A</i></b> <u><i>GATCTT</i></u> GATCTGACGATGGAAGGGGTGAGAGTCTAATCATCCA<br>CATGAGTTGAGCAGGGTA           |
| 2771   | TCCCCC <b><i>G</i></b> <u><i>GGG</i></u> GATGGGGTGGAGAGTCTAATCATCCAGAAGAGTAAAAGC<br>CATT                        |
| 2858   | CGGA <b><i>A</i></b> <u><i>GATCTT</i></u> GATCTGACGATGGAAG <u>GCTTGGCATGTATGCTTTTTTCAC</u><br>ATGAGTTGAGCAGGGTA |
| 2859   | TCCCCC <b><i>G</i></b> <u><i>GGG</i></u> GATGCTTGGCATGTATGCTTTTTTCAGAAGAGTAAAAGCC<br>ATTA                       |

Letras en negrita corresponden a los sitios de restricción insertados y las subrayadas corresponden a cualquiera de las dos bandas de los dúplex de miRNA.

### II.5.2 Clonación del cDNA de los extremos 5' de fragmentos de RNA viral

Para identificar los cortes en la hebra negativa del RNA viral producidos por el complejo RISC (“RNA-induced silencing complex”) de la planta se utilizó una versión ligeramente modificada del clásico método de Amplificación Rápida de Extremos 5' de cDNAs (5'-RACE) (Fig. II.3).

Se purificó RNA total por el método de Trizol (siguiendo el protocolo del fabricante) a partir de las hojas infectadas con PPV a los 9 días post inoculación. A continuación, se ligó al extremo 5' del RNA el adaptador 5'RACE Adapter (kit “FirstChoice RLM-RACE”, Ambion) utilizando la enzima T4 RNA ligasa (Promega). A partir de ese RNA se sintetizó cDNA con la enzima transcriptasa reversa de M-MuLV (New England Biolabs) utilizando como iniciador el oligodeoxinucleótido reverso #2557 que hibrida en la hebra negativa del genoma viral. Los siguientes pasos consistieron en dos PCR consecutivas como se describe en la Figura II.3, utilizando como iniciadores directos oligodeoxinucleótidos complementarios al adaptador (5'RACE externo para la primera PCR y 5'RACE interno para la segunda, ambos

formando parte del (kit "FirstChoice RLM-RACE", Ambion) y como iniciadores reversos los oligodeoxinucleótidos complementarios a la hebra anti-genómica de PPV #2556, para la primera PCR y #2555, para la segunda (todos los oligonucleótidos usados en el protocolo, se muestran en la Tabla II.6). Todas las PCRs se realizaron utilizando la enzima AmpliTaq DNA polimerasa (Thermo Fisher Scientific). El producto de la segunda PCR de tamaño esperado (170 pares de bases) fue purificado por electroforesis en gel de agarosa 1.5%, clonado en el vector TOPO-TA (Thermo Fisher Scientific) conforme descrito en el protocolo del fabricante.

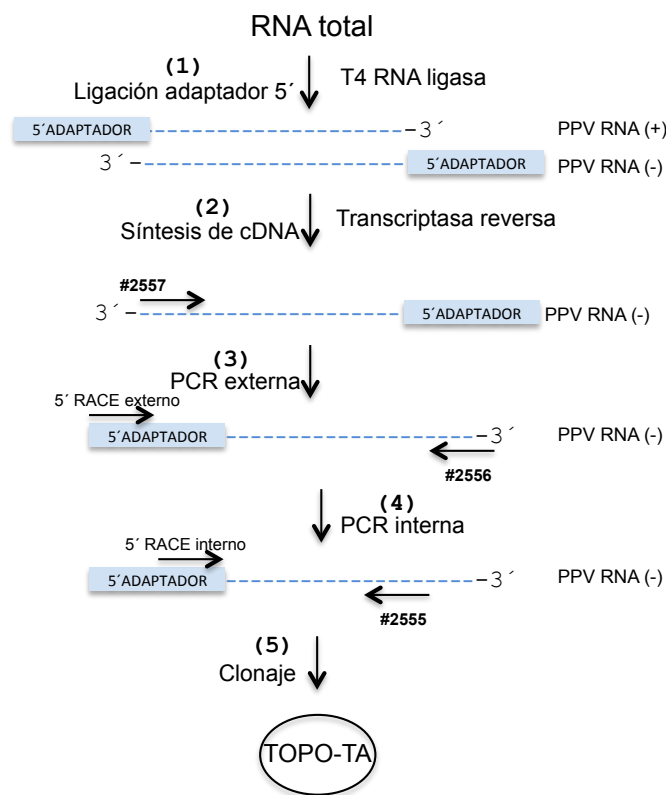


Figura II.3 Análisis del corte por RISC en la hebra negativa de PPV observada por el método 5'-RACE según se explica en el apartado II.5.4.

**Tabla II.6. Listado de oligonucleótidos utilizados para los análisis de 5'-RACE**

| Nombre/Número  | Secuencia (5'-3')                             |
|----------------|---|
| 5'RACE Adapter | GCUGAUGGCGAUGAAUGAACACUGCGUUUGCUGGCUUUGAUGAAA |
| 5'RACE externo | GCTGATGGCGATGAATGAACACTG                      |
| 5'RACE interno | CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG           |
| 2555           | GCCATTGTTGGATCATGCGA                          |
| 2556           | GATGGGGAAACACAAGTGGAG                         |
| 2557           | CGGACGATGAAATGAGCATC                          |

## II.6 TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS DE *N. benthamiana* y *P. domestica*

Se transformaron plantas de *N. benthamiana* con las distintas construcciones de pre-amiRNAs clonadas en pMDC32 mencionadas en el apartado II.5.1 por el método de transformación de discos de hojas de Horsch *et al.* (1985), como se indica a continuación.

Se recolectaron hojas sanas y sin daños de plantas jóvenes de *N. benthamiana* crecidas en invernadero y se esterilizaron en una solución de lejía comercial al 1% durante 5 minutos con agitación suave, enjuagándose a continuación 3 veces con agua estéril. Se cortaron las hojas en cuadrados pequeños para producir heridas en los bordes. Los explantes se precultivaron durante 2 días vueltos del revés en medio MS con 1 µg/ml de BAP, 0.1 µg/ml de NAA y 1% de sacarosa solidificado con agar 0.6% (medio de regeneración), para permitir el crecimiento inicial y eliminar los explantes que se hubieron dañado durante el manejo o la esterilización de los mismos. Se escogieron para la inoculación los mejores explantes que mostraban protuberancias.

Se cultivaron células de *A. tumefaciens* que portaban los plásmidos adecuados en 10 ml de medio LB con 25 µl/ml de rifampicina y 50 µl/ml de kanamicina. Las bacterias se recolectaron por centrifugación a 4000 x g durante 5 minutos y se resuspendieron en 10 ml de medio MS con acetosiringona 150 µM.

Los explantes se inocularon por inmersión en la suspensión de *A. tumefaciens* y agitación suave durante 15 minutos. Después de secarlos ligeramente con papel estéril para eliminar el exceso de líquido, se colocaron los explantes en placas con medio de regeneración y se incubaron a 25°C durante 2 días bajo luz poco intensa. Posteriormente, se lavaron los explantes varias veces con medio MS conteniendo 500 µl/ml de carbenicilina, se secaron ligeramente, se transfirieron a placas con medio de regeneración que contenía 40 µl/ml de higromicina y 250 µl/ml de cefotaxima y se incubaron a 25°C con 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad, transfiriéndolos a medio de selección fresco cada semana.

Al cabo de varias semanas empezaban a aparecer brotes, una vez alcanzado el tamaño aproximado de 0.5 cm, los brotes individuales se transfirieron a medio MS con 1% de sacarosa y 40 µg/ml higromicina solidificado con 0.6% (medio de enraizamiento). Según fueron enraizando las plántulas, se transfirieron a macetas con

tierra protegidas con plástico para aclimatación. Tras 4-5 días se removía el plástico y se mantenían las plantas en condiciones de invernadero descritos anteriormente.

Las plantas obtenidas por el método descrito se autofecundaron y se recolectaron sus semillas. Las semillas procedentes de las líneas de interés se lavaron con una solución de etanol y tras secarlas se sembraron en placas de medio MS solidificado que contenía 40 µg/ml de higromicina y 1% de sacarosa, a razón de 40 semillas por placa. Las placas se incubaron a 25°C con 14 horas de luz y 10 de oscuridad. Aproximadamente 2 semanas después de la germinación se pasaron a macetas las plántulas de las líneas transgénicas con la segregación de interés.

La transformación de árboles de *P. domestica* se realizó en el grupo del Dr. Lorenzo Burgos del Departamento de Mejora Vegetal (CEBAS-CSIC, Murcia) conforme a un método previamente, usando como criterio de selección la resistencia a kanamicina (Faize *et al.*, 2011; Faize *et al.*, 2013).

## II.7 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

### II.7.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida y detección por Western Blot

Se recolectaron hojas y se homogeneizaron en tampón fosfato 5 mM, pH 7.5 a 4°C. Las proteínas del homogeneizado se trataron con tampón de disociación (150 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2% SDS, 6 M urea, 5% β-mercaptoethanol, 10% glicerol, 0.05% azul de bromofenol, pH 7.5) separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (12%) en presencia de SDS (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). A continuación, las proteínas separadas en los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se analizaron por inmunorreacción con un anticuerpo primario de conejo específico de la CP del PPV. Como reactivo secundario se utilizó un anticuerpo contra IgGs de conejo marcado con peroxidasa (Jackson #111-035-003). El revelado se realizó por quimioluminiscencia con el "kit LitleAblo" (Euroclone). La señal generada se detectó en películas fotográficas y se cuantificó usando el software de análisis "Image Lab™ 6.0" (Bio-Rad).



### **II.7.2 Detección de la proteína fluorescente verde (GFP)**

La fluorescencia emitida por la GFP en hojas de *N. benthamiana* se monitorizó utilizando el microscopio de epifluorescencia "MZ FLIII" (Leica Microsystems) utilizando filtros GFP3 (excitación 470/40 nm y bloqueo 525/50 nm). Las imágenes se captaron con la cámara digital OLYMPUS DP 70 acoplada al microscopio con el uso de los programas "DP Controller" y "DP manager" (Olympus Optical Co).

### III. RESULTADOS

#### III.1. Distintos microRNAs artificiales difieren en su capacidad de proteger frente al PPV

Estudios anteriores de diferentes laboratorios habían demostrado que la expresión de microRNAs artificiales (amiRNAs) puede generar resistencia antiviral en plantas (Duan *et al.*, 2008; Niu *et al.*, 2006; Qu *et al.*, 2007; Simón-Mateo y García, 2006). Como primer objetivo de esta tesis nos propusimos comprobar que esta estrategia puede ser utilizada para interferir con la infección del *Plum pox virus* (PPV) y comparar la eficacia de diversos amiRNAs dirigidos contra este virus.

En un trabajo previo de nuestro laboratorio se eligieron potenciales dianas de amiRNAs en base a datos de secuenciación masiva de siRNAs virales y de detección de posibles sitios de corte de RISC en el genoma viral usando 5'RACE. Se consideraron como regiones especialmente accesibles a la maquinaria de silenciamiento de RNA aquellas que presentaron sitios de ruptura frecuente, identificados por el 5'RACE, a pesar de que había pocos siRNAs virales capaces de dirigir a RISC hacia ellos. Como esqueleto se utilizó el pre-miR-159 de *Arabidopsis thaliana*. La primera serie de amiRNAs se evaluó en un sistema de expresión transitoria mediante agroinfiltración, que permitió seleccionar tres amiRNAs que interferían eficazmente con la infección del PPV (resultados sin publicar de M. Zhao, F. Mesel, J.A. García y C. Simón-Mateo, Fig. III.1). Cada uno de estos amiRNAs se dirige a una región distinta del RNA genómico: amiR-C, dirigido a la secuencia codificante de la RNA replicasa N1b; amiR-D, dirigido a la secuencia codificante de la proteína de la cápsida CP, y amiR-H, dirigido a la región 3' no codificante (3'NCR). También se construyó un pre-miRNA, cuyo procesamiento debe producir amiR-C y amiR-D (en adelante a esta mezcla se le denominará amiR-C+D); la expresión de este pre-miRNA con el sistema de agroinfiltración también causaba resistencia frente al PPV.

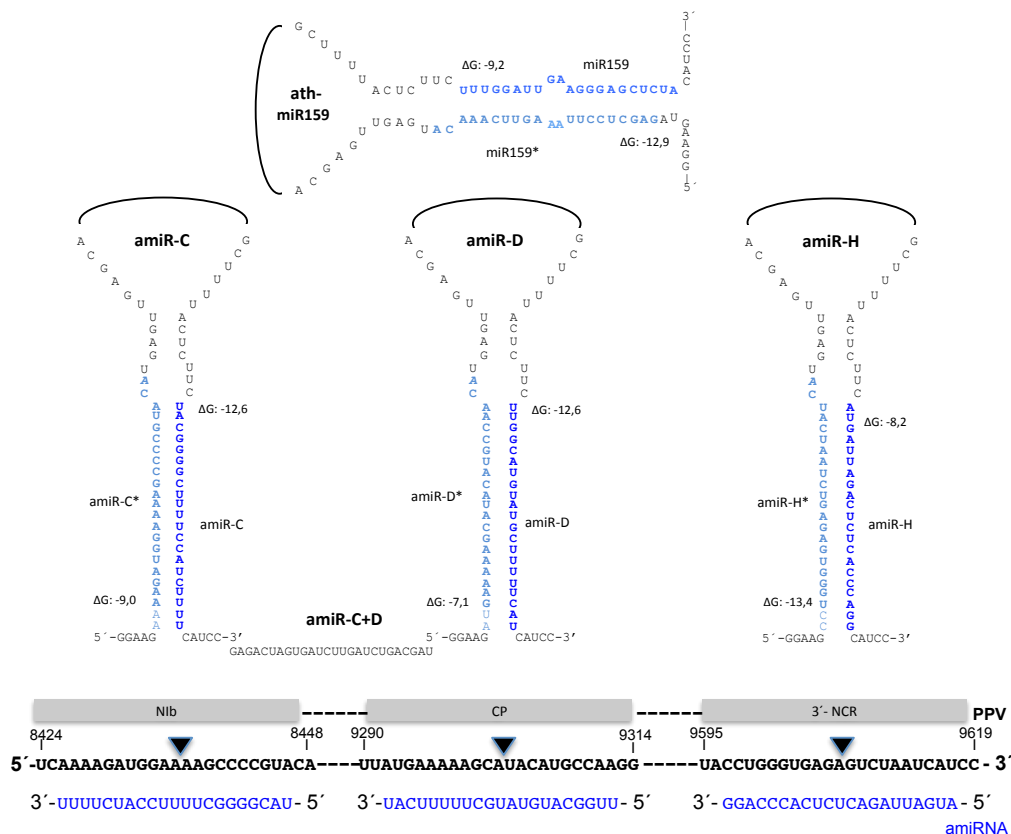


Figura III.1. Representación esquemática de los precursores de amiR-C, amiR-D, amiR-H y amiR-C+D contruidos utilizando como molde el pre-miR159 de *A. thaliana*. Se resalta la secuencia de los amiRNA maduro (azul oscuro) y amiRNA estrella (\* azul claro) predichos. La energía libre del dúplex en los extremos 5' de cada banda (kcal/mol) está calculada según Khvorova *et al.* (2003). En la parte inferior se muestran las dianas de los amiRNAs maduros esperadas en las secuencias codificantes de NIB y CP y en la 3'NCR del RNA genómico del PPV, numeradas según Laín *et al.* (1989), y se señalan con cabezas de flecha los sitios previstos de corte por el complejo RISC.

### III.1.1 La expresión transgénica de amiR-C y amiR-D, individual o conjunta, pero no la de amiR-H, es capaz de proteger a *N. benthamiana* frente a la infección por el PPV

Para poder determinar el efecto de la expresión constitutiva de los amiRNAs seleccionados, se transformaron plantas de *N. benthamiana* con los pre-miRNAs correspondientes, clonados en el vector pMDC32. También se transformaron plantas con el plásmido vacío (vector) para usarse como control.

Para el análisis inicial se eligieron siete líneas transformadas con pre-amiR-C, once líneas con pre-amiR-D, once con la construcción doble pre-amiR-C+D, siete líneas con pre-amiR-H y seis líneas control transformadas con el vector vacío. La presencia del transgén se verificó por PCR en las plantas inicialmente transformadas. Cinco plantas de la generación F1 de cada una de las líneas transgénicas se inocularon por agroinfiltración con pBIN-PPV-nk-GFP, un clon cDNA del PPV que expresa como

marcador visual la proteína fluorescente verde (GFP). Para rastrear la infección viral, se monitorizó con un microscopio de epifluorescencia la progresión de la GFP a lo largo de los 27 días siguientes a la inoculación, tanto en las hojas inoculadas como en las superiores.

Cada línea se catalogó inicialmente como resistente cuando ninguna de las plantas resultó infectada sistémicamente, parcialmente resistente cuando se infectaron algunas plantas, pero otras no, y susceptible cuando todas las plantas de la línea se infectaron. Según este criterio, la mayoría de las líneas amiR-C, amiR-D y amiR-C+D eran Resistentes, aunque también se encontraron algunas líneas Parcialmente resistentes y Susceptibles. Por el contrario, todas las líneas amiR-H, al igual que las 6 líneas transformadas con el vector, se mostraron susceptibles (Tabla III.1).

Tabla III.1. Susceptibilidad frente al PPV de plantas de la generación F1 de líneas de *N. benthamiana* transformadas con diferentes construcciones amiRNA.

| Susceptibilidad<br>Construcción | Total <sup>a</sup> | Resistente <sup>b</sup>  | Parcialmente<br>resistente <sup>b</sup> | Susceptible <sup>b</sup>         |
|---------------------------------|--------------------|--|---|----------------------------------|
| amiR-C                          | 7                  | 4 <sup>c</sup> , 11, <b>12<sup>d</sup></b> , 14                | 2 (2/5) <sup>e</sup>                    | 3, <b>8</b>                      |
| amiR-D                          | 11                 | <b>1</b> , 4, 5, 6, <b>7</b> , <b>8</b> , 9, 10, 11, 13        | <b>2</b> (1/5); 11(4/5)                 |                                  |
| amiR-C+D                        | 11                 | 3, 4, <b>6</b> , <b>9</b> , <b>10</b> , 12, <b>13</b> , 16, 17 |   | 7, 14                            |
| amiR-H                          | 7                  |  |   | 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8              |
| Vector                          | 6                  |  |   | <b>1</b> , 2, 3, <b>4</b> , 5, 6 |

<sup>a</sup> Número total de líneas analizadas. <sup>b</sup> Resistente: ninguna de las plantas inoculadas se infectó; Parcialmente resistente: algunas plantas se infectaron y otras no; Susceptible: todas las plantas inoculadas se infectaron. <sup>c</sup> Nombre de las líneas analizadas. <sup>d</sup> En negrita se resaltan las líneas elegidas para el análisis de la generación F2. <sup>e</sup> Número de plantas infectadas sistémicamente/número de plantas inoculadas.

En algunas de las plantas que resultaron infectadas se analizó la secuencia del RNA de la descendencia viral, con objeto de verificar si la infección se había visto facilitada por alguna mutación en la diana del correspondiente amiRNA. Este era el caso de las plantas infectadas de una línea amiR-C y dos líneas amiR-D que se analizaron y que mostraban lo que hemos definido como resistencia parcial, y de las dos plantas analizadas de dos líneas amiR-H susceptibles, si bien en estas dos últimas plantas, parecía seguir siendo predominante el virus silvestre. Por el contrario, en las dos plantas de líneas amiR-C+D susceptibles (7 y 14) que se analizaron y en dos plantas control, no se detectaron mutaciones en la secuencia viral. Estos resultados se describen con más detalle en el capítulo III.2.

Nos planteamos a continuación, a la vez que confirmar los primeros resultados, verificar la estabilidad de los fenotipos después de la propagación sexual de las líneas transgénicas y evaluar la contribución del grado de zigosis al comportamiento frente al virus. También pretendimos verificar si la inoculación previa con el virus, sin llegar a establecer una infección, podía producir algún efecto epigenético que influyera sobre la susceptibilidad al virus en generaciones posteriores. Con estos objetivos, se eligió una serie de líneas cuya segregación del marcador de resistencia a higromicina sugería que tenían un solo locus de inserción, y que presentaban distintos grados de susceptibilidad a la infección. Algunas de las plantas de las líneas elegidas, previamente inoculadas, o no, se autofecundaron y sus semillas se germinaron en presencia de higromicina para determinar su grado de zigosis. Seis plantas de cada progenie F2 se inocularon por agroinfiltración como en el experimento anterior. De manera semejante a como se hizo en ese experimento, se evaluó la susceptibilidad a la infección, monitorizando la presencia de GFP en las hojas inoculadas y en las superiores.

Los resultados, detallados en la Tabla III.2, muestran un comportamiento de las diferentes líneas transgénicas muy similar al observado en el primer experimento, por lo que la zigosis del transgén o la historia previa de inoculación no parece afectar de manera significativa a la susceptibilidad a la infección. Ninguna de las plantas F2 de las líneas amiR-D 1, -D 7, -D 8, -C+D 6, -C+D 9, -C+D 10, -C+D 11, clasificadas inicialmente como Resistentes (Tabla III.1) se infectó sistémicamente, si bien en una de las plantas descendientes de la planta D 1.9 se observó cierta diseminación local de GFP a tiempos muy tardíos; el análisis por IC-RT-PCR de la hoja inoculada de esta planta confirmó su infección y la emergencia en ella de una variante viral con una mutación en la diana del amiRNA. En el caso de la línea amiR-C 12, la completa resistencia observada en la generación F1 se mantuvo en la descendencia F2 de la planta C 12.5, aunque una de las plantas de cada una de las otras dos descendencias analizadas resultó infectada. Sin embargo, estas plantas se infectaron con notable retraso respecto a los controles, y su progenie viral tenía mutaciones en la diana de amiR-C, lo que es indicativo de la fuerte presión selectiva bajo la que tuvo lugar la infección. Una situación similar se observó en la línea amiR-C 2, inicialmente clasificada como Parcialmente resistente (Tabla III.1); una de las plantas de la única descendencia F2 analizada se infectó con retraso y se originó una progenie viral con mutaciones en la diana del amiR-C.

En cuanto a las descendencias F2 de las líneas clasificadas inicialmente como Susceptibles, prácticamente todas sus plantas resultaron infectadas como las de la generación anterior (Tabla III.2). Sin embargo, el comportamiento no fue igual en todos los casos. Las plantas de la línea amiR-C 8 se infectaron de manera similar a los controles, y al analizar su progenie viral no se observaron mutaciones en la diana del amiRNA, lo que sugiere que esta línea no opone una resistencia significativa a la infección viral. En cuanto, a las dos descendencias F2 de la línea amiR-C+D 7, todas las plantas, menos una, resultaron infectadas, pero la infección se puso de manifiesto a diferentes tiempos, siempre retrasada con respecto a los controles, y en las cinco plantas que se analizaron, las progenies virales habían introducido mutaciones en la diana del amiR-C, en la del amiR-D, o en ambas (Tabla III.2). Este resultado indica que en esta línea los productos del transgén amiR-C y amiR-D proporcionan cierta protección frente al PPV, pero que no es suficiente para evitar el inicio de la infección y la emergencia de variantes mutadas capaces de una multiplicación eficiente. Esta explicación es también aplicable a las descendencias de las dos líneas amiR-H analizadas; mientras que las plantas descendientes de la planta H 8.7 se infectaban de manera muy similar a los controles, las de las dos plantas de la línea amiR-H 6, lo hacían con cierto retraso. Pero el hecho de que en todos los casos la progenie viral acumulara mutaciones en la diana del amiRNA apoya la idea de que las dos líneas amiR-H plantean cierta resistencia antiviral.

Tabla III.2. Susceptibilidad frente al PPV de plantas de la generación F2 de líneas de *N. benthamiana* transformadas con diferentes construcciones amiRNA.

| Generación |                        | Infección      |    |   |   |   |                 |    |    |    |    | Secuencia de la progenie <sup>c</sup> |    |                                  |
|------------|------------------------|----------------|----|---|---|---|-----------------|----|----|----|----|---------------------------------------|----|----------------------------------|
| F1         | F2 <sup>a</sup>        | Local          |    |   |   |   | Sistémica       |    |    |    |    |                                       |    |                                  |
| C 2        | 2.9<br>Heterocigótica  | N <sup>b</sup> | N  | N | N | N | 15 <sup>b</sup> | N  | N  | N  | N  | N                                     | 20 | p6: A8435G,<br>A8437G,<br>A8438G |
| C 8        | 8.8<br>Homocigótica    | 6              | 6  | 6 | 6 | 6 | 6               | 10 | 13 | 13 | 10 | 10                                    | 10 | p2: wt                           |
|            | 8.9<br>Heterocigótica  | 6              | 6  | 6 | 6 | 6 | 6               | 10 | 10 | 10 | 10 | 10                                    | 10 | p2: wt                           |
| C 12       | 12.5<br>Heterocigótica | N              | N  | N | N | N | N               | N  | N  | N  | N  | N                                     | N  |                                  |
|            | 12.6<br>Homocigótica   | N              | 29 | N | N | N | N               | N  | 29 | N  | N  | N                                     | N  | p2: C8441U                       |
|            | 12.10<br>Homocigótica  | N              | 7  | N | N | N | N               | N  | 15 | N  | N  | N                                     | N  | p2: C8441U,<br>G8444a            |
| D 1        | 1.2*<br>Homocigótica   | N              | N  | N | N | N | N               | N  | N  | N  | N  | N                                     | N  |                                  |

|        |                                |                   |                   |   |
|--------|--------------------------------|-------------------|-------------------|---|
|        | 1.9<br><b>Homozigótica</b>     | N N N N N 19      | N N N N N N       | p6: A9296g  |
| D 2    | 2.3*<br><b>Heterozigótica</b>  | N N N N N 19      | N N N N N N       |   |
|        | 2.6<br><b>Heterozigótica</b>   | N 19 N N N N      | N 32 N N N N      | p2: G9294A;<br>G9300A                                     |
| D 7    | 7.3*<br><b>Homozigótica</b>    | N N N N N N       | N N N N N N       |   |
|        | 7.9<br><b>Homozigótica</b>     | N N N N N N       | N N N N N N       |   |
| D 8    | 8.1*<br><b>Homozigótica</b>    | N N N N N N       | N N N N N N       |   |
|        | 8.9<br><b>Homozigótica</b>     | N N N N N N       | N N N N N N       |   |
| C+D 6  | 6.8<br><b>Homozigótica</b>     | N N N N N N       | N N N N N N       |   |
|        | 6.10<br><b>Homozigótica</b>    | N N N N N N       | N N N N N N       |   |
| C+D 7  | 7.7<br><b>Heterozigótica</b>   | 17 6 7 12 10 14   | 17 10 12 17 17 17 | p1: C8440U<br>p6: C8441u,<br>G8444a;<br>A9299g;<br>C9305u |
|        | 7.8<br><b>Heterozigótica</b>   | 7 17 N 7 12 10    | 14 17 N 14 17 17  | p2: G9300a;<br>p5: C8441u,<br>G8444a; p6:<br>A9299g       |
| C+D 9  | 9.1*<br><b>Homozigótica</b>    | N N N N N N       | N N N N N N       |   |
|        | 9.7<br><b>Homozigótica</b>     | N N N N N N       | N N N N N N       |   |
| C+D 10 | 10.6<br><b>Heterozigótica</b>  | N N N N N N       | N N N N N N       |   |
|        | 10.8<br><b>Homozigótica</b>    | N N N N N N       | N N N N N N       |   |
| C+D 13 | 13.1*<br><b>Heterozigótica</b> | N N N N N N       | N N N N N N       |   |
|        | 13.10<br><b>Homozigótica</b>   | N N N N N N       | N N N N N N       |   |
| H 6    | 6.6<br><b>Homozigótica</b>     | 13 10 10 10 10 10 | 13 13 13 13 13 13 | p1: C9610U;<br>p2: U9609c,<br>C9610u                      |
|        | 6.8<br><b>Homozigótica</b>     | 10 10 10 10 10 10 | 13 13 13 13 13 13 | p2: A9605c,<br>C9610u                                     |
| H 8    | 8.7<br><b>Homozigótica</b>     | 6 6 6 6 6 6       | 10 10 10 10 13 10 | p2: A9605c,<br>C9610u                                     |
| V 1    | 1.6<br><b>Homozigótica</b>     | 6 6 6 6 6 6       | 10 10 10 10 10 10 |   |
| V 4    | 4.6<br><b>Homozigótica</b>     | 6 6 6 6 6 6       | 10 10 10 10 10 10 |   |

<sup>a</sup> Se han catalogado como homocigóticas las líneas en la que el marcador de resistencia a higromicina mostraba un patrón de segregación similar a 3:1 en la generación F1 y no se segregaba en la F2, y como heterocigóticas las que mostraban una segregación similar a 3:1 en las dos generaciones. <sup>b</sup> Se indica el día de aparición de GFP, o que no se observó en ningún momento (N). <sup>c</sup> Se indican las mutaciones detectadas en la progenie viral cuando las plantas indicadas, recogidas a los 27 dpi, se analizaron por IC-RT-PCR y secuenciación; en mayúsculas se representan las sustituciones completas y en minúsculas, coexistencia de los dos nucleótidos; la numeración es según Laín et al. (1989). \* Planta de la generación F1 inoculada, pero no infectada, con el PPV.

En su conjunto, estos resultados muestran que, aunque hay diferencias apreciables entre líneas de la misma construcción, son más importantes las diferencias asociadas a la expresión de distintos amiRNAs. A pesar de que en el sistema de agroinfiltración los tres amiRNAs, amiR-C, amiR-D y amiR-H, mostraban una potente actividad antiviral, en el sistema transgénico, amiR-C y amiR-D son mucho más eficaces que amiR-H. Hay que destacar también que cuando la potencia antiviral no es suficiente, la expresión conjunta de dos amiRNAs con dianas diferentes, no impide la emergencia de variantes virales virulentas.

### **III.1.2 La resistencia antiviral está positivamente correlacionada con los niveles de acumulación del amiRNA**

Con el objetivo de averiguar cómo contribuye la cantidad de amiRNA a las diferencias de resistencia antiviral observadas, se analizaron por Northern blot los niveles de acumulación de las bandas madura y estrella de los amiRNA expresados en plantas no infectadas de líneas amiR-C, amiR-D, amiR-C+D y amiR-H con diferentes grados de resistencia.

Se analizaron muestras con dos plantas de la generación F2 por duplicado. En el caso de la construcción C, se compararon las líneas amiR-C 12 y -C 2, inicialmente clasificadas como Resistente y Parcialmente resistente, respectivamente (Tabla III.1). De la línea amiR-C 12 se analizaron dos descendencias F2, la C 12.5, que había conservado la resistencia estricta observada en la generación F1 y la C 12.10, una de cuyas plantas había resultado infectada (Tabla III.2). Considerados en su conjunto, las dos descendencias F2 de la línea amiR-C 12 no mostraban diferencias significativas de acumulación ni de la banda madura ni de la estrella del amiRNA (Fig. III.2). Tampoco se observaron diferencias de acumulación de la banda madura entre las líneas amiR-C 12 y -C 2; sin embargo, mientras que las cuatro muestras de la línea amiR-C 12 presentaban niveles apreciables, similares en todas ellas, de banda estrella, esta banda



era prácticamente indetectable en las dos muestras de la línea amiR-C 2 (Fig. III.2). Un punto a destacar es que mientras que los niveles de acumulación de amiRNA eran muy similares en las dos muestras de la descendencia de la planta amiR-C 12.5, en la que todas las plantas analizadas fueron resistentes al PPV, los de las bandas maduras de las muestras de las descendencias C 12.10 y C 2.9 eran bastantes dispares (Fig. III.2), lo que podría estar de acuerdo con la ligera heterogeneidad en la respuesta a la infección de estas descendencias (Tabla III.2).

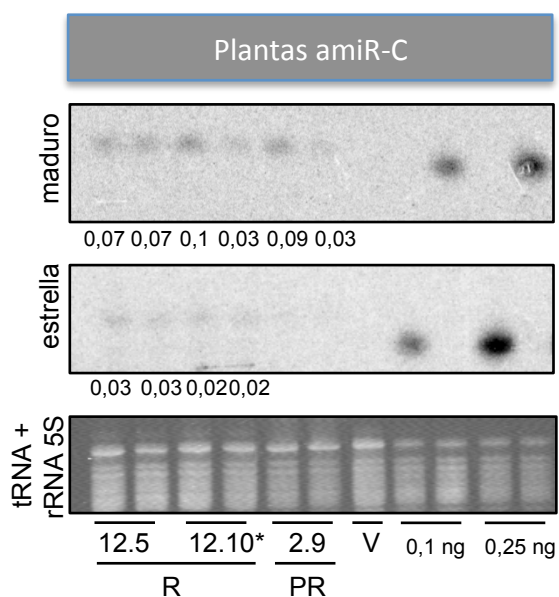


Figura III.2. Acumulación de amiR-C en diferentes líneas de *N. benthamiana* transgénicas, analizada mediante de Northern blot. Se incluyeron en el análisis dos réplicas biológicas, cada una compuesta por hojas jóvenes de dos plantas no inoculadas de la generación F2 descendientes de las indicadas (7  $\mu$ g de una preparación de RNAs de pequeño tamaño). R y PR indican líneas resistentes y parcialmente resistentes, según se define en la Tabla III.1; el asterisco indica que una de las 5 plantas descendientes de la planta 12.10 que se inocularon resultó infectada (Tabla III.2). Como control negativo se cargaron 7  $\mu$ g de una preparación de RNAs de pequeño tamaño de plantas transformadas con vector vacío (V). La membrana fue incubada con oligodeoxinucleótidos complementarios de amiR-C maduro (#1580) y de su banda estrella (#1579) marcados con  $^{32}$ P. Como patrones de calibración se cargaron cantidades conocidas de oligodeoxinucleótidos con la secuencia de amiR-C maduro (#1579) y de su banda estrella (#1580) mezclados con 7  $\mu$ g de una preparación de RNAs de pequeño tamaño de *N. benthamiana* silvestre. La densitometría de las señales y la estimación de cantidad de amiRNA acumulado en cada muestra se realizó con el programa Quantity One. Los valores resultantes (en ng) se muestran debajo de cada carril. En la parte inferior, el gel teñido con BrEt muestra los tRNAs y el rRNA 5S como control de carga.

Más significativos parecen los resultados obtenidos para las líneas de la construcción D. Mientras que se observaban niveles apreciables de acumulación de banda de amiRNA madura de las descendencias F2 uniformemente resistentes a la infección del PPV (las de las plantas D 7.3 y D 8.9), esta banda era indetectable en las descendencias de las plantas D 2.6 y D 1.9, alguno de cuyos individuos había resultado

infectado (Tabla III.2 y Fig. III.3). Este resultado sugiere que la débil resistencia de algunas de las líneas D se debe a una pobre expresión de su transgén. Los niveles de acumulación de banda estrella eran demasiado bajos para poderse detectar en cualquiera de las muestras por nuestro ensayo de Northern blot (Fig. III.3), pero pudieron analizarse por RT-qPCR, como explicaré un poco más adelante.

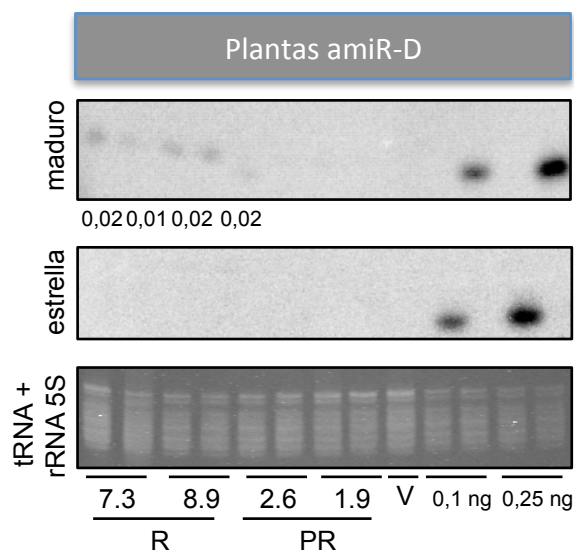


Figura III.3. Acumulación de amiR-D en diferentes líneas de *N. benthamiana* transgénicas, analizada mediante Northern blot. Se incluyeron en el análisis dos réplicas biológicas, cada una compuesta por hojas jóvenes de dos plantas no inoculadas de la generación F2 descendientes de las indicadas (7  $\mu$ g de una preparación de RNAs de pequeño tamaño). R y PR indican líneas resistentes y parcialmente resistentes, según se define en la Tabla III.1. Como control negativo se cargaron 7  $\mu$ g de una preparación de RNAs de pequeño tamaño de plantas transformadas con vector vacío (V). La membrana fue incubada con oligodeoxinucleótidos complementarios de amiR-D maduro (#2019) y de su banda estrella (#1935) marcados con  $^{32}$ P. Como patrones de calibración se cargaron cantidades conocidas de oligodeoxinucleótidos con la secuencia de amiR-D maduro (#1935) y de su banda estrella (#2019) mezclados con 7  $\mu$ g de una preparación de RNAs de pequeño tamaño de *N. benthamiana* silvestre. La densitometría de las señales y la estimación de cantidad de amiRNA acumulado en cada muestra se realizó con el programa Quantity One. Los valores resultantes (en ng) se muestran debajo de cada carril. En la parte inferior, el gel teñido con BrEt muestra los tRNAs y el rRNA 5S como control de carga.

El análisis por Northern blot de descendencias F2 de varias líneas amiR-C+D apoyaba también la idea de que los niveles bajos de resistencia se debían a bajos niveles de expresión. Este es el caso de la descendencia de la planta C+D 7.7, con niveles de acumulación indetectables, por este ensayo, de bandas madura y estrella tanto de amiR-C como de amiR-D (Fig. III.4). Por el contrario, era detectable la acumulación de banda madura y estrella de amiR-C y de banda madura de amiR-D en las descendencias altamente resistentes de las plantas C+D 9.1 y 10.6 (Fig. III.4). Al igual que en el caso de las líneas D, el ensayo de Northern blot no detectó señales de acumulación de la

banda estrella de amiR-D en ninguna de las plantas C+D (Fig. III.4). Es interesante el resultado observado para la línea C+D 6. A pesar de que no se ha observado infección viral en ninguna de las plantas de esta línea que han sido inoculadas (Tablas III.1 y III.2), los niveles de acumulación de amiR-C y amiR-D en la descendencia de la planta C+D 6.8 eran demasiado bajos para poder ser detectados por nuestro ensayo de Northern blot (Fig. III.4). Este resultado sugiere que son suficientes niveles muy bajos de expresión del transgén para conseguir una resistencia mediada por amiRNAs altamente eficiente.

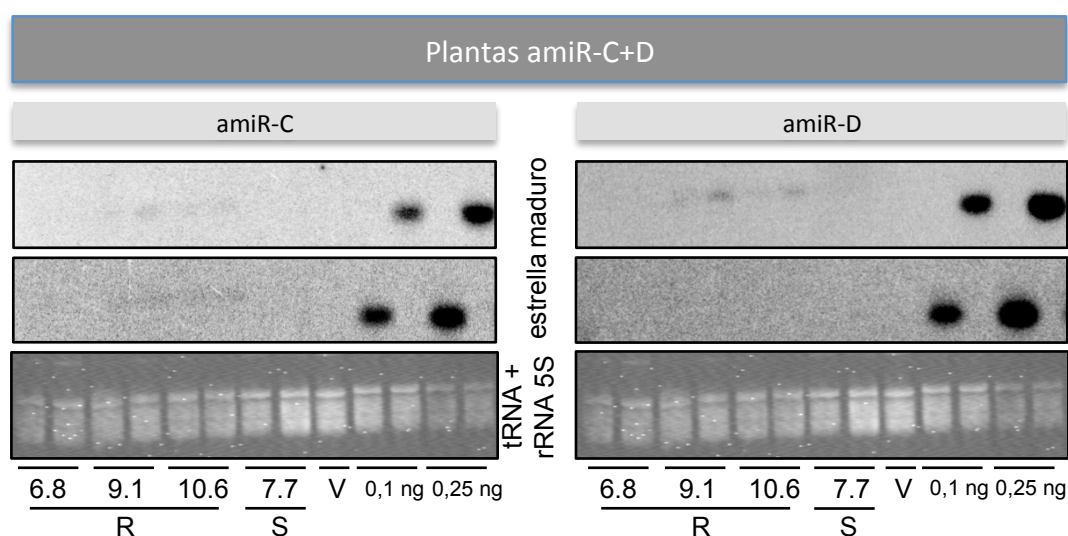


Figura III.4. Acumulación de los amiR-C y amiR-D en diferentes líneas de *N. benthamiana* transformadas con la construcción amiR-C+D analizada mediante Northern blot. Se incluyeron en el análisis dos réplicas biológicas, cada una compuesta por hojas jóvenes de dos plantas no inoculadas de la generación F2 descendientes de las indicadas (7  $\mu$ g de una preparación de RNAs de pequeño tamaño). R y S indican líneas resistentes y susceptibles, según se define en la Tabla III.1. Como control negativo se cargaron 7  $\mu$ g de una preparación de RNAs de pequeño tamaño de plantas transformadas con vector vacío (V). La membrana fue incubada con oligodeoxinucleótidos complementarios de amiR-C y amiR-D maduros (#1580 y #2019, respectivamente) y de sus bandas estrella (#1579 y #1935, respectivamente) marcados con  $^{32}$ P. Como patrones de calibración se cargaron cantidades conocidas de oligodeoxinucleótidos con la secuencia de amiR-C y amiR-D maduros (#1579 y 1935, respectivamente) y de sus bandas estrella (#1580 y 2019, respectivamente) mezclados con 7  $\mu$ g de una preparación de RNAs de pequeño tamaño de *N. benthamiana* silvestre. La densitometría de las señales y la estimación de cantidad de amiRNA acumulado en cada muestra se realizó con el programa Quantity One. Los valores resultantes (en ng) se muestran debajo de cada carril. En la parte inferior, el gel teñido con BrEt muestra los tRNAs y rRNA 5S como control de carga.

En contraste con los resultados de expresión de amiR-C y amiR-D, el análisis por Northern blot de la expresión de amiR-H mostraba niveles de acumulación de banda madura y estrella comparables. En ambos casos los valores eran mayores en la descendencia de la planta H 6.6 que en la de la planta H 8.7. De nuevo este resultado

estaría de acuerdo con el factor limitante de los niveles de expresión en la eficacia de la resistencia, ya que, aunque todas las plantas descendientes de las plantas H 6.6 y H 8.7 resultaron infectadas, las de la planta H 6.6 lo hacían con retraso con respecto a las de la planta H 8.7 (Tabla III.2).

En este experimento se incluyeron también plantas infectadas, con objeto de comparar los niveles de acumulación del amiRNA expresado por el transgén con los de los siRNAs producto de la infección viral de la misma secuencia. El nivel de acumulación de siRNA virales de polaridad positiva (la misma que la de la banda estrella de amiR-H) en las plantas control era considerablemente mayor al de amiR-H estrella acumulada en las plantas transgénicas descendientes de H 6.6 o H 8.7 sanas; curiosamente el nivel de acumulación de RNAs pequeños con secuencia H positiva (suma de amiR-H estrella expresado del transgén más siRNAs virales de polaridad positiva) de las plantas descendientes de H 8.7 infectadas parecía superior a la suma de lo que se acumula en las plantas control infectadas y en las plantas transgénicas sanas (Fig. III.5). El nivel de acumulación de siRNAs de polaridad negativa en las plantas control infectadas también parecía ser algo superior al de amiR-H maduro de las plantas transgénicas sanas (Fig. III.5). Pero resulta también curioso que, en contraposición con lo que se ve para los RNAs de pequeño tamaño de polaridad positiva, la acumulación total de RNAs de pequeño tamaño de polaridad negativa de las plantas descendientes de H 8.7 infectadas era claramente inferior a la suma de la acumulación de amiRNA maduro en las plantas H 8.7 sanas y de siRNAs de polaridad negativa en las plantas control infectadas (Fig. III.5). No hemos proseguido estudiando las posibles causas de este chocante resultado.

Aunque las bajas señales de hibridación detectadas mediante Northern blot y las deficiencias de los estándares empleados (oligodeoxinucleótidos, en lugar de oligoribonucleótidos, y cantidades demasiado elevadas) no permite cuantificaciones muy rigurosas, no parece que la acumulación de amiR-H en plantas que son susceptibles al PPV sea menor a la de amiR-C o amiR-D en plantas que son muy resistentes a la infección. Parece claro, por tanto, que factores distintos de los niveles de expresión del transgén son la causa del diferente fenotipo observado en las plantas que expresan los distintos amiRNAs.

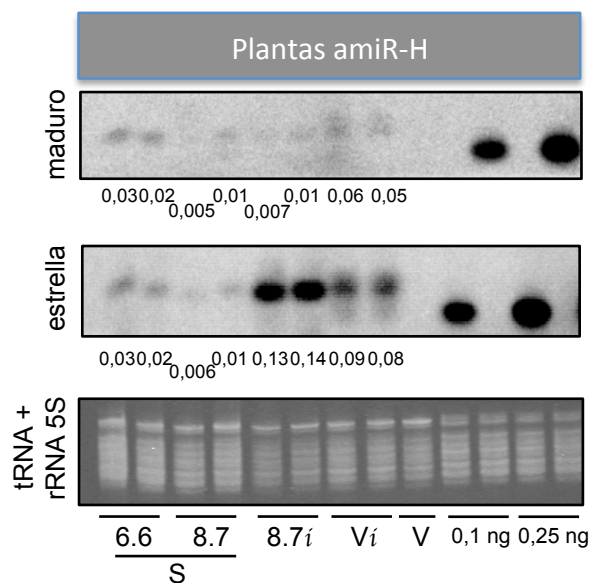


Figura III.5. Acumulación de amiR-H en diferentes líneas de *N. benthamiana* transgénicas analizada mediante Northern blot. Se incluyeron en el análisis dos réplicas biológicas, cada una compuesta por hojas jóvenes de dos plantas de la generación F2 descendientes de las indicadas, no inoculadas (6.6 y 8.7) o infectadas por el PPV (8.7i). En todos los casos se cargaron en el gel 7  $\mu$ g de una preparación de RNAs de pequeño tamaño. S indica líneas susceptibles, según se define en la Tabla III.1. Como control se cargaron 7  $\mu$ g de una preparación de RNAs de pequeño tamaño de plantas transformadas con vector vacío, no inoculadas (V) o infectadas con el PPV (Vi). La membrana fue incubada con oligodeoxinucleótidos complementarios de amiR-H maduro (#2366) y de su banda estrella (#2399) marcados con  $^{32}$ P. Como patrones de calibración se cargaron cantidades conocidas de oligodeoxinucleótidos con la secuencia del amiR-H maduro (#2399) y de su banda estrella (#2366) mezclados con 7  $\mu$ g de una preparación de RNAs de pequeño tamaño de *N. benthamiana* silvestre. La densitometría de las señales y la estimación de cantidad de amiRNA acumulado en cada muestra se realizó con el programa Quantity One. Los valores resultantes (en ng) se muestran debajo de cada carril. En la parte inferior, el gel teñido con BrEt muestra los tRNAs y el rRNA 5S como control de carga.

Con objeto de verificar con mayor rigor las diferencias más relevantes observadas en los ensayos de Northern blot, se realizaron cuantificaciones adicionales de la acumulación de amiR-D en diversas líneas transgénicas por RT-qPCR. En estos experimentos se emplearon dos réplicas biológicas, cada una mezcla de cuatro plantas de la generación F2, por línea a ensayar. Se usaron iniciadores específicos para la amplificación de las bandas madura y estrella esperadas y se empleó como referencia el RNA 5.8 S. A diferencia del ensayo de Northern blot, la RT-qPCR permitió comprobar una acumulación significativa de banda estrella de amiR-D. Aunque, en ausencia de curvas de calibración apropiada, no se pueden hacer comparaciones estrictamente cuantitativas entre amplificaciones realizados con parejas de iniciadores distintos, los resultados confirman claramente que los niveles de acumulación de la banda estrella son muy inferiores a los de la banda madura (Fig. III.6).

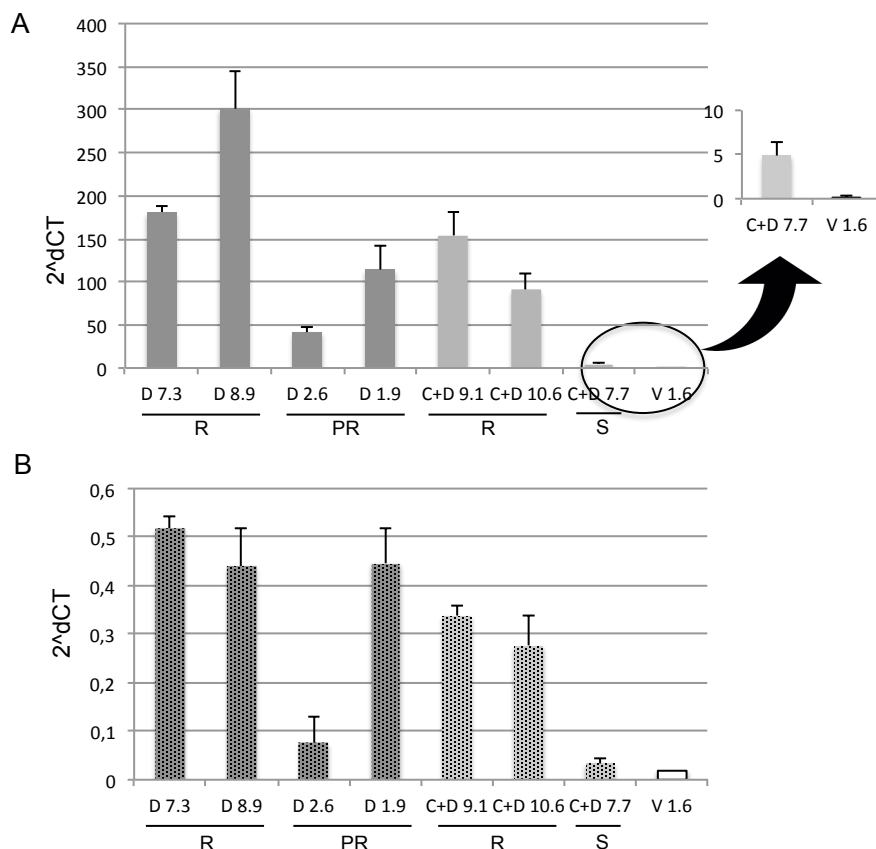


Figura III.6. Acumulación de amiR-D en diferentes líneas de *N. benthamiana* transgénicas, estimada por RT-qPCR. Como iniciadores para la amplificación del amiRNA maduro y de su banda estrella se usaron las parejas de oligodeoxinucleótidos #2686; #2687 y #2688; #2689, respectivamente. Se realizaron tres réplicas técnicas de dos muestras independientes de RNA de pequeño tamaño, cada una obtenida a partir de hojas jóvenes de dos plantas de la generación F2 descendiente de las indicadas. Como control negativo, se empleó RNA de pequeño tamaño de plantas transformadas con vector vacío (descendientes de la planta V 1.6). Las barras representan la media de los valores de diferencia de ciclo límite con referencia al gen 5.8 S ribosomal (iniciadores #2730; #2731) expresados como potencia de 2. La barra de error indica el valor más alto de las dos muestras. El gráfico amplificado permite visualizar mejor muestras la diferencia entre la muestra C+D 7.7 y el control negativo. R, PR y S indican líneas resistentes, parcialmente resistentes y susceptibles según se define en la tabla III.1.

También se confirma la mayor acumulación de banda madura de amiR-D en las líneas resistentes que en las parcialmente resistentes y, más marcadamente, que en la línea susceptible analizada (Fig. III.6). Esto se observa igualmente para la banda estrella, con la excepción de las plantas descendientes de la planta D 1.9, aunque hay que tener en cuenta que en esa descendencia solo se observó infección en una de sus plantas, muy retrasada y limitada a la hoja inoculada (Tabla III.2). Este experimento nos permitió también comparar la acumulación de amiR-D cuando se expresa de manera individual y cuando lo hace como parte de una construcción doble junto con amiR-C. Aunque lo limitado de las muestras analizadas impide un tratamiento estadístico

riguroso, los resultados parecen indicar que la coexpresión con amiR-C provoca como consecuencia una cierta disminución de la acumulación final de amiR-D (Fig. III.6).

### **III.2 Diversas mutaciones en la diana del amiRNA permiten al PPV escapar de su acción antiviral**

Desde que se obtuvieron los primeros resultados acerca de la posibilidad de generar resistencia antiviral expresando amiRNAs se planteó la posibilidad de que la resistencia no fuera muy duradera como consecuencia de la relativa facilidad con la que el virus podría mutar para escaparse de ella (García y Simón-Mateo, 2006; Niu *et al.*, 2006). Estas predicciones se confirmaron más adelante (Lafforgue *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2012). Los resultados descritos en el capítulo III.1 de esta tesis muestran también cómo, aunque en alguna ocasión el PPV silvestre puede infectar plantas que expresan un amiRNA dirigido contra su genoma, en la mayoría de los casos en que el PPV ha sido capaz de vencer la resistencia mediada por amiRNAs, se han seleccionado variantes virales con alguna mutación en la diana del amiRNA. El objetivo de este segundo capítulo de la tesis ha sido caracterizar las mutaciones que se acumulan en el PPV bajo la presión selectiva de los diferentes amiRNAs, y tratar de deducir a partir de esos datos información acerca de cómo los amiRNAs afectan al virus y de qué manera el virus puede escaparse de esa acción.

#### **III.2.1 Aunque la infección de plantas parcialmente resistentes como consecuencia de la expresión de amiRNAs crea una amplia diversidad de especies del PPV, algunas mutaciones, diferentes para cada amiRNA, parecen favorecerse**

Inicialmente, el análisis genético de las poblaciones del PPV capaces de escapar de la acción antiviral de diferentes amiRNAs se realizó amplificando por IC-RT-PCR un fragmento del genoma viral que incluye la diana del amiRNA, a partir del tejido recolectado a diferentes tiempos después de la inoculación, y secuenciando el fragmento de cDNA amplificado.

Tomando en su conjunto las mutaciones observadas en la progenie viral de las diferentes plantas transgénicas que expresan algún amiRNA específico del PPV, lo primero que llama la atención es la amplia variedad de mutaciones detectadas. Mientras que no se observaron mutaciones fuera de las dianas predichas de los amiRNAs, en ellas

se encontraron nuevas variantes en 15 de sus 21 posiciones (Fig. III.7 y Tabla III.3). Sin embargo, las mutaciones no estaban distribuidas de manera homogénea.

Eran más abundantes en la región central (16 entre las posiciones 9 y 12), donde es esperable que afecten al corte de RISC, y en la región 3' terminal, la más relevante para el reconocimiento por la hebra madura de los amiRNAs, (22 mutaciones entre las posiciones 13 y 21). Sin embargo, también se detectaron 10 mutaciones entre las posiciones 1 y 8, cuya mayor relevancia sería esperable en el reconocimiento de la hebra complementaria del RNA viral por la banda estrella de los amiRNAs.

Un dato interesante a resaltar es que los sitios de mutaciones preferidos diferían según el amiRNA expresado. En ninguna de las posiciones se observaron mutaciones en las dianas de los tres amiRNAs, y solo en cuatro posiciones aparecían mutaciones en dos dianas (posiciones 7 y 10 de las dianas C y D, y posiciones 9 y 14 de las dianas D y H). Los sitios preferidos para la selección de mutaciones de las dianas C y D eran las centrales (un total de 12 mutaciones en las posiciones 9 y 10), por el contrario, un sitio de la región 3', la posición 14, era la más mutada de la diana H (la progenie viral de las 5 plantas amiR-H analizadas mostraba una mutación en esa posición).

Tabla III.3. Frecuencia de mutaciones en las diferentes posiciones de las dianas de los amiRNAs.

|                  |  | Secuencia RNA genómico del PPV – diana amiRNAs (5' - 3') |   |   |                |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|------------------|--|--|---|---|----------------|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|                  |  | A  | A | A | A              | G | A | U | G | G | A  | A  | A  | A  | G  | C  | C  | C  | C  | G  | U  | A  |
| C                |  | A  | A | A | A              | G | A | U | G | G | A  | A  | A  | A  | G  | C  | C  | C  | C  | G  | U  | A  |
| D                |  | A  | U | G | A              | A | A | A | A | G | C  | A  | U  | A  | C  | A  | U  | G  | C  | C  | A  | A  |
| H                |  | C  | C | U | G              | G | G | U | G | A | G  | A  | G  | U  | C  | U  | A  | A  | U  | C  | A  | U  |
|                  |  | Posición en la diana                                     |   |   |                |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|                  |  | 1  | 2 | 3 | 4              | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 |
| C                |  | 6 <sup>a</sup>   |   |   | 1 <sup>b</sup> |   |   | 1 |   |   | 3  | 1  | 1  | 1  |    |    | 3  |    |    | 3  |    |    |
| C+D <sup>c</sup> |  | 5  |   |   |                |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    | 1  | 2  |    |    | 2  |    |    |
| D                |  | 7  |   | 2 |                | 3 |   | 1 |   | 4 | 3  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | 3  |
| C+D <sup>c</sup> |  | 5  |   |   |                |   |   |   | 2 | 2 |    |    |    |    | 1  |    |    |    |    |    |    |    |
| H                |  | 5  |   |   |                |   |   |   |   | 2 |    |    |    |    | 1  | 5  |    |    |    |    |    |    |

<sup>a</sup> Número total de mutaciones identificadas. <sup>b</sup> número de mutaciones en esa posición de la diana del amiRNA; el grado de intensidad de gris refleja la abundancia de mutaciones en esa posición. <sup>c</sup> mutaciones en la diana de amiR-C o de amiR-D en la progenie viral de plantas transformadas con la construcción amiR-C+D.



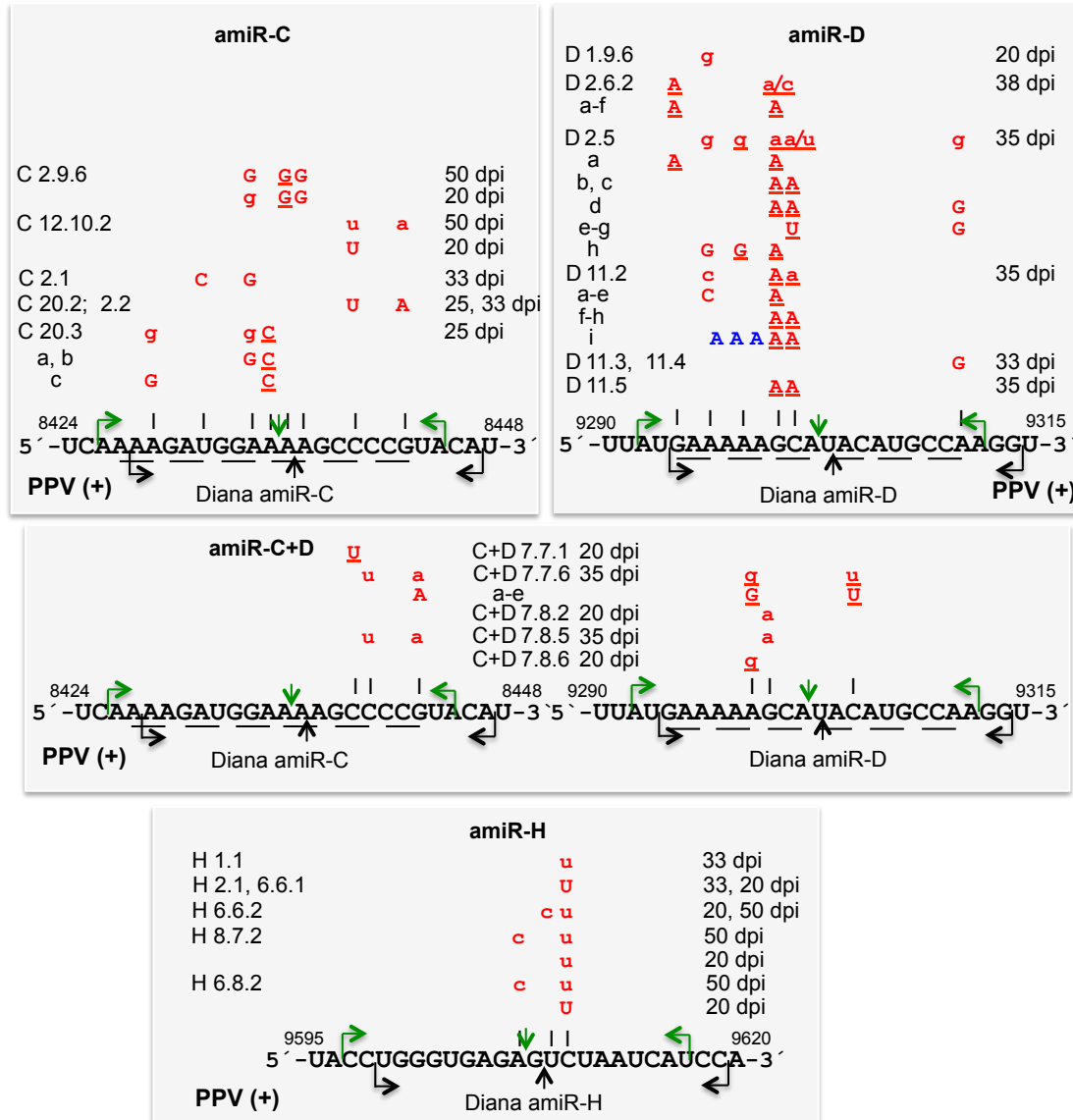


Figura III.7. Mutaciones detectadas en la progenie viral de plantas de *N. benthamiana* transgénicas que expresan amiRNAs, infectadas con el PPV. En la línea con el nombre de la planta transgénica se muestran los cambios detectados en la secuencia consenso de los productos de amplificación por IC-RT-PCR; una letra minúscula indica coexistencia de ese nucleótido con el de la secuencia silvestre; dos letras minúsculas indican coexistencia de dos nucleótidos distintos del de la secuencia silvestre; nucleótidos subrayados indican mutaciones que causan cambios de aminoácido. En los casos en que los productos de RT-PCR se clonaron y se secuenciaron clones individuales, los cambios detectados en cada uno de estos clones se muestran en líneas inferiores marcadas con una letra. A la derecha de cada línea se indica el tiempo al que se recogieron las muestras analizadas. En la parte inferior de cada panel se muestra la secuencia del RNA genómico, numerado según Lain et al. (1989) donde se localiza la diana del correspondiente amiRNA; también se resalta el marco de lectura de la poliproteína viral. Las flechas en verde flanquean la diana del amiRNA maduro con su respectivo sitio de corte. Las flechas en negro flanquean la secuencia complementaria a la de la diana del amiRNA estrella y su respectivo sitio de corte en la hebra negativa del RNA viral.

Al analizar el efecto de los cambios de nucleótido introducidos en la progenie viral de las plantas productoras de amiRNAs sobre la secuencia proteica, se comprobó que la mayoría de los cambios en la diana de amiR-C eran silenciosos (16 de 19), sugiriendo que, junto a la presión selectiva causada por el amiRNA, existía otra conservadora tendente a mantener la secuencia de la proteína NIb viral. La secuencia de CP codificada por la diana de amiR-D parecía tener menores restricciones, porque las mutaciones con cambio de sentido eran mucho más abundantes en esta diana (13 de 21). El análisis de la naturaleza de las mutaciones mostraba el esperado predominio de transiciones (42) frente a transversiones (7) en todas las dianas.

La idea subyacente al diseño de la construcción C+D era que al virus le resultaría más difícil escaparse de su acción porque necesitaría introducir mutaciones en las dos dianas, C y D. Los resultados muestran que, en el caso de una línea como la C+D 7 con una resistencia débil que permite la infección del virus silvestre (sección III.1.1) debido a sus bajos niveles de expresión (Figura III.6), se seleccionan mutaciones en cualquiera de las dos dianas, o en ambas. Estas mutaciones podían recaer en las mismas posiciones donde se seleccionaban mutaciones en las plantas amiR-C y amiR-D, pero también en posiciones donde no se habían seleccionado cambios en esas plantas.

Con objeto de evaluar la evolución del virus a lo largo de la infección bajo la presión selectiva causada por la expresión de amiRNAs, se analizó en unas pocas plantas la secuencia de la población viral a distintos tiempos post-inoculación (dpi). En el caso de la planta C 2.9.6, la mutación A8435G, que no se había impuesto en la población a los 20 dpi, lo hacía a los 50 dpi. Por el contrario, las mutaciones C8441U de la planta C 12.10.2 y C9610U de la planta H 6.8.2, que parecían ser muy mayoritarias a los 20 dpi, disminuían su predominio a 50 dpi, al tiempo que se hacía perceptible una segunda mutación, G8444A en C 12.10.2 y A9607C en H 6.8.2, lo que sugiere que estas segundas mutaciones son más efectivas que las primeras en impedir el efecto antiviral del amiRNA. De manera similar, en la planta H 8.7.2 la mutación C9610U aparecía, sin llegar a imponerse, a 20 dpi y se mantenía en las mismas condiciones a 50 dpi, pero a este tiempo tardío ya se detectaba, de nuevo, la segunda mutación A9607C, más difícil de producirse por tratarse de una transversión, pero presumiblemente más eficiente.

### III.2.2 Varias especies del PPV, por lo general con más de una mutación, se seleccionan en las plantas que expresan amiRNAs infectadas

La secuenciación directa de los fragmentos de cDNA del PPV amplificados por IC-RT-PCR a partir de tejido de plantas que expresan amiRNAs mostraba en muchos casos cromatogramas con complejos patrones de dobles picos, lo que puede indicar tanto que la planta está coinfectada con el virus silvestre y una especie viral con múltiples mutaciones como que lo está con múltiples especies virales con diferentes mutaciones. Para diferenciar entre estas posibilidades, los productos de la amplificación por IC-RT-PCR se clonaron en un plásmido bacteriano y se secuenciaron varios clones de cada planta infectada. Para este análisis se eligieron las plantas C 20.3, D 2.6.2, D 11.2, D 2.5 y C+D 7.7.6, la secuencia de cuyas poblaciones virales mostraba ambigüedades en 2, 1, 2, 5 y 3 posiciones, respectivamente, de su diana de amiRNA. En ningún caso se encontraron clones con la secuencia del virus silvestre. En dos plantas solo se encontraron clones correspondientes a una especie viral, lo que sugiere que en estos casos esa especie era muy mayoritaria (aunque no fuera la única) en la población viral. Pero en otras plantas, se verificó la coexistencia de varias variantes con diferentes mutaciones. El caso más extremo es el de la planta D 2.5, donde se identificaron 5 variantes distintas. Es interesante resaltar que en la planta D 11.2 se identificó una especie viral que, además de dos mutaciones puntuales ya detectadas en la secuencia directa del producto de RT-PCR, mostraba una inserción de tres adeninas (manteniendo, por tanto, la fase de la ORF viral). Todos estos datos ilustran la explosión de variabilidad genética que puede surgir por efecto de la presión selectiva ejercida por los amiRNAs.

El análisis de los clones individuales muestra que la mayoría de las especies virales que se escapan de la acción antiviral de los amiRNAs capaces de proporcionar una resistencia fuerte (amiR-C y amiR-D) tenían dos, y, en algunos casos hasta tres, mutaciones, lo que sugiere que una única mutación no es suficiente para impedir de manera eficiente la acción del amiRNA (Fig. III.7). La secuenciación directa de productos de RT-PCR había mostrado progenies virales con una única mutación. Sin embargo, esa mutación se presentaba junto con otras mutaciones en otras plantas: C8441U, A9296G y A9311G son únicas en C 12.10.2, D 1.9.6, y D 11.3 y D 11.4, respectivamente, pero aparecían asociadas a mutaciones adicionales en C 2.2, C 20.2 y D 2.5.

### II.2.3 La resistencia frente al PPV causada por amiR-D es de amplio espectro

Los resultados mostrados en las secciones anteriores indican que el PPV puede evolucionar para escaparse de la resistencia originada por la expresión de amiRNAs en plantas transgénicas. Las dianas de los amiRNAs empleados en este trabajo están conservadas en todos los aislados conocidos de la raza PPV-D, a la que pertenece PPV-R. Pero como la variabilidad natural del PPV es muy amplia, presentan algunas diferencias con las secuencias homólogas de otras razas del PPV (Fig. III.8 A), y estas diferencias podrían dificultar la acción de los amiRNAs y, por tanto, facilitar la infección por los virus de estas razas.

Hay tres razas principales de PPV, D, M y Rec, pero PPV-Rec tiene la misma secuencia que PPV-M en las dianas de los amiRNAs contemplados aquí. Así pues, se seleccionaron plantas de la generación F1 de tres líneas que expresaban amiR-C (C 12), amiR-D (D 7) o amiR-C+D (C+D 6) completamente resistentes a PPV-R, y se inocularon manualmente con un aislado de raza M (PPV-PSes) y uno de la raza C (PPV-SwCM), una raza minoritaria muy divergente respecto al resto de las razas del PPV.

Como era de esperar, tanto PPV-PSes y PPV-SwCM como PPV-R infectaron todas las plantas transformadas con el vector vacío (V 1) que se inocularon como control. Las plantas de la línea C 12 solo fueron resistentes a PPV-R. PPV-PSes y PPV-SwCM infectaron a las plantas de esta línea de manera similar a las de la línea control V 1, tanto en cuanto a sintomatología (síntomas prácticamente indistinguibles de PPV-PSes y necrosis sistémica de PPV-SwCM) como en acumulación viral (Fig. III.8 B-D).

El análisis de la descendencia de PPV-PSes y PPV-SwCM en las plantas C 12 no mostró mutaciones en la región de la diana del amiRNA, y tampoco se observaron después de un pase en plantas de la misma línea. Todos estos datos sugieren que la expresión de amiR-C no ofrece una presión selectiva significativa sobre PPV-PSes y PPV-SwCM. Dado que la diana de amiR-C de PPV-R difiere de la de PPV-PSes en nucleótidos de su región 5', la que se considera importante para que la hebra negativa del RNA viral se reconozca por la banda estrella del amiRNA, y difiere de la de PPV-SwCM en nucleótidos de su región 3', la que se espera que sea relevante para el reconocimiento del RNA genómico por la banda madura del amiRNA (Fig. III.8 A), la susceptibilidad de las plantas C 12 a la infección tanto por PPV-PSes como por PPV-

SwCM podría sugerir que la acción sobre ambas hebras del RNA viral contribuye a la resistencia al PPV de las plantas que expresan amiR-C.

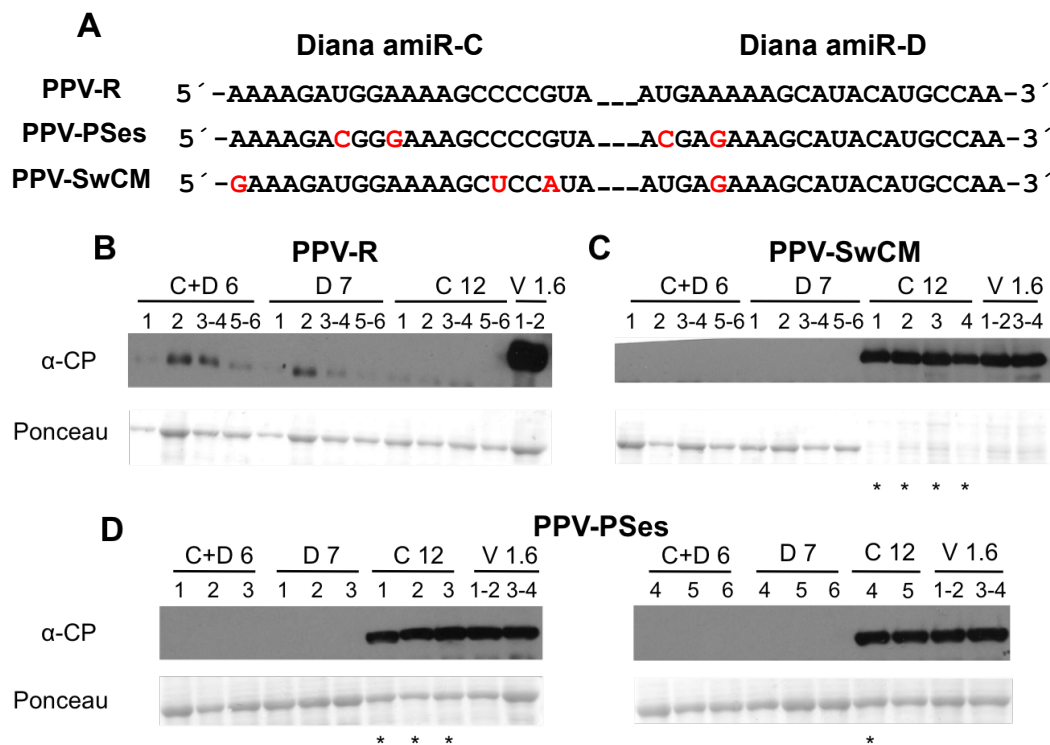


Figura III.8. Susceptibilidad de plantas de *N. benthamiana* transgénicas que expresan amiRNAs a la infección por aislados de tres diferentes razas del PPV. **A)** Secuencia genómica en las dianas de amiR-C y amiR-D de los aislados del PPV analizados, con las diferencias respecto a la secuencia de PPV-R marcados en rojo. **B-D)** Análisis por ensayos de Western blot de la acumulación de CP viral en hojas superiores de plantas, o grupos de plantas, de las líneas transgénicas amiR-C+D, amiR-D y amiR-C indicadas, inoculadas con PPV-R (**B**), PPV-SwCM (**C**) o PPV-PSes (**D**). Como control se analizaron también plantas de una línea transformada con vector vacío, inoculadas con los mismos aislados (V 1.6). Las muestras se recogieron a los 20 dpi (**B** y **C**) o a los 30 dpi (**D**). Las membranas teñidas con rojo Ponceau muestran la subunidad mayor de la RuBisCO y se emplearon como control de carga. Las plantas que fueron posteriormente analizadas por IC-RT-PCR y secuenciación se indican con un asterisco.

En contraste con las plantas que expresan solo amiR-C, las que expresan amiR-D, solo (línea D 7) o en combinación con amiR-C (línea C+D 6), se mostraron resistentes a las tres razas del PPV (Fig. III.8 B-D). Tanto PPV-PSes como PPV-SwCM se diferencian de PPV-R por la sustitución A9296G, localizada en la región 5' de la diana de amiR-D, (Fig. III.8 A) por lo que no es esperable que afecte al reconocimiento del RNA genómico por el amiRNA maduro, pero sí debería ser relevante para la interacción de la banda de amiRNA estrella con la hebra negativa de RNA viral. Hay que destacar que el cambio U9293C de PPV-PSes (Fig. III.8 A) no debería tener efecto

ni sobre la acción del amiRNA maduro, porque produce un desajuste con un nucleótido de su región 3', ni sobre la del amiRNA estrella, porque el nucleótido 9293 no está incluido en su diana de la hebra negativa, que está desplazada dos nucleótidos respecto a la del RNA genómico debido a la cola 3' protuberante del amiRNA dúplex. Así pues, la resistencia de las plantas transgénicas amiR-D 7 a PPV-PSes y PPV-SwCM sugiere que la actividad del amiRNA maduro sobre la hebra positiva del RNA viral es suficiente para conferir resistencia o que el simple desapareamiento de la posición 9296 no impide por completo el reconocimiento de la hebra negativa del RNA viral por el amiRNA estrella. Las secuencias de los mutantes de escape de la resistencia descritos en las secciones anteriores podrían apoyar esta hipótesis. Por ejemplo, la sustitución A9296G, que no interfiere con la resistencia frente PPV-PSes y PPV-SwCM de la línea D 7, debe tener algún efecto protector ya que se selecciona en la progenie viral de plantas que expresan amiR-D parcialmente resistentes, sola (planta D 1.9.6) o junto con otras mutaciones (planta D 2.5) (Fig. III.7).

Una observación curiosa es que las secuencias de la diana de amiR-C de los aislados PPV-PSes y PPV-SwCM coinciden con la secuencia de dos especies virales seleccionadas en plantas que expresan amiR-C infectadas con PPV-R: una secuencia igual a la de PPV-PSes se observa en especies virales seleccionadas en las plantas C 2.2 y C 20.2, y la secuencia de la diana de amiR-C de mutantes seleccionados en las plantas C 12.10.2, C+D 7.7.6 y C+D 7.8.5 muestra dos de los tres nucleótidos específicos de la secuencia de PPV-SwCM (Fig. III.9). Así pues, las secuencias de PPV-PSes y PPV-SwCM a las que se ha llegado por evolución natural, obviamente sin la presión selectiva de amiR-C, se han seleccionado también por la evolución acelerada del PPV en las plantas transgénicas que expresan el amiRNA. Esto sugiere que las vías por las cuales los virus evolucionan, sea por deriva genética o bajo diferentes presiones selectivas, podrían ser limitadas.

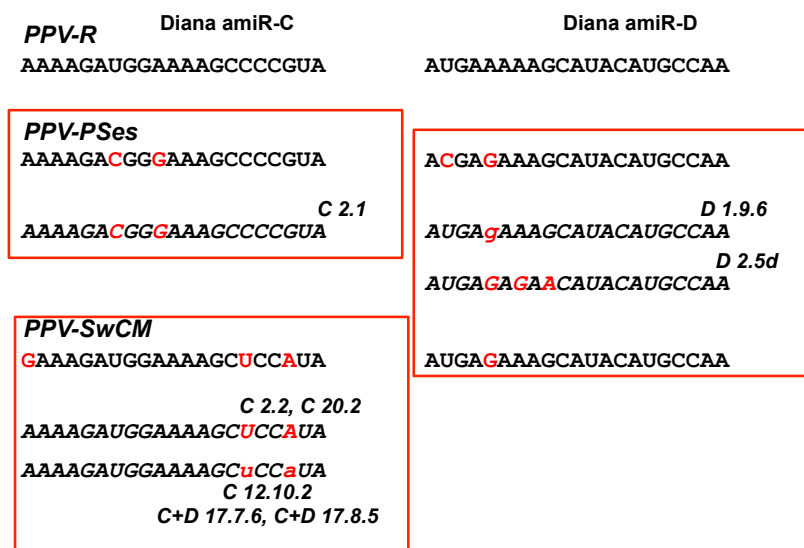


Figura III.9. Similitud de secuencia entre mutantes detectados en la progenie viral de plantas de *N. benthamiana* transgénicas que expresan amiR-C y/o amiR-D infectadas con PPV-R (ver Fig. III.7) y la de los aislados naturales PPV-PSes y PPV-SwCM.

### III.3 La banda de RNA anti-genómica (negativa) del PPV puede ser diana efectiva de amiRNAs

Como se ha expuesto en el capítulo III.1, la expresión de transgenes diseñados para producir amiRNAs cuyas bandas maduras tenían como diana secuencias del RNA genómico del PPV proporcionó una protección significativa contra el virus. A pesar de que en los casos de amiR-C y amiR-D la cuantificación de los amiRNAs confirmó que se acumulaban principalmente hebras maduras (Fig. III.2 y III.3), el análisis de las mutaciones que se seleccionaban en los virus que se escapaban de la resistencia (capítulo III.2), parecía sugerir que estos amiRNAs actuaban tanto sobre el RNA genómico como sobre la banda negativa del RNA viral.

Estudios realizados con *Hepatitis C virus* (HCV) y *Coxsackievirus B3* (CB3), virus animales con genoma RNA de polaridad positiva, como PPV, sugerían que el RNA viral anti-genómico no sufría la acción de RNAs interferentes pequeños exógenos (Lisowski *et al.*, 2013; Schubert *et al.*, 2007). Por otro lado, resultados previos de nuestro laboratorio mostraban que un mutante del PPV cuyo genoma incluía la secuencia reversa de la diana de miR171, sufría presión selectiva por parte de este miRNA natural, de la que el virus trataba de escapar mediante mutaciones en la diana del miRNA, principalmente en la secuencia complementaria de la región 5'-terminal del miRNA (Simón-Mateo y García, 2006). Este resultado sugiere que, en contraste con lo propuesto para HCV y CB3, la banda anti-genómica del PPV es accesible a la acción

del silenciamiento de RNA. En este capítulo de la tesis, pretendo proporcionar información que verifique la accesibilidad de la hebra negativa del RNA del PPV a la maquinaria de silenciamiento y valorar el potencial antiviral de dirigir un amiRNA preferentemente sobre esta hebra del RNA viral. Para ello, hemos transformado plantas de *N. benthamiana* con el transgén Di, que codifica un pre-miRNA construido sobre el esqueleto de pre-miR-159 que incluye las mismas secuencias del PPV que amiR-D, pero insertadas de manera invertida, de manera que ahora la que se espera que sea la banda madura sea complementaria del RNA genómico y la banda estrella lo sea de la hebra negativa del RNA viral (Fig. III.10 A, y B). En las siguientes secciones describo el comportamiento de estas plantas frente a la infección del PPV.

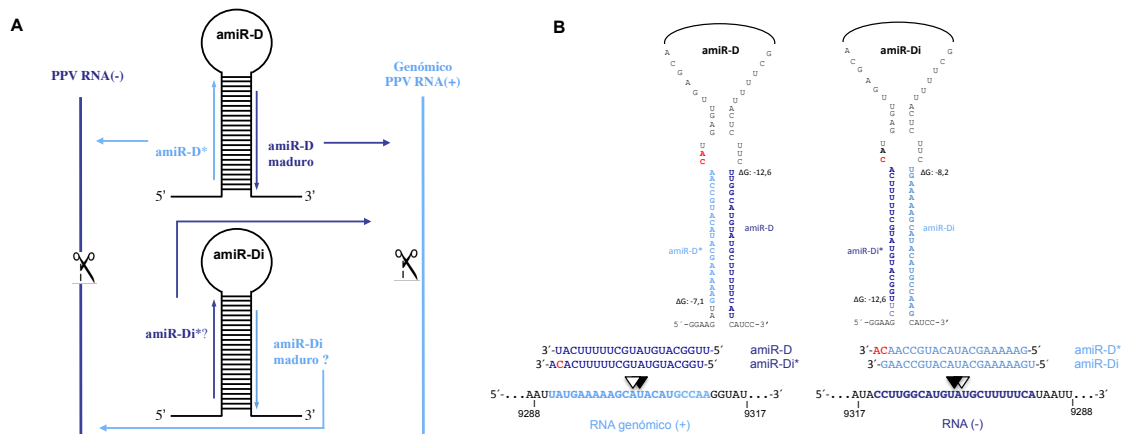


Figura III.10. **A)** Inversión del dúplex de amiR-D para la construcción de amiR-Di. **A)** Posibles efectos de las dos bandas de amiR-D y amiR-Di sobre las dos hebras del RNA viral. **B)** Representación esquemática de los precursores de amiR-D y amiR-Di construidos utilizando como molde el pre-miR159 de *A. thaliana*. La energía libre del dúplex en los extremos 5' de cada banda (kcal/mol) está calculada según Khvorova et al. (2003). En la parte inferior se muestran las dianas de los amiRNAs predichas en el RNA genómico y en la hebra de RNA negativa del virus, numeradas según Laín et al. (1989). Los sitios de corte de corte por el complejo RISC cargado con bandas de amiR-D y amiR-Di previstos se marcan con cabezas de flecha llenas y vacías, respectivamente. Se resaltan en azul oscuro las secuencias de RNA viral o de amiRNA con la polaridad del RNA genómico y en azul claro las de la polaridad opuesta; los nucleótidos de los amiRNAs que no se aparean con el RNA viral se resaltan en rojo.

### III.3.1 Las plantas de *N. benthamiana* que expresan amiR-Di son capaces de generar cierta resistencia frente a la infección por PPV

Para valorar la resistencia antiviral conferida por la nueva construcción amiR-Di, se inocularon por agroinfiltración con pBin-PPV-nk-GFP cuatro plantas de la generación F1 de las líneas amiR-Di 1, 2, 3, 4 y 6. Como control de resistencia se inocularon cuatro plantas descendientes de las plantas amiR-D 7.3 y amiR-D 2.6 y cinco



de la planta amiR-D 11.4, que pertenecen a tres líneas amiR-D que habían mostrado en experimentos anteriores diferentes grados de protección frente al PPV. Plantas transformadas con el vector vacío se utilizaron como control positivo de la infección. Para evaluar el avance de la infección viral se monitorizó la expresión de GFP en las hojas inoculadas y en las superiores con un microscopio de epifluorescencia.

A los 6 dpi se detectó proliferación de GFP en las hojas inoculadas de todas las plantas de las líneas transformadas con la construcción amiR-Di, así como en tres de las cinco plantas inoculadas con la descendencia de la planta amiR-D 11.4, además de en todas las plantas control transformadas con el vector vacío (Tabla III.4). Entre tanto, en el resto de las plantas descendientes de la planta amiR-D 11.4 y en todas las descendientes de las plantas amiR-D 7.3 y amiR-D 2.6 no se observó expresión de GFP (Tabla III.4). Confirmando la resistencia a la infección de las plantas amiR-D que no habían mostrado expresión local de GFP, en ninguna de ellas se observaron signos de infección ni expresión sistémica de GFP. En todas las plantas V 1.6 control se detectó expresión de GFP en hojas superiores a las inoculadas a los 8 dpi. Igualmente, la visualización de GFP indicó infección sistémica del PPV en todas las plantas transgénicas transformadas con la construcción amiR-Di, aunque generalmente con un pequeño retraso, que en algún caso llegó a ser de tres días, respecto a las plantas control (Tabla III.4).

Para averiguar si los retrasos se debían a una menor acumulación viral en las hojas inoculadas, estas hojas se analizaron a los 9 dpi mediante un ensayo de Western blot con un anticuerpo específico de la CP del PPV (Fig. III.11). Este ensayo verificó que en las plantas amiR-D que no mostraban GFP no se producía una acumulación apreciable de virus. Aunque los niveles de acumulación de virus podrían ser algo inferiores en algunas de las plantas amiR-Di con respecto a los controles, las diferencias no parecían significativas y no se correlacionaban con los retrasos en la infección sistémica (Fig. III.11, Tabla III.4).

El resultado de este experimento es, por tanto, una clara evidencia de que la expresión de amiR-D es mucho más eficaz que la de su forma invertida amiR-Di para reprimir la infección del PPV.

Tabla III.4. Susceptibilidad frente al PPV de líneas transgénicas que expresan amiR-D y amiR-Di.

|                    | Infección        |  |
|--------------------|------------------|--|
|                    | Local (6 dpi)    | Sistémica                              |
| Di 1 <sup>a</sup>  | 4/4 <sup>c</sup> | 4/4 (9 dpi) <sup>d</sup>               |
| Di 2               | 4/4              | 1/4 (8 dpi), 1/4 (9 dpi), 2/4 (11 dpi) |
| Di 3               | 4/4              | 4/4 (9 dpi)                            |
| Di 5               | 4/4              | 3/4 (9 dpi), 1/4 (11 dpi)              |
| Di 6               | 4/4              | 3/4 (8 dpi), 1/4 (9 dpi)               |
| D 2.6 <sup>b</sup> | 0/4              | 0/4                                    |
| D 7.3              | 0/4              | 0/4                                    |
| D 11.4             | 3/5              | 1/5 (8 dpi), 2/5 (9 dpi)               |
| V 1.6 <sup>b</sup> | 4/4              | 4/4 (8 dpi)                            |

<sup>a</sup> Líneas transgénicas cuyas plantas F1 fueron analizadas. <sup>b</sup> Plantas cuyas descendencias F2 fueron analizadas. <sup>c</sup> Número de plantas que muestran GFP a los 6 dpi/número de plantas inoculadas. <sup>d</sup> Número de plantas que empezaron a mostrar signos de GFP al tiempo indicado/número de plantas inoculadas.

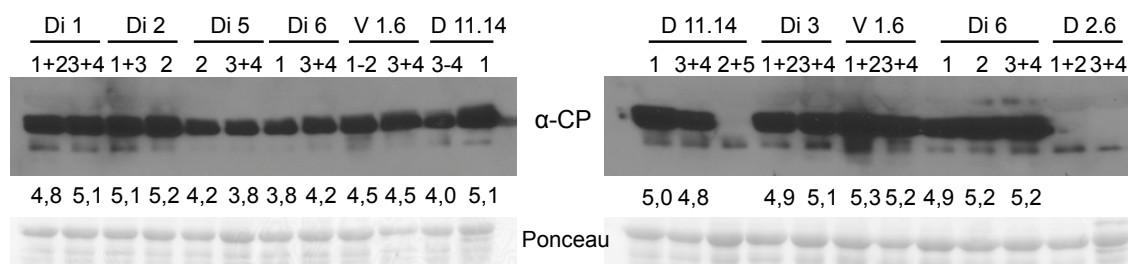


Figura III.11. Acumulación viral en plantas o grupos de plantas de las líneas de *N. benthamiana* transformadas con la construcción amiR-Di que se indican, inoculadas con PPV. Como controles se analizaron también plantas de líneas transformadas con amiR-D (D 11.4) y con el vector vacío (V 1.6). Se analizaron por Western blot con anticuerpo contra la CP viral hojas inoculadas por agroinfiltración recogidas a 9 dpi. La densitometría de las bandas de inmunoreacción se realizó con el software de análisis Image Lab™, y los valores resultantes se indican debajo de cada carril. Las membranas teñidas con rojo Ponceau muestran la subunidad mayor de la RuBisCO como control de carga.

### III.3.2 La banda predicha como amiRNA maduro, complementaria del RNA anti-genómico del PPV, es la que se acumula preferentemente en las plantas transformadas con la construcción amiR-Di

El diseño de la construcción amiR-Di estaba orientado a propiciar como banda madura mayoritaria a la de secuencia complementaria del RNA anti-genómico del virus, favoreciendo así su corte por RISC (Fig. III.10 B). Para verificar que se cumplieran las predicciones y comparar la eficiencia de expresión de amiR-Di con la de amiR-D, se

analizaron los niveles de acumulación de sus dos bandas en dos líneas transgénicas de cada construcción mediante un ensayo de Northern blot (Fig. III.12).

En concordancia con los resultados descritos en la sección III.1.2, las plantas de la línea altamente resistente amiR-D 7 acumulaban una cantidad pequeña, pero claramente detectable, de su hebra madura, complementaria al RNA genómico viral, mientras que la hebra estrella era indetectable por esta técnica, como también lo eran ambas hebras del amiRNA producido por las plantas de la línea poco resistente amiR-D 11. El análisis de las dos líneas transformadas con el amiR-Di, Di 1 y Di 6, mostró que la hebra diseñada como madura, complementaria a la banda negativa del RNA viral, era en efecto la que se acumulaba en mayor cantidad, no detectándose señal de la presunta banda estrella (Fig. III.12).

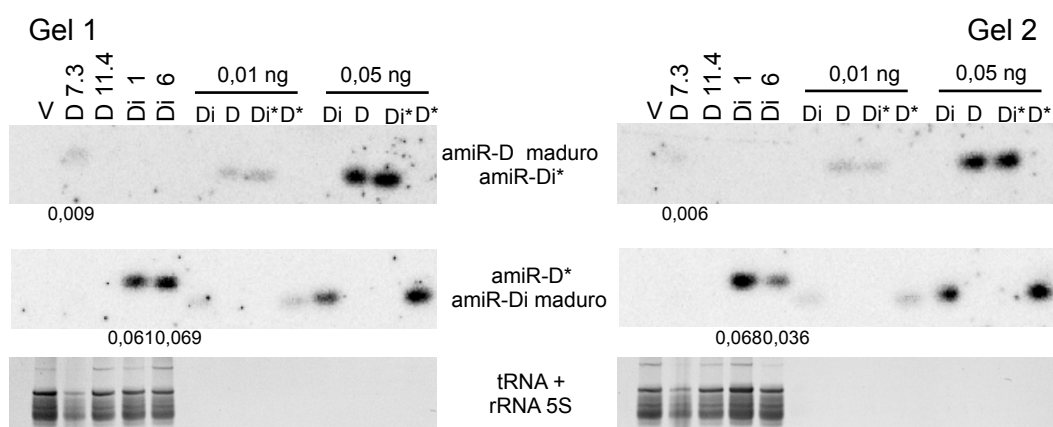


Figura III.12. Acumulación de amiR-D y amiR-Di en diferentes líneas de *N. benthamiana* transgénicas, estimada por análisis de Northern blot. Se incluyeron en el análisis, en dos geles diferentes, dos réplicas biológicas, cada una compuesta por hijas jóvenes de dos plantas no inoculadas de la generación F1 (líneas Di) o F2 descendientes de las indicadas (líneas D) (7 µg de una preparación de RNAs de pequeño tamaño). Como control negativo se cargaron 7 µg de una preparación de RNAs de pequeño tamaño de plantas transformadas con vector vacío (V). Las membranas fueron incubadas con oligodeoxinucleótidos de 19 nt, #3050 (paneles superiores) y #3051 (paneles inferiores), complementarios a las bandas que se pretenden detectar (indicadas entre los dos geles) marcados con <sup>32</sup>P. Como patrones de calibración se cargaron cantidades conocidas de oligodeoxinucleótidos de 21 nt con la secuencia de amiR-D y amiR-Di maduros (#3222 y #3218, respectivamente) y de sus bandas estrellas (#3224 #3220, respectivamente).. La densitometría de las señales y la estimación de cantidad de amiRNA acumulado en cada muestra se realizó con el programa Image Lab™. Los valores resultantes (en ng) se muestran debajo de cada carril. En la parte inferior, el gel teñido con BrEt muestra los tRNAs y el rRNA 5S como control de carga.

Aunque las limitaciones del ensayo de Northern blot realizado no permiten una cuantificación exacta, la densitometría de las bandas de amiRNA y de cantidades conocidas de oligonucleótidos cargados como control indicaba que las plantas amiR-Di acumulaban aproximadamente 7 veces más cantidad de banda madura (complementaria

al RNA viral de polaridad negativa) que la de la banda madura de amiR-D (complementaria al RNA genómico del virus) de las plantas D con un nivel de expresión mayor (plantas descendientes de D 7.3). Estos datos indican no solo que en la nueva construcción se ha invertido con éxito la cantidad de las bandas de amiRNA dirigidas a los RNAs genómico y anti-genómico, sino que en las plantas amiR-Di los niveles de expresión de amiRNA son similares o mayores a los que proporcionan altos niveles de resistencia frente al PPV en las plantas amiR-D. Así pues, la falta de resistencia efectiva de las plantas amiR-Di (sección III.3.1) sugeriría que la hebra de RNA viral anti-genómica no es accesible al silenciamiento de RNA de amiRNA o que su procesamiento no tiene un efecto antiviral significativo.

### **III.3.3 La expresión de amiR-Di tiene un efecto antiviral que promueve la emergencia de variantes del PPV con mutaciones en la diana del amiRNA**

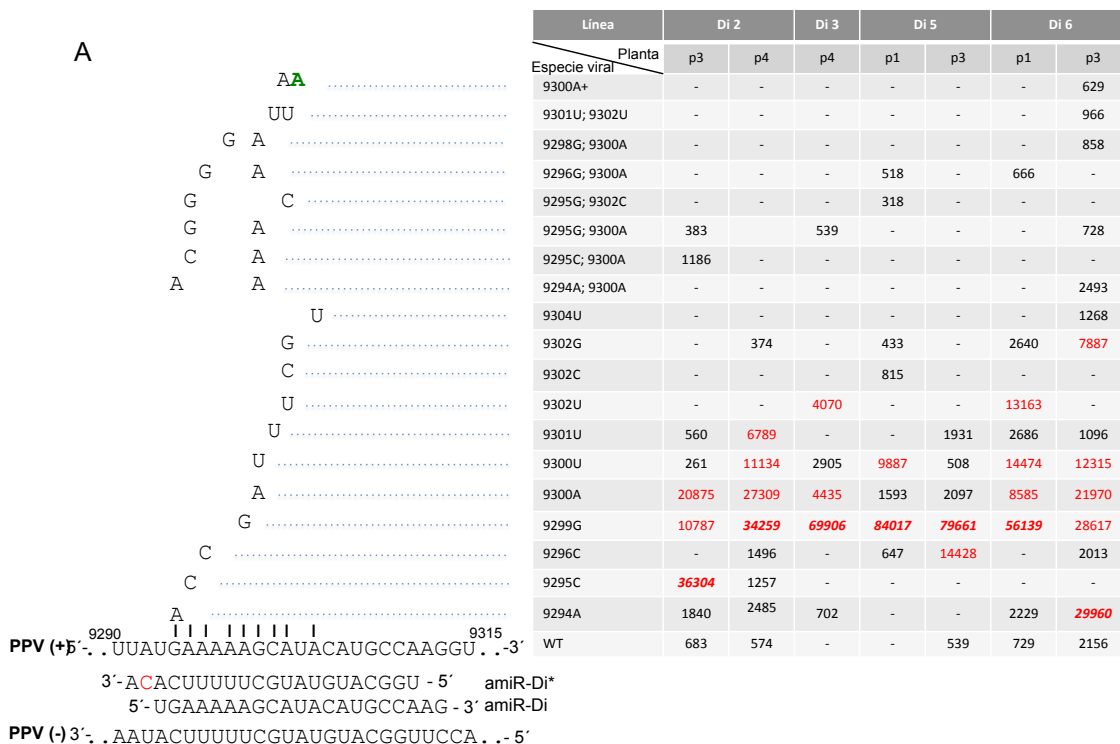
A pesar de que los resultados descritos en la sección III.3.1 muestran claramente que la expresión de amiR-Di no es capaz de proporcionar una resistencia efectiva frente al PPV, los ligeros retrasos en el progreso de la infección en las plantas transgénicas que expresan este amiRNA podrían ser indicativos de una actividad antiviral poco intensa, capaz de promover una evolución de la población viral tendente a escaparse de ella. Para evaluar esta posibilidad, a los 27 dpi se analizó por IC-RT-PCR y posterior secuenciación la región del genoma que incluye la diana de amiR-D/amiR-Di de la progenie viral acumulada en hojas superiores a las inoculadas de las cuatro plantas de las líneas amiR-Di 2, 3, 5, 6 y en las 2 plantas control amiR-D 11.14 que se habían infectado sistémicamente.

Los cromatogramas de todas las plantas amiR-Di y de una de las plantas amiR-D 11.4 analizadas mostraban múltiples picos dobles, o incluso triples, en la secuencia de la diana del amiRNA, que sugerían la presencia de varias especies virales (resultados no mostrados). Sin embargo, no era posible diferenciar si algunos picos muy pequeños eran mutaciones reales o ruido de fondo de la técnica, y, en cualquier caso, la secuenciación del producto total de la RT-PCR solo daba información sobre el conjunto de la población viral. Para determinar la secuencia de las especies virales individuales que coexistían en cada muestra, en este caso, en lugar de clonar en plásmidos bacterianos el producto de la RT-PCR, como se hizo para el análisis de la progenie viral de las plantas amiR-D descrito en la sección III.2.2, se realizó un análisis de secuenciación masiva de

amplicones por la técnica de MiSeq para las progenies virales de una planta de la línea amiR-Di 3 y de dos plantas del resto de las líneas estudiadas. Como control, se analizó por la misma técnica una mezcla de las poblaciones virales de dos plantas transformadas con el vector vacío. Se obtuvieron del orden de 100.000 lecturas específicas para cada una de las muestras analizadas. En esta muestra control, aproximadamente el 90% de las lecturas correspondían a la secuencia silvestre; el resto de lecturas se distribuía en múltiples especies, cada una con pocas lecturas, a menudo leídas en una sola de las orientaciones, con mutaciones puntuales a lo largo de todo el amplicón, sin preferencias por la diana del amiRNA; ninguna de las secuencias mutadas leída en ambas orientaciones llegaba al 0.5% de representación, y la gran mayoría de ellas estaba por debajo del 0.1% y/o solo se leían en una de las orientaciones. Sin un estudio más detallado, no es posible discriminar si estas secuencias muy minoritarias son ruido de fondo de la técnica o reflejan la estructura en forma de cuasiespecie de la población viral.

Del resto de las muestras se obtuvieron también en torno a las 100.000 lecturas específicas (entre 93.000 y 130.000), que revelaron una compleja composición de las poblaciones virales de todas las plantas amiR-Di analizadas (Fig. III.14). En todas ellas, el virus silvestre era muy minoritario, y solo en una planta (Di 6.3) alcanzaba el 1,8 % del total de lecturas específicas. El número de especies virales distintas con una representación superior al 4% variaba entre dos en las plantas Di 5.2 y 5.3, y cinco en la planta Di 6.3. Además, se detectaban bastantes más especies con una representación menor, pero claramente por encima del ruido de fondo definido por la población de la planta control transformada con el vector vacío, y concentradas en la diana del amiRNA (Fig. III.13 A). Llama la atención que, a diferencia de la abundancia de especies con más de una mutación encontradas en las poblaciones virales de las plantas que expresaban amiR-C y amiR-D (Fig. III.7), todas las especies mayoritarias acumuladas en cualquiera de las plantas que expresan amiR-Di tenían una sola mutación. También se encuentran especies con dos mutaciones, pero son mucho más minoritarias, y no se ha detectado ninguna con tres mutaciones que supere el listón de significación que hemos establecido. Este resultado estaría de acuerdo con el menor nivel de resistencia planteado por la construcción amiR-Di, que le permitiría al virus escaparse de ella con una única mutación.

Es interesante destacar también el caso de las plantas de la línea D 11 incluidas en este experimento como control. En conjunto, el nivel de resistencia de las plantas de la generación F2 (descendencia de la planta D 11.14) analizadas aquí (tres plantas de 5 no se infectaron, Tabla III.4) parecía algo mayor que el de las de la generación F1 analizadas inicialmente (solo no se infectó 1 de las 5 plantas inoculadas, resultado no detallado en la Tabla III.1). Sin embargo, mientras que en las cuatro plantas de la generación F1 infectadas las especies virales mayoritarias acumulaban mutaciones (en dos de las plantas más de una) en la diana del amiRNA (Fig. III.7), en una de las plantas D 11.14 hay un predominio prácticamente absoluto del virus silvestre y en la otra analizada la especie viral mayoritaria tiene una única mutación (ya detectada, pero junto a una segunda mutación, en una variante viral de una planta de la generación F1) (Fig. III.13 B), lo que sugiere que la presión selectiva que está ejerciendo amiR-D en estas plantas no es muy fuerte. Esta aparente contradicción podría ser consecuencia de la segregación del grado de resistencia antiviral (probablemente como consecuencia de segregación del nivel de expresión del transgén) en las poblaciones F2 de la línea D 11.



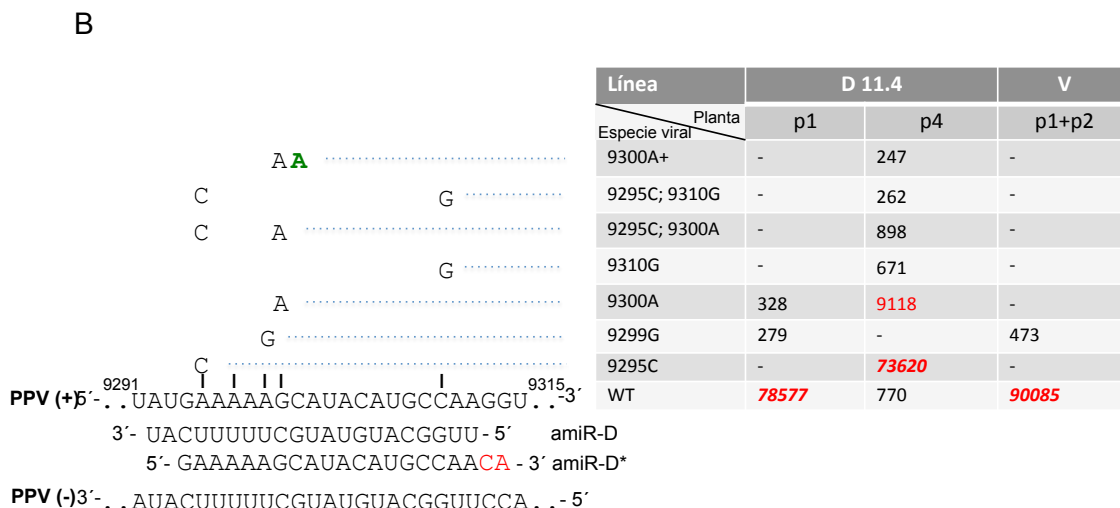


Figura III.13. Identificación mediante secuenciación masiva MiSeq de las especies virales acumuladas en plantas de diferentes líneas de *N. benthamiana* transformadas con las construcciones amiR-Di (A) y amiR-D (B). Como control, se incluye también en el panel B el análisis de un grupo de dos plantas de una línea transformada con el vector vacío (V). Se analizaron hojas infectadas sistémicamente recogidas a los 22 dpi. A la izquierda se indican las mutaciones presentes en cada especie identificada; los nucleótidos en verde provienen de una inserción. Las tablas muestran el número de promedio de lecturas MiSeq en ambas orientaciones. Solo se han incluido las especies que aparecen con más de 300 lecturas en las dos orientaciones. Los valores superiores al 5% de lecturas totales se marcan en rojo y el mayor de ellos se resalta en negrita y cursiva. En la parte inferior izquierda de cada panel se muestran las dianas de amiR-Di (A) o amiR-D (B) estrella y maduro predichas en el RNA genómico y en la hebra de RNA negativa del virus, numeradas según Laín et al. (1989). Los nucleótidos de las bandas estrella que no se emparejan con el RNA viral se resaltan en rojo.

Dado que las bandas de amiRNA dirigidas al RNA genómico y a la hebra de RNA viral negativa se acumulan en proporciones inversas en las plantas que expresan amiR-D y amiR-Di (Fig. III.12) y que la actividad del amiRNA está fundamentalmente condicionada por la interacción de su región 5' con la 3' de la diana, sería de esperar que las mutaciones que faciliten el escape de la acción antiviral de amiR-D y amiR-Di fueran distintas. Sin embargo, los patrones de cambios observados en los dos tipos de plantas fueron muy similares, con la mayor parte de ellos afectando a la región central de la diana de los amiRNAs (Fig. III.14). Una diferencia llamativa es que mientras que en algunas plantas amiR-D se observaban mutaciones en la región 3' de la diana de los amiRNAs del RNA genómico, esto es, la predicha como relevante en el reconocimiento por la abundante banda madura de amiR-D, en ninguna de las plantas amiR-Di se observó este tipo de mutaciones, lo que estaría de acuerdo con el hecho de que esta secuencia del RNA genómico solo es de esperar que sea relevante para el reconocimiento de la poco abundante banda estrella de amiR-Di (amiR-Di\*). Por otra parte, no se observó en las plantas que expresan amiR-Di un aumento del número de mutaciones (pero tampoco una disminución llamativa) en la región 3' de la diana de los

amiRNAs de la hebra de RNA negativa del virus (la 5' en el RNA genómico), a pesar de que era de esperar que esta parte de la diana fuera mucho más relevante para la resistencia en las plantas amiR-Di (en las que la banda de amiRNA de la que es complementaria, el amiR-Di maduro, es muy abundante) que en las plantas amiR-D (en las que debe ser reconocida por la muy minoritaria banda amiR-D estrella).

Un dato que llama poderosamente la atención es que los nucleótidos más frecuentemente mutados en las plantas amiR-D (G9300) y amiR-Di (A9299) están desfasados en un nucleótido, siendo también frecuentes, pero menos, las mutaciones en el nucleótido que les sigue (C9301 en las plantas amiR-D y el propio G9300 en las amiR-Di). Teniendo en cuenta que los sitios de corte dirigidos por amiR-D y amiR-Di esperados están desfasados precisamente en un nucleótido (Fig. III.10 B), parece que la posición 9 de la diana en el RNA genómico (la 15 en la de la hebra negativa) es especialmente importante para la actividad de amiR-D y amiR-Di, sin que sea relevante la naturaleza del nucleótido viral que la ocupe (Fig. III.14).

|    |                  | D1    |    | D2 |    | D 11 |    |    |    |    |    | C+D 7 |    |    |    |    |    | Di2 |    | Di3 |    | Di5 |                   | Di6 |    |  |  |       |  |
|----|------------------|-------|----|----|----|------|----|----|----|----|----|-------|----|----|----|----|----|-----|----|-----|----|-----|-------------------|-----|----|--|--|-------|--|
|    |                  | 9     |    | 6  |    | 4    |    | 7  |    | 8  |    |       |    |    |    |    |    |     |    |     |    |     |                   |     |    |  |  |       |  |
| D* | D <sup>mad</sup> | p6    | p5 | p2 | p2 | p3   | p4 | p5 | p1 | p4 | p1 | p6    | p2 | p5 | p6 | p3 | p4 | p4  | p1 | p3  | p1 | p3  | Di <sup>mad</sup> | Dj* |    |  |  |       |  |
| 3' | 5'               | 3'    |    |    |    |      |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |     |    |     |    |     | 3'                | 5'  | 3' |  |  |       |  |
| A  |                  | G9314 |    |    |    |      |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |     |    |     |    | G   |                   |     |    |  |  | G9314 |  |
| C  |                  | G9313 |    |    |    |      |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |     |    |     |    |     | G                 |     |    |  |  | G9313 |  |
| A  | U                | A9312 |    |    |    |      |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |     |    |     |    |     | A                 |     |    |  |  | A9312 |  |
| A  | U                | A9311 | G  |    |    | G    | G  |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |     |    |     |    |     | A                 | U   |    |  |  | A9311 |  |
| C  | G                | C9310 |    |    |    |      |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |     |    |     |    |     | C                 | G   |    |  |  | C9310 |  |
| C  | G                | C9309 |    |    |    |      |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |     |    |     |    |     | C                 | G   |    |  |  | C9309 |  |
| G  | C                | G9308 |    |    |    |      |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |     |    |     |    |     | G                 | C   |    |  |  | G9308 |  |
| U  | A                | U9307 |    |    |    |      |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |     |    |     |    |     | U                 | A   |    |  |  | U9307 |  |
| A  | U                | A9306 |    |    |    |      |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |     |    |     |    |     | A                 | U   |    |  |  | A9306 |  |
| C  | G                | C9305 |    |    |    |      |    |    |    |    |    |       |    |    | U  |    |    |     |    |     |    |     | C                 | G   |    |  |  | C9305 |  |
| A  | U                | A9304 |    |    |    |      |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |     |    |     |    |     | A                 | U   |    |  |  | A9304 |  |
| U  | A                | U9303 |    |    |    |      |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |     |    |     |    |     | U                 | A   |    |  |  | U9303 |  |
| A  | U                | A9302 |    |    |    |      |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |     |    |     |    |     |                   |     |    |  |  | A9302 |  |
| C  | G                | C9301 |    | A  |    | A    |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |     |    |     |    |     |                   |     |    |  |  | C9301 |  |
| G  | C                | G9300 |    | A  | A  | A    |    |    |    | A  |    |       |    | A  | A  |    |    |     |    |     |    |     |                   |     |    |  |  | G9300 |  |
| A  | U                | A9299 |    |    |    |      |    |    |    |    |    |       |    |    | G  |    |    |     |    |     |    |     |                   |     |    |  |  | A9299 |  |
| A  | U                | A9298 |    | G  |    |      |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |     |    |     |    |     |                   |     |    |  |  | A9298 |  |
| A  | U                | A9297 |    |    |    |      |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |     |    |     |    |     |                   |     |    |  |  | A9297 |  |
| A  | U                | A9296 | G  | G  |    |      |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |     |    |     |    |     |                   |     |    |  |  | A9296 |  |
| A  | U                | A9295 |    |    |    |      |    |    |    |    |    |       |    |    | C  |    |    |     |    |     |    |     |                   |     |    |  |  | A9295 |  |
| G  | C                | G9294 |    | A  | A  |      |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |     |    |     |    |     |                   |     |    |  |  | G9294 |  |
|    | A                | U9293 |    |    |    |      |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |     |    |     |    |     |                   |     |    |  |  | U9293 |  |
|    | U                | A9292 |    |    |    |      |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |     |    |     |    |     |                   |     |    |  |  | A9292 |  |
|    |                  | U9291 |    |    |    |      |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |     |    |     |    |     |                   |     |    |  |  | U9291 |  |
| 5' | 3'               | 5'    |    |    |    |      |    |    |    |    |    |       |    |    |    |    |    |     |    |     |    |     |                   |     |    |  |  | 5'    |  |

Figura III.14. Resumen mutaciones encontradas en las especies virales que se acumulan en plantas de la generación F1 o F2 de diferentes líneas de *N. benthamiana* transgénicas que expresan amiR-D o amiR-Di. En las columnas se muestran las secuencias de las bandas madura y estrella de estos amiRNAs y la de sus dianas en el RNA genómico del PPV [numeración según Lain et al. (1989)]. Los datos corresponden a los mostrados en las figuras III.7 y III.13 (en este último caso, solo se incluyen las mutaciones de especies con más del 5% de lecturas).



Pero no es solo la posición en la diana lo que define las mutaciones que se seleccionan preferentemente para escapar de la acción de los amiRNAs. Así, tanto en las progenies virales de las plantas amiR-D (ya descrito en la sección III.2.1) como en las amiR-Di, se acumulan transiciones en mayor proporción que transversiones. Sin embargo, el ejemplo que mejor ilustra las restricciones que se le pueden plantear al virus a la hora de mutar para protegerse de la actividad antiviral de un amiRNA, es la conservación de A9297 en las poblaciones virales de todas las plantas que expresan amiR-D y amiR-Di analizadas, cuando en las posiciones que bordean a este nucleótido hay frecuentes mutaciones (Fig. III.14). La explicación más sencilla de esta observación es que el triplete del que forma parte este nucleótido (AAA) codifica a una lisina y su sustitución por otros nucleótidos daría lugar a un codón de parada o a codones que codifican a residuos de ácido glutámico o glutamina, que suponemos que no serían funcionales. Hay que destacar que la sustitución de lisina por un aminoácido más similar, arginina, parece más permisible, ya que una de las especies virales detectadas en la planta amiR-D 2.5 presentaba una mutación A9298G, que da lugar al codón AGA.

La conjunción de que i) tanto amiR-D como amiR-Di, tienen actividad antiviral, aunque la de amiR-D es más potente; ii) en plantas que expresan amiR-D y amiR-Di se acumulan mutaciones en posiciones similares en la región central y 5' (orientación del RNA genómico) de sus dianas y iii) solo se observan mutaciones en la región 3' de la diana (orientación RNA genómico) en las plantas amiR-D, sugiere que tanto la hebra genómica como la negativa del RNA viral son accesibles a la acción de los amiRNAs, aunque la acción sobre la hebra genómica es más efectiva. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que solo el RNA genómico es accesible y la mayor resistencia de las plantas amiR-D se debe a que producen más banda de amiRNA dirigida a esa hebra del RNA viral que las plantas amiR-Di; para sostener esta hipótesis sería necesario postular que, en contraste con el reconocimiento canónico de los miRNAs de plantas, en el que se supone que participan principalmente los nucleótidos 2 a 13 del miRNA, en el caso del amiR-D maduro y amiR-Di estrella los requerimientos de complementariedad mayores estarían en sus nucleótidos 12 a 19.

### III.3.4. En una planta transgénica que expresa amiR-Di, se corta la hebra anti-genómica del RNA del PPV en el sitio esperado para el procesamiento por RISC dirigido por este amiRNA

Como he mencionado en la sección anterior, el estudio de las mutaciones introducidas en las poblaciones virales de las plantas transgénicas que expresan amiR-D o amiR-Di (Fig. III.14) sugiere que el procesamiento de la hebra negativa del RNA del PPV contribuye a la actividad antiviral de estos amiRNAs, y la figura III.12 muestra una clara acumulación de amiRNA maduro complementario a esta hebra del RNA viral en las plantas de *N. benthamiana* transformadas con la construcción amiR-Di. Para obtener una evidencia más directa de la acción de los amiRNAs sobre la hebra negativa del RNA del PPV, realizamos un experimento de 5'-RACE programado para identificar sitios de corte en este RNA viral.

Este experimento no es tan simple como aparenta. Si la acción de RISC cargado con el amiRNA es suficientemente potente, no se establecerá la infección viral, por lo que no habrá fragmentos de RNA viral que analizar; si la acción es demasiado débil, no habrá suficientes cortes específicos como para destacarlos sobre el ruido de fondo; y si la actividad no es tan fuerte como para impedir la infección, pero potencia la selección de mutantes resistentes a la acción del amiRNA, el RNA de la progenie mutada no se cortará en el sitio especificado por dicho amiRNA. Con objeto de tratar de minimizar estas limitaciones, usamos los datos de MiSeq para elegir una planta infectada con una cantidad significativa de virus silvestre, cuyo RNA soporte la hibridación específica del amiRNA expresado por el transgén, pero que coexista con especies virales mutadas que revelen la existencia de una presión selectiva efectiva producida por el amiRNA. Estos requerimientos los cumplía la planta Di 6.3, con alrededor del 2% de lecturas de MiSeq correspondientes a la secuencia silvestre, y que acumula cinco especies virales con diversas mutaciones en la diana del amiRNA, cada una de ellas con más del 5% de las lecturas, en sus hojas infectadas sistémicamente (Fig. III.13 A). Con objeto de maximizar la cantidad de RNA viral sin mutaciones en la diana del miRNA, se usó para el análisis por 5'-RACE tejido de hojas inoculadas recogidas a 9 dpi, un tiempo relativamente temprano, pero al que la infección, revelada por la fluorescencia de la GFP, estaba ya bien establecida; como control se usó tejido de una planta transformada con el vector vacío infectada, recogido en condiciones equivalentes.

Para la técnica del RACE se liga un adaptador a los extremos 5' de los fragmentos de RNA acumulados en la planta analizada. A continuación, se sintetiza cDNA con un iniciador complementario a la hebra negativa del RNA viral y se amplifica por PCR un fragmento de DNA usando iniciadores que hibridan en el adaptador y en una secuencia del RNA del virus próxima a la diana de la banda amiR-Di madura (el protocolo se describe en más detalle en el apartado II.3.9 de Materiales y Métodos). El análisis por electroforesis en gel de agarosa del producto de la PCR de la muestra de la planta amiR-Di 6.3 mostró una banda mayoritaria con la movilidad esperada para un fragmento producido por el corte de RISC cargado con amiR-Di maduro en la hebra negativa del RNA viral (Fig. III.15 A). No se detectaba una banda con movilidad similar en la muestra de la planta control.

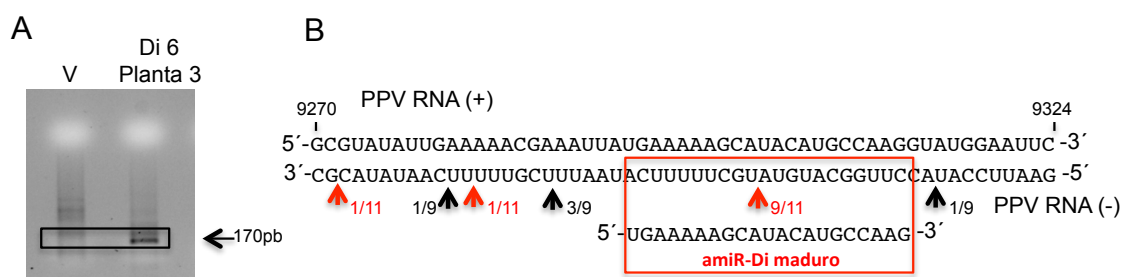


Figura III.15. Detección por 5'-RACE de posibles cortes por RISC en la hebra negativa del RNA del PPV presente en plantas de *N. benthamiana* que expresan amiR-Di. Se analizaron las hojas de la planta 3 de la línea Di 6 inoculadas con el PPV por agroinfiltración (en la Fig. III.13 se muestra el análisis por secuenciación masiva MiSeq de la población viral de las hojas infectadas sistémicamente de esta planta) recogidas a los 9 dpi. Como control, se usaron hojas de una planta de una línea transformada con el vector vacío (V). **A**) Productos finales del análisis 5'-RACE específico de la hebra negativa del RNA viral separados por electroforesis en gel de agarosa. **B**) Mapeo en la secuencia de la hebra negativa del RNA del PPV de los bordes de los productos de 5'-RACE clonados. Los procedentes de la planta Di 6.3 y de la planta control (V) se indican con cabezas de flecha rojas y negras, respectivamente. Los números indican el número de clones con el borde de la secuencia viral en ese punto / número total de clones analizados. Se muestra también la secuencia del RNA genómico numerado según Laín et al. (1989).

Para verificar con precisión los extremos 5' de los fragmentos de RNA viral amplificados, los productos de PCR de las muestras amiR-Di 6.3 y control se purificaron del gel de agarosa, se clonaron en un plásmido bacteriano y se determinó la secuencia de varios clones individuales. En nueve de los once clones analizados de la muestra amiR-Di 6.3 el adaptador estaba inmediatamente al lado de la secuencia de la hebra negativa del RNA viral correspondiente al sitio de corte predicho para RISC cargado con amiR-Di maduro (Fig. III.15 B). Por el contrario, la secuencia de los clones de la muestra control identificaban diferentes extremos 5' localizados fuera de la diana

del amiRNA. Estos resultados permiten concluir que la hebra anti-genómica del PPV puede ser diana de un amiRNA. Al mismo tiempo, la localización precisa del sitio mayoritario de corte en la posición predicha, confirma el correcto procesamiento del pre-amiR-Di para dar lugar al dúplex de amiRNA esperado.

### **III.4 Potencial evolutivo de las especies del PPV surgidas bajo la presión selectiva de amiRNAs**

Como he mostrado en los capítulos anteriores, la infección con PPV de plantas que expresan amiRNAs parcialmente resistentes provoca la aparición de múltiples especies virales, que en muchos casos coexisten en la misma planta. Pero es importante conocer cuál es la estabilidad genética y la competitividad de estas especies virales cuando se propagan en el mismo ambiente en que se generaron y en ambientes diferentes. Con este objetivo se eligieron varias progenies virales, seleccionadas bajo la presión selectiva moderada de amiR-D y amiR-Di, se propagaron en diferentes plantas y se caracterizó la composición genética de las nuevas poblaciones virales resultantes.

#### **III.4.1 Las mutaciones seleccionadas bajo la presión selectiva de amiRNAs pueden mantenerse en plantas silvestres**

Inicialmente se inocularon plantas de *N. benthamiana* silvestre con extractos de las plantas D 11.4 y D 2.6.2, cuyas poblaciones virales muestran, en el primer caso, una mutación silenciosa única en el extremo 3' de la diana del amiRNA (orientación RNA genómico) (A3111G) y en el segundo tres mutaciones presentes en la mitad 5' de la diana (orientación RNA genómico) (Fig. III.7) (Fig. III.16). La especie mayoritaria de esta segunda población viral parecía corresponder al haplotipo G9294A, G9300A, pero la secuenciación directa del producto de IC-RT-PCR había mostrado la presencia adicional del haplotipo G9294A, G9300C; las tres mutaciones de la población viral de la población viral de la planta D 2.6.2 causaban cambios de aminoácido (Fig. III.7).

Análisis de IC-RT-PCR seguida de secuenciación revelaron que después de dos pases en plantas silvestres la población viral mayoritaria conservaba la mutación A9311G seleccionada en la planta D 11.4. En una planta inoculada con el extracto de la planta D 2.6.2 se detectaba el haplotipo mayoritario de la planta madre, G9294A,

G9300A, mientras que en la segunda se detectaba el haplotipo inicialmente minoritario G9294A, G9300C (Fig. III.16). Es interesante que mientras que después de un nuevo pase en plantas silvestres la doble mutación G9294A, G9300C se mantenía en las cuatro plantas analizadas, la doble mutación G9294A, G9300A solo se conservaba en dos de las cuatro plantas inoculadas con el extracto de la planta infectada con el virus con este haplotipo. El virus acumulado en las otras dos plantas mantenía la mutación G9294A, pero en la posición 9300 había revertido a la G silvestre (Fig. III.16). Este resultado sugiere que la mutación G9300A, que da lugar a un cambio de alanina a treonina, causa una pequeña pérdida de eficacia biológica que facilita su reversión cuando cesa la presión selectiva de amiR-D que promovió su emergencia, pero que no es suficiente para forzar su completa eliminación de manera inmediata. Por otra parte, ni la mutación silenciosa A9311G ni las mutaciones con cambio de sentido G9294A (sustitución ácido glutámico a lisina) y G9300C (sustitución alanina a prolina) mostraban en este experimento pérdidas de eficacia biológica que afectaran a su acumulación en plantas que no expresan amiRNA.

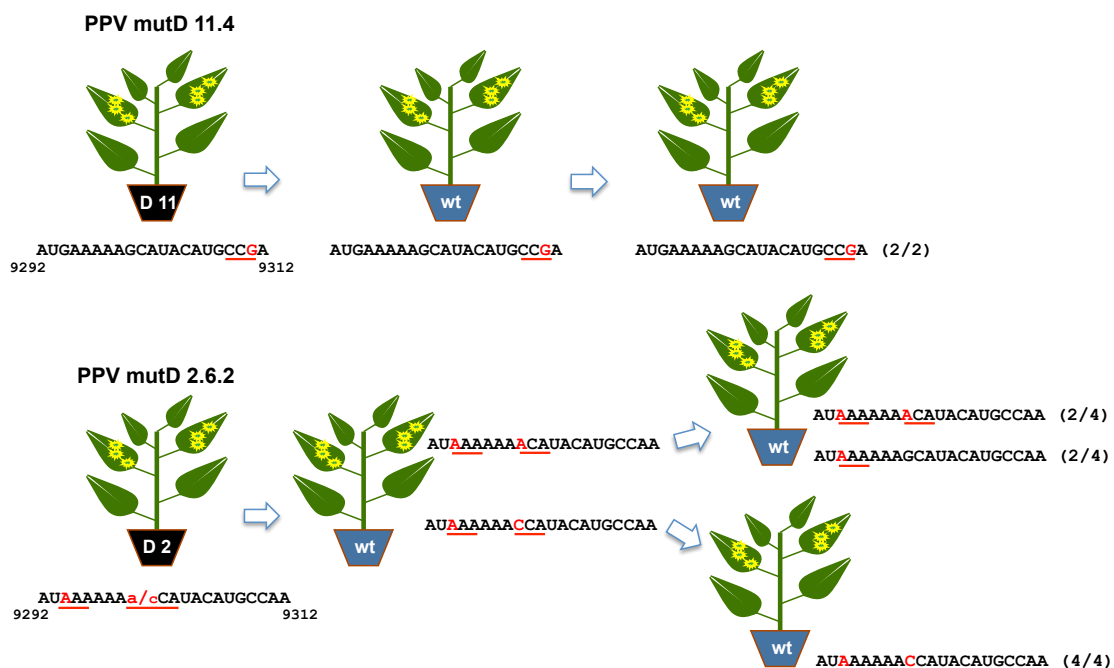


Figura III.16. Evolución de poblaciones virales generadas en plantas de *N. benthamiana* transgénicas que expresan amiR-D (ver Fig. III.7) cuando se propagan en plantas silvestres (wt). Los pases entre las plantas indicadas se realizaron por inoculación manual con extractos de hojas infectadas sistémicamente recogidas a los 22 dpi. Las progenies virales producto de los pases se analizaron por IC-RT-PCR y secuenciación en hojas infectadas sistémicamente recogidas a 25 dpi. Entre paréntesis se muestra el número de plantas analizadas que presenta la secuencia de la diana de amiR-D indicada / número total de plantas analizadas; se resaltan en rojo los cambios con respecto a la secuencia del virus silvestre y se subrayan los codones afectados por estas mutaciones.

Un estudio más detallado se realizó con la población viral generada en la planta Di 6.3. El análisis por MiSeq había mostrado que se trata de una población muy compleja con 5 especies virales que alcanzan más del 5% de lecturas (Fig. III.17). Con un extracto de esta planta se inocularon cuatro plantas transformadas con el vector vacío (plantas V), cuyas hojas infectadas sistémicamente se analizaron por secuenciación por MiSeq. La primera observación interesante es que el número de lecturas del virus silvestre no era mayor en ninguna de las plantas V que en la planta parental que expresa amiR-Di (Fig. III.17); este resultado confirma que al menos alguna de las mutaciones que se impuso bajo la presión selectiva del amiRNA no causa una disminución de la eficacia biológica del virus en ausencia de dicha presión. La composición de las poblaciones virales de las cuatro plantas V inoculadas con el extracto de la planta Di 6.3 diferían considerablemente de la de esta planta y entre sí, aunque las poblaciones de las plantas V 1.6.6 y V 1.6.8 eran muy similares, y las especies mayoritarias de las plantas V ya se habían detectado, casi todas en gran abundancia, en la planta Di 6.3 (Fig. III.17). En todas las plantas V se observa una disminución clara en la complejidad de la población si se compara con la de la planta usada como inóculo. Esto resulta especialmente claro en las plantas V 1.6.6 y V 1.6.8, pero en las plantas V 1.6.5 y V 1.6.7, aún hay cuatro especies representadas por más del 5% de las lecturas. En cualquier caso, considerando la población viral del conjunto de las plantas, no se puede considerar que la explosión de variabilidad generada por la acción antiviral de amiR-Di disminuya significativamente cuando el virus amplificado en presencia del amiRNA se propaga en plantas que no lo producen.

Centrándose en aspectos más específicos, llama la atención que la especie mayoritaria en la población Di 6.3 parental (mutación G9294A) solo se acumula de manera significativa en una de las cuatro plantas que no expresan amiRNA, y en esa planta es una especie muy minoritaria (aporta menos del 0.7% de las lecturas) (Fig. III.17). En el pase de la progenie D 2.6.2 descrito más arriba, en el que la especie viral con la mutación G9294A era muy mayoritaria, no se observaba una pérdida significativa de eficacia biológica asociada con esta mutación, a pesar de causar una sustitución de lisina por ácido glutámico (Fig. III.17). Sin embargo, la casi total eliminación de la especie con la mutación G9294A en el pase de la progenie Di 6.3, en el que tenía que competir con varias otras especies presentes en cantidades similares,

revela que la mutación G9294A, que es efectiva para que el virus se escape tanto de la acción de amiR-D como de la de amiR-Di, tiene algún coste en infecciones sin amiRNA.

La segunda de las especies más abundantes en la planta parental Di 6.3 (mutación A9299G), que a su vez es la mayoritaria, con mucho, en el conjunto de las plantas amiR-Di infectadas con el PPV silvestre (Fig. III.13 A) tampoco es la mayoritaria en ninguna de las cuatro plantas V inoculadas con el extracto de esa planta y en una de ellas ni siquiera se acumula a un nivel significativo (Fig. III.17). Este podría ser, por tanto, otro ejemplo de una especie muy apropiada para propagarse bajo la presión selectiva de amiR-Di, pero cuya competencia se reduce en ausencia de dicha presión. Lo sorprendente en este caso es que la mutación A9299G es silenciosa.

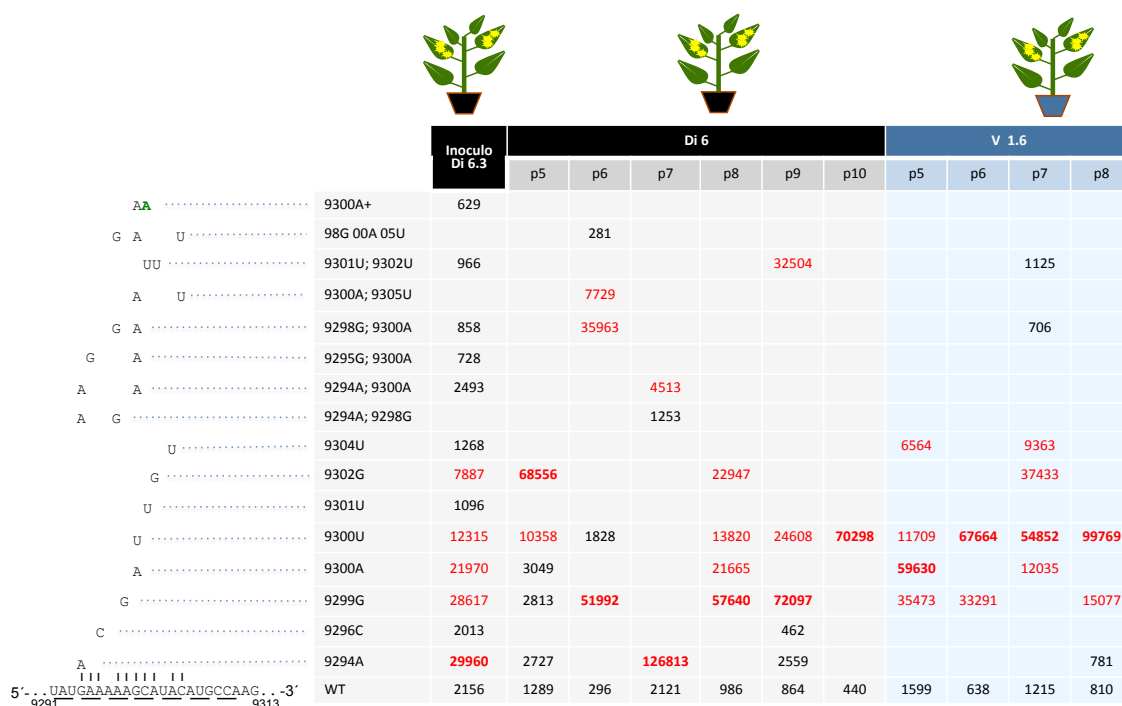


Figura III.17. Identificación mediante secuenciación masiva MiSeq de las especies virales acumuladas en plantas de *N. benthamiana* transgénicas de la línea Di 6 y en plantas de una línea transformada solo con el vector vacío (V 1.6) inoculadas con un extracto de hojas infectadas sistémicamente de la planta Di 6.3 (ver Fig. III.13A) recogidas a los 22 dpi. Se analizaron hojas infectadas sistémicamente recogidas a los 27 dpi. A la izquierda se indican las mutaciones presentes en cada una de las especies identificada. Las tablas muestran el número promedio de lecturas Miseq en ambas orientaciones. Solo se han incluido las especies con más de 300 lecturas en las dos orientaciones. Los valores superiores al 5% de lecturas totales se marcan en rojo, y el mayor de ellos se resalta en negrita y cursiva. En la parte inferior izquierda se muestra la secuencia del RNA genómico del PPV correspondiente a las dianas predichas de amiR-Di, numerada según Laín et al. (1989).

En cuanto a la tercera especie más abundante en la planta Di 6.3, la que tiene la mutación G9300A (provoca un cambio de alanina a treonina), desaparecía en dos de las cuatro plantas inoculadas con el extracto de esta planta (Fig. III.17). Este resultado concuerda con el observado en el pase de la progenie de la planta D 2.6.2 y refuerza la idea de que la mutación G9300A tiene un coste en eficacia biológica (Fig. III.16). El hecho de que la especie viral con esta mutación se mantenga en las otras dos plantas silvestres analizadas, siendo incluso la mayoritaria en una de ellas, también confirma que ese coste en eficacia biológica no es muy grande.

La especie viral predominante en tres de las cuatro plantas V, que tiene una mutación que afecta al residuo 9300 (G9300U), solo era la cuarta más abundante en la planta amiR-Di 6.3 y no pasaba de representar más del 12.5% de las lecturas MiSeq en ninguna de las plantas amiR-Di inoculadas en el experimento descrito en el capítulo anterior (en dos de esas plantas, ni siquiera alcanzaba el 1% de las lecturas) (Fig. III.13 A). Se podría concluir, por consiguiente, que la mutación G9300U podría no ser tan eficaz para proteger al virus de la acción de amiR-Di como las mutaciones G9294A, A9299G o G9300A (o no producirse tan fácilmente como ellas), pero, el cambio de alanina a serina que provoca, no tendría efecto negativo, o incluso podría tenerlo positivo, en la multiplicación del virus cuando el amiRNA no está presente.

#### **III.4.2 La población viral generada en plantas que expresan amiRNAs puede ver aumentada su complejidad cuando se propaga en las mismas líneas transgénicas**

Para verificar cómo evolucionaba la población viral seleccionada para escapar de un amiRNA cuando se mantenía bajo la misma presión selectiva, primeramente se inoculó un extracto de la planta D 11.4 en nuevas plantas de generación F1 de la línea amiR-D 11 y un extracto de la planta D 2.6.2 en nuevas plantas de generación F2 de la línea amiR-D 2 (descendientes, como D 2.6.2, de la planta D 2.6).

El análisis por IC-RT-PCR de una planta D 11 inoculada con la progenie viral de la planta D 11.4 mostraba la acumulación mayoritaria de una variante viral que, además de la mutación A9311G, había incorporado una mutación G9300A (Fig. III.18), lo que sugiere que, aunque la mutación A9311G es suficiente para que el PPV pueda infectar plantas de la línea moderadamente resistente D 11, una segunda mutación en la diana del amiRNA ayuda sustancialmente a escapar de la actividad antiviral de amiR-D en estas plantas. Este resultado está de acuerdo con la observación destacada en la sección



III.2.2 de que la mayoría de las especies virales que se acumulan en las plantas que expresan amiR-C o amiR-D mostraban más de una mutación en la diana del amiRNA. En un segundo pase en plantas D 11, se mantenían las dos mutaciones, sin que se seleccionara ninguna más adicional (Fig. III.18), lo que parece indicar que estas dos mutaciones son suficientes para que el virus se escape eficientemente de la acción de amiR-D en una línea moderadamente resistente. Es interesante destacar que al igual que se había observado en el pase de una planta silvestre infectada con una especie viral con las mutaciones G9294A, G9300A a otra planta silvestre (Fig. III.16), A9300 no resultaba estable cuando la especie viral con las mutaciones G9300A, A9311G de una planta D 11 se pasaba a plantas silvestres, en dos de tres de las cuales revertía total o parcialmente a G9300 (Fig. III.18). Este resultado refuerza la idea de que la mutación G9300A tiene un coste de eficacia biológica, probablemente debido al cambio de alanina a treonina que causa.

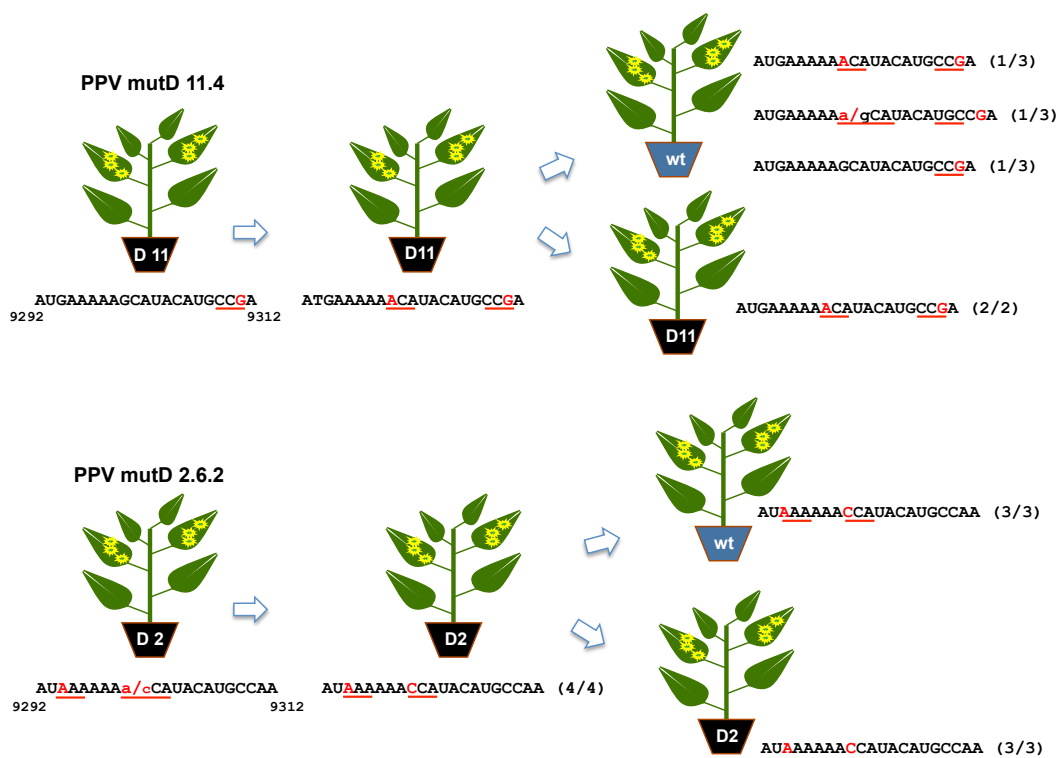


Figura III.18. Evolución de poblaciones virales generadas en plantas de *N. benthamiana* transgénicas que expresan amiR-D (ver Fig. III.7) cuando se propagan en plantas de la misma línea en que se generaron y en plantas silvestres (wt). Los pases entre las plantas indicadas se realizaron por inoculación manual con extractos de hojas infectadas sistémicamente recogidas a los 22 dpi. Las progenies virales producto de los pases se analizaron por IC-RT-PCR y secuenciación en hojas infectadas sistémicamente recogidas a 25 dpi. Entre paréntesis se muestra el número de plantas analizadas que presenta la secuencia de la diana de amiR-D indicada / número total de plantas analizadas; se resaltan en rojo los cambios con respecto a la secuencia del virus silvestre y se subrayan los codones afectados por estas mutaciones.

En contraste con el pase de la progenie viral de la planta D 2.6.2 a plantas silvestres en el que se rescataban especies con las dobles mutaciones G9294A, G9300A y G9294A, G9300C (mayoritaria y minoritaria, respectivamente en D 2.6.2), en las cuatro plantas D 2.6.x inoculadas con el extracto de D 2.6.2 solo se detectó la especie con la doble mutación G9294A, G9300C (Fig. III.19). En un pase posterior de estas plantas a nuevas plantas D 2.6.x o silvestres seguía detectándose exclusivamente esa variante viral, que ya se había mostrado estable en los dos pases en plantas silvestres descritos en la sección anterior (Fig. III.16). Estos datos sugieren que la mutación G9300C (causante de un cambio de alanina a prolina) no solo tenía un coste en eficacia biológico menor que el de la mutación G9300A, sino que también era más eficaz para propiciar el escape de la acción antiviral de amiR-D. En este escenario, la mayor acumulación de la especie G9294A, G9300A en la infección inicial de la planta D 2.6.2 (Fig. III.7) se debería a que la transición de G a A puede tener lugar con mayor facilidad que la transversión de G a C.

Con objeto de investigar la evolución de una población más compleja, se inocularon seis plantas de la generación F1 de la línea amiR-Di 6 con el extracto de la planta infectada Di 6.3 y se analizaron sus poblaciones virales por secuenciación de amplicones MiSeq (Fig. III.17). La primera observación destacable es que, aunque en general se produjo una disminución de la acumulación de virus silvestre, éste seguía siendo detectable en todas las plantas inoculadas, sugiriendo que la resistencia antiviral derivada de la expresión de amiR-Di puede no ser suficiente para la extinción del virus contra el que va dirigida. Una segunda observación interesante es que el número de especies virales con un número de lecturas por encima del ruido de fondo había descendido en las poblaciones virales de todas las plantas con respecto al de la población de la planta usada como inóculo. Esto es especialmente llamativo en las plantas Di 6.9 y Di 6.10, sobre todo en esta última, en la que la inmensa mayoría de las lecturas correspondían a una única especie viral mutada. Aun así, hay que reconocer que en alguna de las plantas se mantiene una alta variedad de especies virales, siendo su máximo exponente la planta Di 6.8, que acumulaba cuatro especies virales mayoritarias, cada una con más del 10% de las lecturas totales.

A diferencia de lo observado en el pase a plantas que no expresan amiRNAs, en que la especie con la mutación A9299G, la mayoritaria en la inoculación inicial de líneas amiR-Di (Fig. III.13 A), perdía relevancia, en tres de las plantas Di 6 inoculadas

con la población viral de la planta Di 6.3, la secuencia con mayor número de lecturas MiSeq era la que tenía una G en la posición 9299 (Fig. III.17), lo que parece confirmar la alta eficacia de la mutación A9299G para facilitar el escape de la acción antiviral de amiR-Di. En otra de las plantas inoculadas en este pase, Di 6.7, la especie mayoritaria, a gran distancia de la siguiente, es la que tiene la mutación G9294A, que ya era la mayoritaria, aunque con mucha menor preponderancia, en la planta Di 6.3 usada como inóculo. Este resultado está de acuerdo con la conclusión propuesta más arriba de que esta mutación es eficiente para facilitar en el escape de la acción de amiR-Di, aunque probablemente tenga cierto coste de reducción de eficacia biológica. La presencia como especie viral casi exclusiva en la planta Di 6.10 de la mutación G9300U, la que se imponía preferentemente en plantas que no expresan amiRNAs, sugiere que la mayor eficacia biológica de la especie viral puede ser también relevante en la competición que tiene lugar bajo la presión selectiva de amiR-Di. Llama la atención que en la planta Di 6.5 la especie viral mayoritaria era la que tenía la mutación A9302G, una especie que solo era la quinta en abundancia en el inóculo Di 6.3 y que solo se había identificado, y con muy pocas lecturas, en tres plantas de otras líneas amiR-Di (Fig. III.13 A). El fuerte enriquecimiento de esta especie viral en la planta Di 6.5, mientras que resulta indetectable en otras tres plantas infectadas con el mismo inóculo, sugiere una contribución significativa de la deriva genética en la evolución de la población viral generada bajo la presión selectiva impuesta por la expresión de amiRNAs.

Como en las poblaciones virales de las plantas de las diferentes líneas amiR-Di infectadas inicialmente, en las generadas por el pase entre plantas Di 6 seguían manteniéndose como mayoritarias especies virales con una sola mutación (Fig. III.17). Pero en este caso algunas de las especies con dos mutaciones se acumulaban a niveles muy altos, especialmente las que tenían las mutaciones A9298G, G9300A y C9301U, A9302U, que eran las segundas especies más abundantes en las plantas Di 6.6 y Di 6.9, respectivamente. Este resultado es indicativo de que, aunque una sola mutación es suficiente para escapar de la débil acción antiviral de amiR-Di, una segunda mutación en la diana del amiRNA facilita, al igual que en el caso de amiR-D, la infección.

El conjunto de los resultados sugiere que las presiones selectivas para escapar de la acción del amiRNA y para conservar la función de la proteína afectada, junto con la deriva genética, favorecen que la diversidad generada en las plantas que expresan

amiRNAs pueda proseguir expandiéndose a nivel global en países sucesivos, a pesar de que la complejidad de la población viral de cada planta individual pueda reducirse.

### **III.4.3 Las mutaciones seleccionadas en líneas amiR-D poco resistentes pueden facilitar la infección por PPV de líneas transformadas con el mismo amiRNA con resistencia fuerte**

Como se ha mencionado en capítulos anteriores, la línea amiR-D 7 mostraba una fuerte resistencia a la infección, de manera que ninguna planta de esta línea inoculada con PPV silvestre había resultado infectada (Tablas III.1 y III.2). Con objeto de averiguar si la adaptación a una planta que expresa amiR-D poco resistente le ayuda a superar resistencias más fuertes conferidas por el mismo amiRNA, se inocularon plantas de la generación F1 de la línea amiR-D 7 con extractos de plantas infectadas de las líneas amiR-D 2 y amiR-D 11.

En la sección III.4.2 he mostrado cómo el pase de la progenie viral de las plantas D 11.4 y D 2.6.2 en plantas de sus mismas líneas, daba lugar a la acumulación de una especie viral con una mutación adicional en el caso de las plantas D 11 (G9300A además de A9311G), y de una especie minoritaria en la inicialmente infectada (con las mutaciones G9294A y G9300C) en el caso de plantas de la línea D 2. Cuando el producto de este primer pase se utilizó para uno ulterior, las plantas amiR-D 7 se infectaron de manera similar a las de la línea del inóculo (amiR-D 11 o amiR-D 2) y a las plantas de *N. benthamiana* silvestre. El análisis por IC-RT-PCR y secuenciación de las poblaciones virales de las plantas D 7 infectadas en este segundo pase, mostró que se mantenían las mutaciones del inóculo inicial, sin que se observara la aparición de ninguna mutación adicional (Fig. III.19). Este resultado indica que las mutaciones seleccionadas bajo la presión selectiva de la resistencia débil de las líneas amiR-D 2 y amiR-D 11 le permiten al virus un escape eficiente de una actividad antiviral del amiRNA más enérgica.

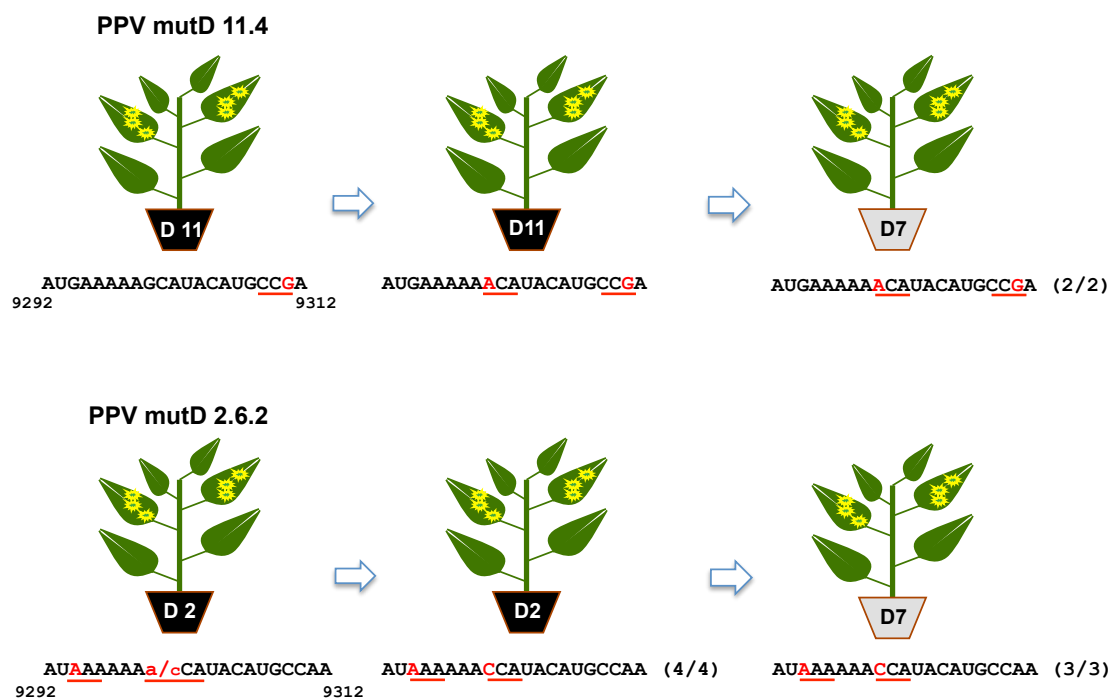


Figura III.19. Evolución de poblaciones virales generadas en plantas de *N. benthamiana* transgénicas que expresan amiR-D (ver Fig. III.7) cuando se propagan en diferentes líneas transformadas por la misma construcción. Los pases entre las plantas indicadas se realizaron por inoculación manual con extractos de hojas infectadas sistémicamente recogidas a los 22 dpi. Las progenies virales producto de los pases se analizaron por IC-RT-PCR y secuenciación en hojas infectadas sistémicamente recogidas a 25 dpi. Entre paréntesis se muestra el número de plantas analizadas que presenta la secuencia de la diana de amiR-D indicada / número total de plantas analizadas; se resaltan en rojo los cambios con respecto a la secuencia del virus silvestre y se subrayan los codones afectados por estas mutaciones.

### III.5. Pequeños cambios en la diana elegida pueden mejorar la eficacia de las acciones antivirales mediadas por amiRNAs

Como se describió en los capítulos I y II, la expresión en plantas transgénicas del amiR-H, cuya diana se encuentra localizada en la región 3' no traducida del genoma del PPV, tiene un leve efecto deletéreo contra el virus, pero no llega a conferir un nivel de protección significativo. Por ello, nos planteamos estudiar si pequeñas modificaciones en el amiR-H encaminadas a dirigirlo a una diana muy cercana a la original, podía incrementar la eficacia de la actividad antiviral. Un esquema de las nuevas construcciones se muestra en la Figura III.20. Mientras que se supone que la banda estrella de amiR-H tiene en su extremo 5' un residuo U, el considerado más favorable para la carga en AGO1, el nucleótido 5' terminal de la banda madura predicha es A. Se decidió, por tanto, reemplazar esa A por una U, tratando de incrementar la abundancia de complejos efectores RISC cargados con el amiRNA antiviral. Al

amiRNA resultante se le denominó amiR-Hm. Es importante destacar que la mutación de amiR-Hm impide la hibridación exacta con el RNA genómico viral (Fig. III.20). Sin embargo, el único desapareamiento se encuentra fuera de la secuencia considerada como relevante para la eficiencia de corte (Axtell, 2013; Lin *et al.*, 2009; Mallory *et al.*, 2004). Los otros dos nuevos amiRNAs tienen ligeramente desplazadas sus dianas predichas en el RNA viral en un nucleótido por encima y 3 por debajo de la del amiR-H, por lo que se denominaron amiR-H<sub>-1</sub> y amiR-H<sub>+3</sub>. Las bandas maduras de estos dos amiRNAs tienen también una U en su extremo 5', por lo que es esperable que se carguen eficientemente en complejos RISC con AGO1, e hibridan a lo largo de toda su secuencia con el RNA viral (Fig. III.20). Otro aspecto a resaltar es el aumento de la estabilidad interna del extremo 5' de la banda madura y la disminución de la del de la banda estrella en el dúplex del amiR-H<sub>+3</sub>, lo que, según algunas hipótesis (Khvorova *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003), podría traducirse en menor facilidad de la carga en RISC de la banda madura y mayor de la de la banda estrella del nuevo amiRNA con respecto al amiR-H original.

Se transformaron plantas de *N. benthamiana* con las nuevas construcciones, y las líneas transgénicas generadas se enfrentaron al PPV, para establecer su susceptibilidad a la infección viral y las posibles estrategias evolutivas de escape del virus en las plantas infectadas.

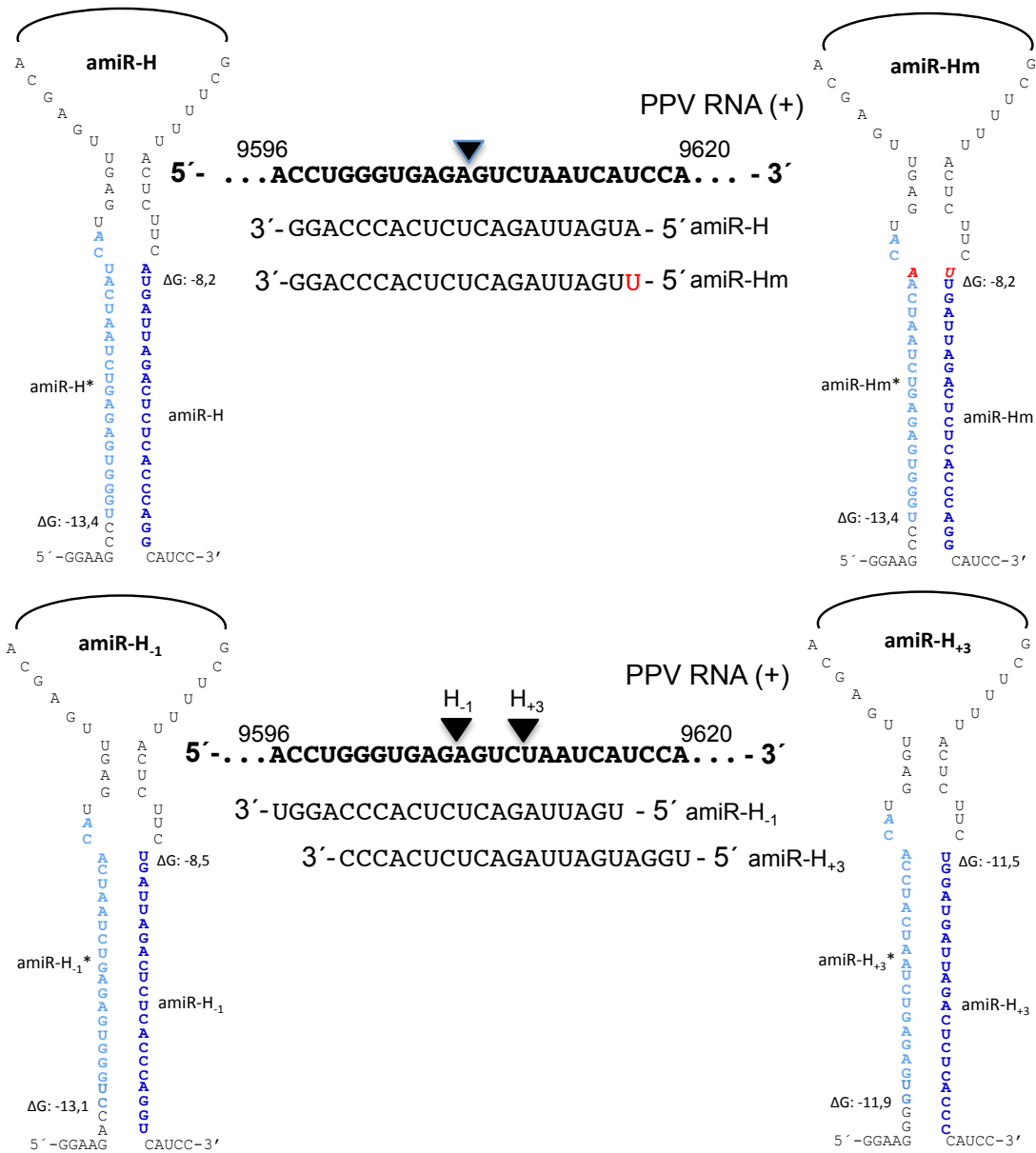


Figura III.20. Representación esquemática de los precursores de los distintos amiRNAs tipo H contruidos usando como molde el pre-miR159 de *A thaliana*. Se resalta la secuencia de los amiRNA maduro (azul oscuro) y amiRNA estrella (\* azul claro) predichos. La energía libre del dúplex en los extremos 5' de cada banda (kcal/mol) está calculada según Khvorova et al. (2003). También se muestran las dianas de los amiRNAs maduros en el RNA genómico, numerado según Laín *et al.* (1989), y se marcan con cabezas de flecha los sitios previstos de corte por el complejo RISC. El nucleótido en rojo en la secuencia de amiR-Hm corresponde al nucleótido mutado en el extremo 5' del amiRNA maduro para facilitar su carga en RISC.

### III.5.1 La plantas que expresan amiR-H<sub>3</sub> son más resistentes al PPV que las que expresan amiR-H, amiR-H<sub>1</sub> o amiR-Hm

Cuatro plantas de la generación F1 de cada una de las nuevas líneas transgénicas, así como cuatro plantas de la generación F2 de dos líneas de la construcción amiR-H previamente ensayadas y de una línea control transformada con el

vector vacío, se inocularon por agroinfiltración con pBIN-PPV-nk-GFP. A lo largo del experimento se realizó un primer seguimiento de la infección viral monitorizando con un microscopio de epifluorescencia la expresión de GFP en las hojas inoculadas y en las superiores. Los resultados se resumen en la Tabla III.5.

A los 7 días post inoculación fue posible detectar diseminación de GFP a partir del punto de inoculación en todas las plantas de las líneas transformadas con las construcciones amiR-H<sub>1</sub> y amiR-H<sub>m</sub>, de la misma forma que en las líneas control transformadas con amiR-H y con el vector vacío. Sin embargo, en la mayor parte de las plantas transformadas con alguna forma de amiR-H, el progreso de la infección parecía menor que el observado en las plantas transformadas con el vector vacío. Más importante, en algunas de las plantas transformadas con la construcción amiR-H<sub>+3</sub> (una planta de la línea H<sub>+3</sub> 4, dos de las líneas H<sub>+3</sub> 5 y 7, y las cuatro de la línea H<sub>+3</sub> 6) no se detectaron señales de GFP indicativas de progresión de infección viral desde el punto de inoculación.

En todas las plantas inoculadas, con la excepción de tres plantas de la línea amiR-H<sub>+3</sub> 6, se observó expresión de GFP en hojas superiores a las inoculadas (Tabla III.5) y síntomas visuales de infección sistémica. Pero con la excepción de la línea original H 6 y de la H<sub>m</sub> 6, en al menos alguna de las plantas del resto de las líneas transformadas con una de las construcciones amiRNA la expresión sistémica de GFP era más leve y/o aparecía retrasada comparado con las plantas transformadas con el vector vacío. El retraso más notable lo mostró la única planta que se infectó de la línea amiR-H<sub>+3</sub> 6 y las cuatro de la línea amiR-H<sub>+3</sub> 4.

Con objeto de disponer de datos más cuantitativos acerca del progreso de la infección viral, se evaluó la acumulación de virus por análisis de Western blot con un anticuerpo específico de la CP del PPV en algunas líneas seleccionadas (Fig. III.21). Se analizó la acumulación local y no la sistémica, porque en esta última, la emergencia de variantes virales con mutaciones que faciliten el escape de la acción del amiRNA podría oscurecer la interpretación del resultado.

La menor acumulación de virus en las plantas de la línea H 8 en comparación con las de la línea control V 1 (Fig. III.21 A) está de acuerdo con la idea de que la expresión del amiR-H original es capaz de proporcionar una cierta protección frente a la infección del PPV. Usando como referencia la línea H 8, no se observaron reducciones notables en los niveles de acumulación viral en las nuevas líneas transgénicas H<sub>m</sub> 7,



Hm 10, y H<sub>-1</sub> 7 (Fig. III.21 C y D). En el caso de la línea H<sub>-1</sub> 9 sí que se observó una cierta disminución en la carga viral, sobre todo en una de las plantas, sin embargo, considerando todos los valores, las diferencias no eran significativas (Fig. III.21 C). Parece, por tanto, que la protección antiviral conferida por las variantes amiR-Hm y amiR-H<sub>-1</sub> es baja, similar a la conferida por amiR-H. Por el contrario, en las tres líneas transgénicas H<sub>+3</sub>, sobre todo en la H<sub>+3</sub> 6, los niveles de acumulación viral eran considerablemente inferiores que los que presentaban el resto de las líneas (Fig. III.21 A y B), confirmando el mayor poder protector de amiR-H<sub>+3</sub>.

Tabla III.5. Susceptibilidad frente al PPV de líneas transgénicas que expresan diferentes amiRNAs del tipo H.

|                                | Infección            |                           |
|--------------------------------|----------------------|---------------------------|
|                                | Local (7 dpi)        | Sistémica                 |
| Hm 3 <sup>a</sup>              | 4/4 (+) <sup>c</sup> | 4/4 (9 dpi) <sup>d</sup>  |
| Hm 6                           | 4/4 (++)             | 4/4 (9 dpi)               |
| Hm 7                           | 4/4 (+)              | 4/4 (9 dpi)               |
| Hm 10                          | 2/4 (+), 2/4 (++)    | 4/4 (9 dpi)               |
| H <sub>+3</sub> 4 <sup>a</sup> | 3/4 (+)              | 4/4 (14 dpi) <sup>e</sup> |
| H <sub>+3</sub> 5              | 2/4 (+)              | 4/4 (10 dpi) <sup>e</sup> |
| H <sub>+3</sub> 6              | 0/4                  | 1/4 (14 dpi) <sup>e</sup> |
| H <sub>+3</sub> 7              | 2/4 (+)              | 4/4 (10 dpi) <sup>e</sup> |
| H <sub>-1</sub> 7 <sup>a</sup> | 4/4 (+)              | 4/4 (10 dpi) <sup>e</sup> |
| H <sub>-1</sub> 9              | 4/4 (+)              | 4/4 (10 dpi) <sup>e</sup> |
| H <sub>-1</sub> 12             | 4/4 (+)              | 4/4 (10 dpi) <sup>e</sup> |
| H <sub>-1</sub> 13             | 4/4 (+)              | 4/4 (10 dpi) <sup>e</sup> |
| H 6.6 <sup>b</sup>             | 4/4 (+)              | 4/4 (9 dpi)               |
| H 8.7                          | 1/4 (+), 3/4 (++)    | 4/4 (9 dpi)               |
| V 1.6 <sup>b</sup>             | 4/4 (+)              | 4/4 (7 dpi)               |

<sup>a</sup> Líneas transgénicas cuyas plantas F1 fueron analizadas. <sup>b</sup> Plantas cuyas descendencias F2 fueron analizadas. <sup>c</sup> Número de plantas que muestran GFP a los 7 dpi/número de plantas inoculadas; el número de + indica el grado de progresión de la GFP. <sup>d</sup> Número de plantas que empezaron a mostrar signos de GFP al tiempo indicado/número de plantas inoculadas. <sup>e</sup> La expansión de la GFP fue menor en estas plantas que en las de las líneas control.

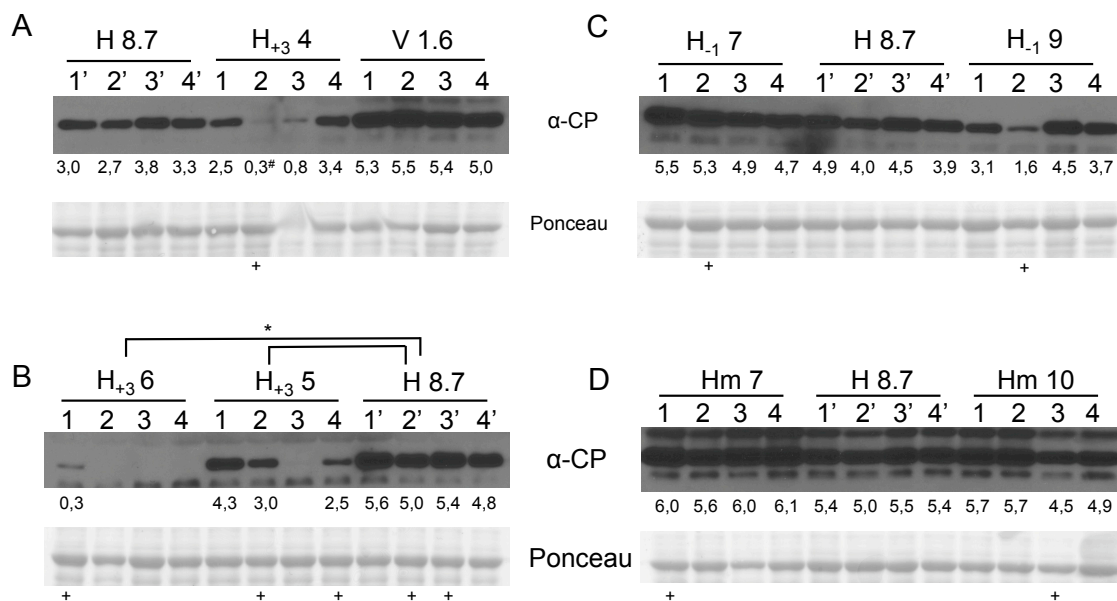


Figura III.21. Acumulación viral en plantas de las líneas de *N. benthamiana* transformadas con las construcciones de amiRNAs tipo H que se indican, inoculadas con PPV. Como controles se analizaron también plantas de una línea transformada con el vector vacío (V 1.6). **A-D**) Se analizaron por Western blot con anticuerpo contra la CP viral hojas inoculadas por agroinfiltración recogidas a 8 dpi. La densitometría de las bandas de inmunoreacción se realizó con el software de análisis Image Lab™, y los valores resultantes se indican debajo de cada carril. \* indica que las diferencias entre las muestras comparadas son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) según el test estadístico Mann-Whitney U two-tail. Las membranas teñidas con rojo Ponceau muestran la subunidad mayor de la RuBisCO como control de carga. Las plantas descendientes de H 8.7 se han designado como 1', 2', 3' y 4' para destacar que son diferentes de las analizadas en los experimentos iniciales acerca de la expresión de amiR-H descritos en los apartados III.1 y III.2. (#) indica que en la densitometría de este carril se descontó el fondo localmente debido a su especial intensidad; (+) indica las plantas posteriormente analizadas por IC-RT-PCR seguida de secuenciación.

### III.5.2 Las mutaciones que permiten al PPV escapar de la resistencia mediada por amiRNAs de la familia H afectan preferentemente a las mismas posiciones relativas de sus respectivas dianas.

En el capítulo 2 se mostró que, a pesar de que la resistencia causada por la expresión de amiR-H no era suficiente para impedir la infección del PPV, causaba una presión selectiva que facilitaba la aparición de especies virales con mutaciones en su secuencia diana. Con objetivo de verificar si la expresión de los nuevos amiRNAs derivados de amiR-H también provocan la emergencia de virus mutantes, y de estudiar el efecto de los cambios en la secuencia del amiRNA sobre las mutaciones del virus seleccionadas, se eligieron algunas de las plantas de las diferentes líneas transgénicas que habían resultado infectadas y se analizó, a partir de tejido infectado sistémicamente, su progenie viral por IC-RT-PCR y posterior secuenciación del producto resultante.

En las dos plantas de la línea amiR-H analizadas, se detectó la misma mutación

C9610U, que afecta a la posición 14 de la diana (8 del amiRNA maduro), predominante en los escapes virales de las diferentes líneas de la construcción amiR-H previamente analizadas (Fig. III.7 y Fig. III.22). En la progenie viral de dos plantas de la construcción amiR-Hm, cuya diana es la misma que la de amiR-H, (líneas Hm 7 y Hm 10) sólo se detectó virus silvestre, mientras que en una tercera planta de esta construcción (línea Hm 3) apareció una mutación, pero no afectaba a C9610, sino a U9614, que era reemplazado por una C. Este nucleótido está en la posición 18 de la diana (4 del amiRNA maduro). Curiosamente, mutaciones en nucleótidos diferentes, pero que ocupan la misma posición 18 en las dianas correspondientes, se produjeron en cuatro plantas, cada una de una línea transgénica distinta, de las construcciones amiR-H<sub>+3</sub> (U9617C) y amiR-H<sub>1</sub> (A9613C). La relevancia de las posiciones 14 y 18 de la diana se ve apoyada también por la emergencia de la mutación A9613G (posición 14), junto con una mutación U9614C, en una planta amiR-H<sub>+3</sub>, y la delección en una planta amiR-H<sub>1</sub> de una de las dos Aes (nucleótidos 9612 y 9613) que ocupan las posiciones 17 y 18 de su secuencia diana.

El hecho de que la mayoría de las mutaciones que se seleccionan bajo la presión ejercida por las diferentes formas de amiRNAs tipo H sean cambios puntuales, sugiere que, aunque las dianas de estos amiRNA estén en una región no codificante, desempeñan una función específica importante en la multiplicación del virus. Sin embargo, la selección en una planta amiR-H<sub>+3</sub> de una variante viral con una delección de 23 nucleótidos indica que las restricciones de secuencia impuestas por esta supuesta función no son excesivamente drásticas. Por otra parte, el que esta larga delección elimine los nucleótidos 10 a 21 de la diana del amiRNA, refuerza la visión de la importancia del apareamiento entre la región 3'-terminal de la diana con la 5'-terminal del amiRNA, para la actividad antiviral.

PPV RNA (+)

9593 9623

5' . . . UCUACCUGGGUGAGAGUCUAAUCAUCCAGUU . . . 3'

|   |                                    |
|---|------------------------------------|
| CCUGGGUGAGAGU <u>u</u> UAAUCAU          | H 1 p1 (33 dpi)                    |
| CCUGGGUGAGAGU <u>U</u> UAAUCAU          | H 2 p1 (33 dpi), H 6.6 p1 (20 dpi) |
| CCUGGGUGAGAG <u>cu</u> UAAUCAU          | H 6.6 p2 (20 dpi)                  |
| CCUGGGUGAG <u>c</u> GU <u>u</u> UAAUCAU | H 6 .8 p2, H 8.7 p2 (50 dpi)       |
| CCUGGGUGAGAGU <u>U</u> UAAUCAU          | H 8.7 p2'                          |
| CCUGGGUGAGAGU <u>u</u> UAAUCAU          | H 8.7 p3'                          |
| CCUGGGUGAGAGUCUAA <u>c</u> CAA          | Hm 3 p2                            |
| CCUGGGUGAGAGUCUAAUCA                    | Hm 7 p2                            |
| CCUGGGUGAGAGUCUAAUCA                    | Hm 10 p2                           |
| GGGUGAGAGUCUA <u>g</u> cCAUCCA          | H+3 4 p2                           |
| GGGUGAGAGUCUAAUCA <u>C</u> CCA          | H+3 5 p2                           |
| GGGUGAGAG-----AUUC                      | H+3 5 p4                           |
| GGGUGAGAGUCUAAUCA <u>C</u> CCA          | H+3 6 p1                           |
| ACCUGGGUGAGAGUCUA-UCA                   | H-1 7 p2                           |
| ACCUGGGUGAGAGUCUA <u>C</u> UCA          | H-1 9 p2                           |
| ACCUGGGUGAGAGUCUA <u>C</u> UCA          | H-1 12 p2                          |

Figura III.22. Especies virales detectadas en la progenie viral de plantas de *N. benthamiana* transgénicas que expresan diferentes amiRNAs del tipo H infectadas con el PPV. Las hojas infectadas sistémicamente de plantas individuales recogidas a 25 dpi se analizaron mediante IC-RT-PCR y secuenciación directa de la región amplificada. En la parte superior se muestra la secuencia del RNA genómico, numerado según Laín *et al.* (1989) donde se localizan las dianas de los amiRNAs. Los cambios respecto a la secuencia del virus silvestre se resaltan en rojo, en mayúsculas cuando la sustitución del nucleótido silvestre por el mutado es total y en minúsculas cuando coexisten la especie silvestre y la mutada. El signo – representa a nucleótidos delecionados.

### III.5.3 Mutaciones aparecidas baja la presión selectiva de un amiRNA H facilitan la infección en presencia de otro amiRNA de la misma familia con una diana cercana, pero no impiden la emergencia de variantes virales con mutaciones adicionales

En la sección anterior, he mostrado cómo la presión selectiva de amiR-H<sub>1</sub> y amiR-H<sub>+3</sub> da lugar a la emergencia de mutaciones en el PPV específicas de cada amiRNA. Para analizar el efecto que la mutación propiciada por uno de los amiRNAs H puede tener sobre la infección en presencia del otro, se eligieron las progenies virales de dos plantas que expresaban amiR-H<sub>+3</sub> y una que expresaba amiR-H<sub>-1</sub> (H<sub>+3</sub> 5 p4, H<sub>+3</sub> 6 p1 y H<sub>-1</sub> 9 p2, ver Tabla III.5 y Fig. III.22) para inocular entre 2 y 10 plantas transgénicas que expresan un amiRNA H distinto del expresado por su planta de origen (líneas H 8, H<sub>+3</sub> 5, H<sub>+3</sub> 6, H<sub>-1</sub> 7 y H<sub>-1</sub> 9) y de la línea transgénica control V 1. La progenie H<sub>+3</sub> 5 p4, en la que se había detectado una deleción de 23 nt que incluye el extremo 3' de las dianas de todos los amiRNAs H infectó eficientemente todas las plantas inoculadas y no

se observaron mutaciones adicionales ni en la progenie viral de una planta control V, ni en ninguna de las plantas de las líneas H, H<sub>-1</sub> y H<sub>+3</sub> analizadas (Fig. III.23). Este resultado refleja el amplio efecto protector de la larga delección seleccionada.

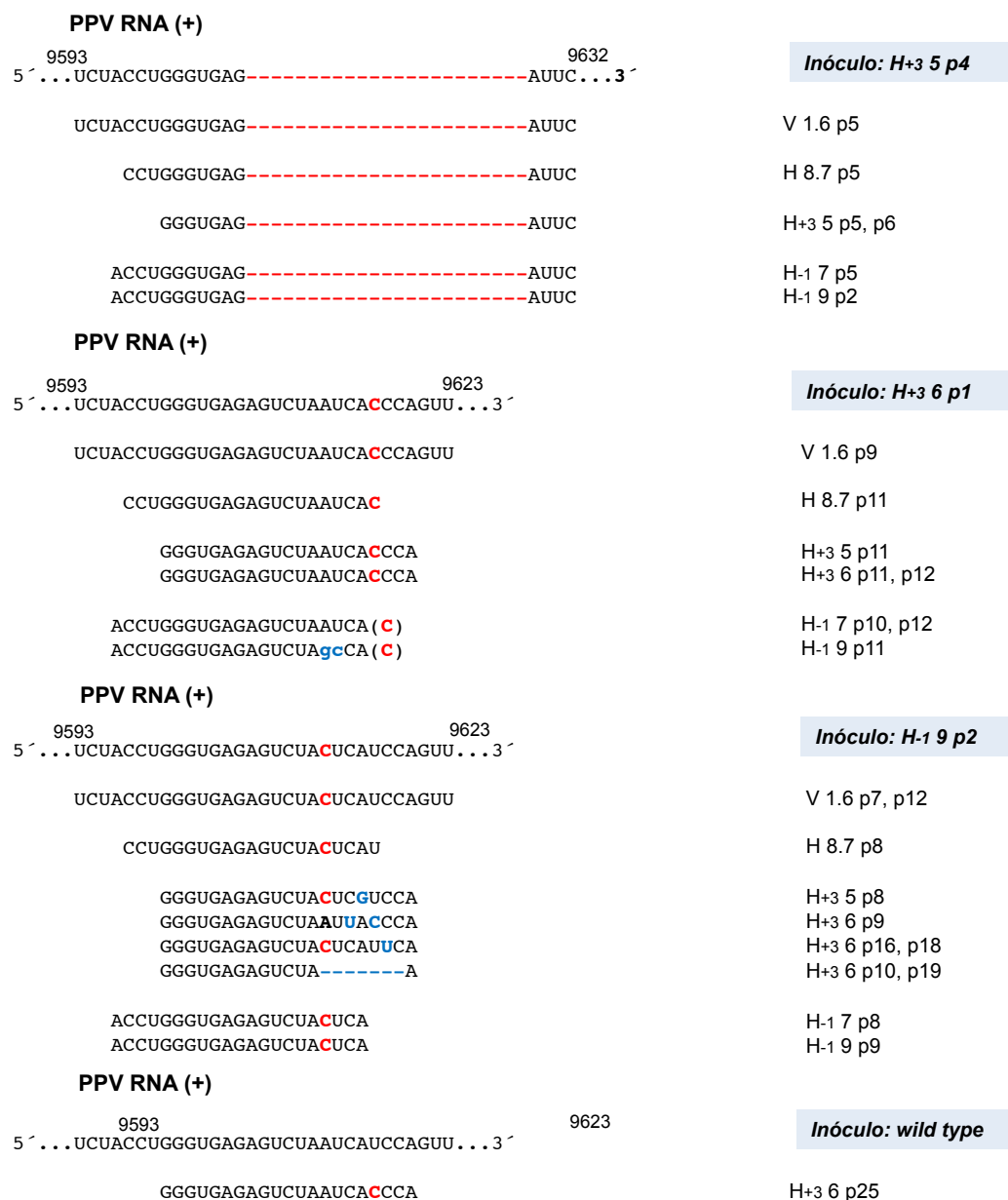


Figura III.23. Especies virales detectadas después de pases de la progenie viral generada en diferentes plantas que expresan amiRNAs del tipo H a otras plantas transformadas con el mismo tipo de construcciones o a plantas de una línea transformada con el vector vacío (V 1.6). Como control, también se analizó una planta de la línea H<sub>+3</sub> 6 inoculada con virus silvestre. En rojo y en negrita: mutaciones ya observadas en las plantas inicialmente infectadas; en azul y en negrita: mutaciones introducidas en la nueva infección; en negrita: reversiones a la secuencia del virus silvestre en la nueva infección.

La mutación seleccionada en la progenie H<sub>+3</sub> 6 p1 es un cambio puntual U9617C. También esta progenie infectó todas plantas inoculadas, aunque se observó

cierto retraso en el desarrollo de los síntomas en las de las líneas H<sub>1</sub> 7 y H<sub>1</sub> 9. A pesar de la ausencia de presión selectiva, la mutación U9617C se mantuvo estable en la planta de la línea V control que fue analizada. Aunque esta mutación afecta al nucleótido 3' terminal de la diana de amiR-H, una posición que se cree que no es muy relevante para la actividad de los miRNAs, y está fuera de la diana de amiR-H<sub>1</sub>, parece tener algún efecto sobre la acción antiviral de estos amiRNAs, ya que en tres plantas inoculadas con H<sub>+3</sub> 6 p1, una de la línea H 8 y dos de una línea H<sub>1</sub>, no se observaron nuevas mutaciones en sus progenies virales (Fig. III.23), en contraste con la emergencia de mutaciones generalizada que se observaba cuando plantas de estas líneas eran infectadas por el PPV silvestre (Fig. III.22). Sin embargo, la detección de mutaciones A9613G y U9614C, junto con U9617C, en una planta H<sub>1</sub> 9 inoculada con H<sub>+3</sub> 6 p1 (Fig. III.23) indica que la posible protección de U9617C sobre la acción de amiR-H<sub>1</sub> sería débil.

La tercera progenie inoculada fue la planta H<sub>1</sub> 9 p2, en la que se ha fijado la mutación A9613C. Esta mutación también se mantuvo estable en ausencia de presión selectiva en una planta control V inoculada con H<sub>1</sub> 9 p2. A9613C afecta a la posición 17 de la diana de amiR-H, por lo que es de esperar que afecte de manera notable a la actividad de este amiRNA. De acuerdo con esta presunción, H<sub>1</sub> 9 p2 infectaba eficientemente a las plantas H 8, y en la planta de esta línea que se analizó no se observó la emergencia de ninguna mutación adicional a A9613C.

El resultado más interesante se obtuvo en la inoculación de H<sub>1</sub> 9 p2 en las líneas que expresan amiR-H<sub>+3</sub>, especialmente en H<sub>+3</sub> 6, la que se había mostrado como más resistente en el ensayo anterior. En concordancia con dicho ensayo, solo una de las cinco plantas H<sub>+3</sub> 6 inoculadas con virus silvestre resultó infectada, y el virus acumulado en esta planta tenía la misma mutación U9617C que se había seleccionado en el primer experimento en dos plantas de esta línea (Fig. III.23). La mutación A9613C presente en la descendencia viral de la planta H<sub>1</sub> 9 p2 afecta a la posición 14 de la diana de amiR-H<sub>+3</sub>, una posición que se considera relevante para una interacción amiRNA-sustrato efectiva, y en la que se había detectado una mutación a G en una planta de la línea H<sub>+3</sub> 4 infectada con virus silvestre en el experimento anterior (Fig. III.22). No resulta, por tanto, sorprendente que la progenie H<sub>1</sub> 9 p2 infectara eficientemente tanto a las 3 plantas de la línea H<sub>+3</sub> 5 inoculadas, como a 9 de las 10 plantas inoculadas de la línea altamente resistente H<sub>+3</sub> 6. Sin embargo, el retraso en la infección sistémica que se observó en algunas de las plantas H<sub>+3</sub> 6 sugería que la protección proporcionada por la

mutación A9613C no era demasiado potente. De acuerdo con esta asunción, en las seis plantas de las líneas H<sub>+3</sub> 5 y H<sub>+3</sub> 6 analizadas se observaron nuevas mutaciones afectando a la diana de amiR-H<sub>+3</sub> (Fig. III.23). En tres de las plantas se mantuvo la mutación original A9613C, en la posición 14 de la diana de amiR-H<sub>+3</sub>, pero apareció una segunda mutación en la posición 17 (A9616G) o 19 (C9618U). En otras dos plantas se seleccionó una variante viral con una deleción que abarcaba desde la posición 14 de la diana amiR-H<sub>+3</sub>, donde estaba la mutación inicial de H<sub>-1</sub> 9 p2, hasta la posición 20. Curiosamente, en una de las plantas H<sub>+3</sub> 6 no se detectó la mutación inicial del inóculo (A9613C); a cambio, el virus acumulado en esta planta presentaba las mutaciones C9615U y U9617C (posiciones 16 y 18 de la diana de amiR-H<sub>+3</sub>). Este resultado apoya la idea de que la mutación A9613C, seleccionada bajo la presión selectiva de amiR-H<sub>-1</sub>, ayuda a infectar a PPV en presencia de amiR-H<sub>+3</sub>, pero otras mutaciones en la diana de este amiRNA son más efectivas para el escape del virus de su actividad antiviral.

#### **III.5.4 El nivel de expresión de amiRNA-H<sub>+3</sub> se correlaciona positivamente con la resistencia antiviral**

Dado que las diferentes líneas transgénicas transformadas con construcciones de amiRNAs del tipo H mostraban diferentes niveles de resistencia, nos planteamos averiguar la posible contribución de diferencias en los niveles de expresión de los amiRNAs a las diferencias en el grado de protección.

Con este objetivo se analizaron por RT-qPCR dos mezclas de 4 plantas de dos líneas de las construcciones amiR-H<sub>m</sub>, amiR-H<sub>+3</sub> y amiR-H<sub>-1</sub> y una línea de la construcción amiR-H inicial (Fig. III.24). Se usaron oligonucleótidos específicos para la amplificación de las bandas madura y estrella esperadas y se usó como referencia el RNA 5.8 S.

Aunque, como en los experimentos para evaluar la acumulación de amiR-D descritos en la sección III.1.2, la carencia de curvas patrón impide realizar una cuantificación absoluta, así como comparaciones rigurosas de los niveles de acumulación de RNAs amplificados con parejas de oligonucleótidos distintos, los bajos valores de ciclo umbral (Ct) de todas las muestras amiR-H<sub>m</sub>, amiR-H<sub>+3</sub> y amiR-H<sub>-1</sub>, notablemente inferiores a los del RNA 5.8 S control, sugieren que tanto las bandas maduras como las estrella de estos amiRNAs se acumulan a niveles considerables. Por otra parte, la comparación de los valores de Ct parece también indicar que los niveles de

acumulación de las bandas maduras son superiores en todos los casos a los de las bandas estrella. Sin embargo, no se observan valores inferiores de Ct para las plantas que expresan amiR-H<sub>+3</sub>, lo que sugiere que la mayor resistencia conferida por este amiRNA se debe a factores intrínsecos de la construcción más que a niveles más elevados de expresión.

Lo que sí permite nuestro experimento es comparar de manera rigurosa los niveles de acumulación de amiRNA de líneas de la misma construcción. No se observaron diferencias reproducibles en la expresión de ninguna de las dos hebras del amiRNA entre las líneas Hm 7 y 10 (Fig. III.24 A y B). Las diferencias entre las líneas H<sub>-1</sub> 7 y H<sub>-1</sub> 9 parecían más consistentes, y los mayores valores promedio de la línea H<sub>-1</sub> 9 podrían estar de acuerdo con la ligera mayor resistencia que parecía apreciarse en las plantas de esta línea (Fig. III.21 y Fig. III.24 A y B)

En cualquier caso, el resultado más atrayente del experimento de cuantificación nos lo ofrecen las líneas de la construcción H<sub>+3</sub>. Los niveles de acumulación de banda madura (Fig. III.24 A) y estrella (Fig. III.24 B) de la línea H<sub>+3</sub> 6 eran aproximadamente 2.8 y 2.3 veces, respectivamente, mayores que los de la línea H<sub>+3</sub> 5, lo que sugiere que la especial resistencia de la línea H<sub>+3</sub> 6 se debe a que en ella se juntan las peculiaridades particulares de la construcción H<sub>+3</sub> con unos altos niveles de expresión.

Finalmente, el resultado de la línea H 8 se puede considerar como anómalo. Los valores de Ct de las bandas madura y estrella de su amiRNA superaban en más de 10 ciclos a los del resto de las líneas, mientras que los valores de Ct del RNA 5.8S control eran similares en todos los casos. Si bien no se puede descartar que los niveles de acumulación de amiR-H de la línea H 8 sean mucho bajos que los otros amiRNAs tipo H, el hecho de que los análisis por Northern blot mostrados en la sección III.1.1 revelen niveles de amiR-H similares a los de amiR-C y amiR-D (Figs. III.2, III.3 y III.5) hacen que esta explicación sea muy improbable. Parece más plausible algún tipo de causa artefactual. Una posibilidad interesante es que el pre-amiRNA H no se esté procesando exactamente en el sitio predicho. Un desplazamiento en el sitio preferente de procesamiento de un nucleótido daría lugar a niveles de acumulación muy bajos de las bandas de amiRNA amplificables con los iniciadores empleados, mientras que las bandas mayoritarias no se amplificarían con estos iniciadores.



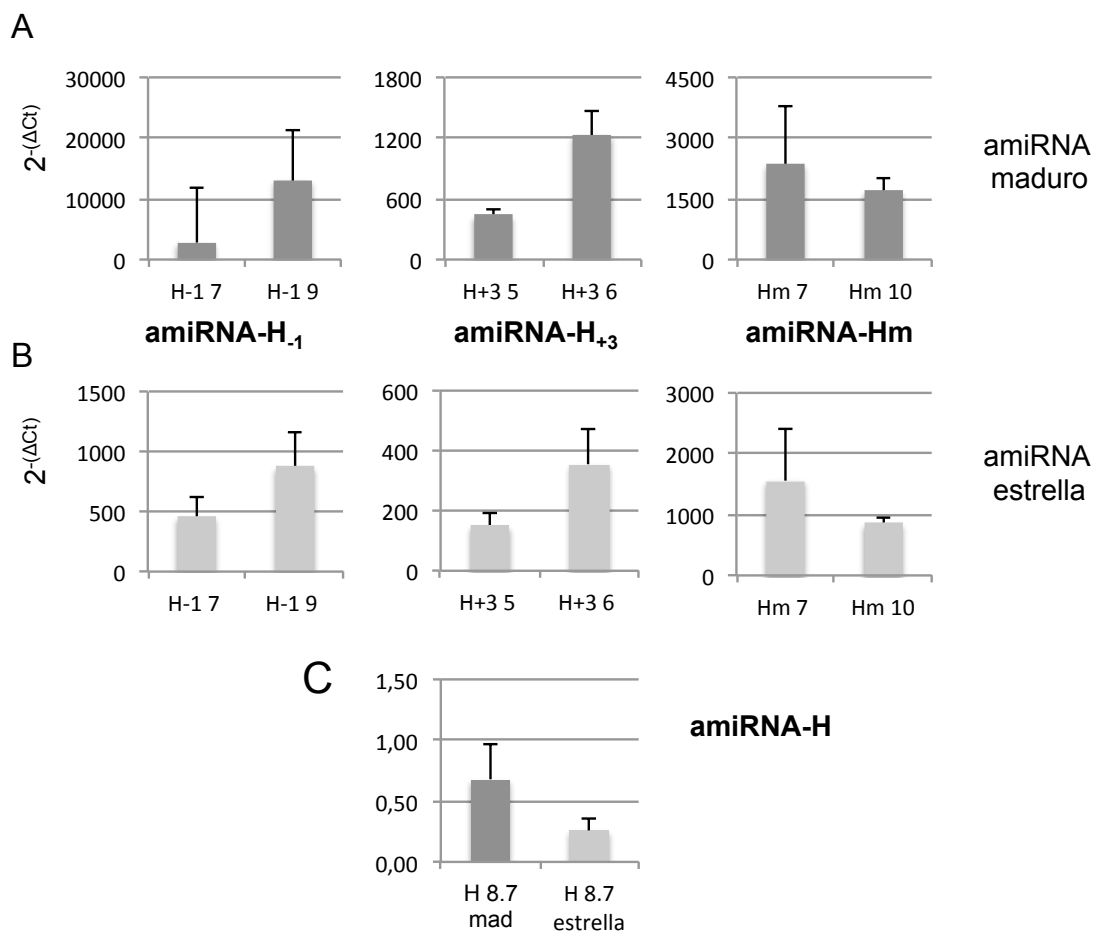


Figura III.24. Acumulación de amiRNAs de tipo H en diferentes líneas de *N. benthamiana* transgénicas, estimada por RT-qPCR. Como iniciadores para la amplificación de los diferentes amiRNA maduros y de sus bandas estrella se usaron las siguientes parejas de oligodeoxinucleótidos: (A, amiRNAs maduros): #3114/#3115 (amiR-H<sub>-1</sub>), #3118/#3119 (amiRNA-H<sub>+3</sub>), #3110/#3111 (amiRNA-Hm); (B, hebras estrella): #3116/#3117 (amiR-H<sub>-1</sub>), #3120/#3121 (amiRNA-H<sub>+3</sub>), #3112/#3113 (amiRNA-Hm); (C): #3106/#3107 (amiR-H maduro), #3108/#3109 (amiR-H estrella). Se realizaron tres réplicas técnicas de dos muestras independientes de RNA de pequeño tamaño, cada una obtenida a partir de hojas jóvenes de dos plantas de la generación F2 descendiente de las indicadas. Las barras representan la media de los valores de diferencia de ciclo umbral con referencia al gen 5.8 S ribosomal (iniciadores #2730; #2731) expresados como potencia de 2. La barra de error indica el valor más alto de las dos muestras.

### III.6 La resistencia frente al PPV causada por amiRNAs puede resultar eficiente en *P. domestica*

Todos los resultados expuestos hasta ahora en esta tesis se refieren a la expresión de amiRNAs en *N. benthamiana* y a la resistencia antiviral que causan en este huésped experimental del PPV. Resulta evidente el interés que puede tener extenderlos a plantas del género *Prunus*, los huéspedes naturales del PPV, tanto por el valor científico de comparar la acción de los amiRNAs en especies de plantas muy diferentes, como por el potencial socioeconómico de proteger a los cultivos frutales de la

devastadora enfermedad de la sharka. Para abordar este objetivo establecimos una colaboración con el grupo de Lorenzo Burgos (CEBAS-CSIC, Murcia), que se ha encargado de transformar plantas de *P. domestica* de las variedades Claudia Verde (CV) y Stanley (ST) con la construcción amiR-C+D, previamente transferida a un vector adecuado para la transformación de especies del género *Prunus*. Se han obtenido de momento 4 líneas CV y una ST y se han realizado experimentos preliminares para determinar su susceptibilidad a la infección por el PPV. Este trabajo se ha visto complicado por la dificultad de obtener un número de réplicas adecuado de cada línea y de aplicar a plántulas de *P. domestica* los sistemas de inoculación empleados habitualmente en nuestro laboratorio para especies herbáceas, por lo que los resultados obtenidos son aún preliminares.

### **III.6.1 Algunas líneas de *P. domestica* transformadas con la construcción amiR-C+D presentan resistencia frente al PPV**

Los dos sistemas de inoculación del PPV más eficientes que se emplean en nuestro laboratorio son el bombardeo de microproyectiles y la agroinoculación. En experimentos de prueba de infección de plántulas de *P. domestica* se obtuvieron resultados más consistentes empleando el sistema de agroinoculación, por lo que éste fue el empleado para analizar la susceptibilidad a la infección de las plantas transformadas con la construcción amiR-C+D. Como inóculo se utilizó pSN-PPV5'BD-GFP, que da lugar a una infección cuyo seguimiento se ve facilitado por la expresión del gen marcador GFP. En un primer experimento se analizaron plantas de dos líneas CV y una ST. Dado que la fluorescencia de la GFP se puede confundir con la del tejido dañado por la agroinoculación, la valoración de la infección local se realizó directamente por la inmunodetección de CP por Western blot (Fig. III.25 A). Se detectó abundante acumulación en la hoja analizada de una de las dos plantas de *P. domestica* variedad Brompton silvestre que se usaron como control y en las de cuatro plantas transgénicas de la línea CV-2. También se detectó acumulación de CP, aunque en muy baja cantidad en una hoja agroinfiltrada de una de las cuatro plantas analizadas de la línea ST-1. No se detectó acumulación local de CP en ninguna de las tres plantas inoculadas de la línea CV-1. A nivel sistémico solo se detectó fluorescencia de GFP y acumulación de CP en Western blot en las cuatro plantas de la línea CV-2 y en las dos plantas silvestres control (Fig. III.25 A). El análisis por IC-RT-PCR y secuenciación de

la población viral de dos de las plantas CV-2 infectadas no reveló ninguna mutación en las dianas de amiR-C y amiR-D. Estos resultados, mientras que demuestran que la línea CV-2 se mantiene susceptible al PPV, sugieren que la expresión de amiR-C y amiR-D puede proporcionar una protección eficiente frente a este virus en las líneas CV-1 y ST-1.

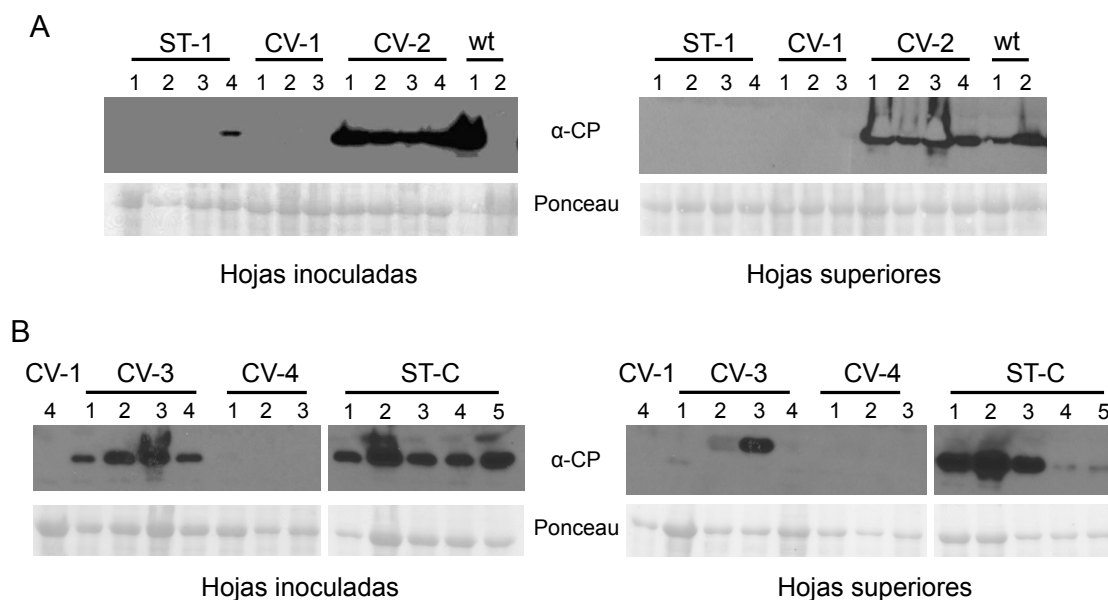


Figura III.25. Acumulación viral en plantas de las líneas de *P. domestica* variedades Stanley (ST) y Claudia Verde (CV) transformadas con la construcción que se indican, inoculadas con PPV-5'BD-GFP. Como controles se analizaron también plantas de *P. domestica* variedad Brompton silvestres (wt) y de una línea transformada con el vector vacío (ST-C). Se presentan los resultados de dos experimentos independientes (**A** y **B**). Se analizaron por Western blot con anticuerpo contra la CP viral hojas inoculadas por agroinfiltración recogidas a 15 dpi o superiores a las inoculadas, recogidas a 22 (**A**) o 23 (**B**) dpi. Las membranas teñidas con rojo Ponceau muestran la subunidad mayor de la RuBisCO como control de carga.

En un segundo experimento, se analizaron otras dos líneas transgénicas de la variedad Claudia Verde y se llevó como control una línea de la variedad Stanley transformada con el vector vacío. A nivel local se observó abundante acumulación de CP en las cinco plantas ST-C control y las cuatro de la línea CV-3, mientras que no se detectaron signos de infección local en ninguna de las tres plantas de la línea CV-4 analizadas (Fig. III.25 B). Solo en tres de las plantas control ST-C y en una de la línea CV-3 se observaron altos niveles de fluorescencia de GFP y acumulación de CP sistémicos (Fig. III.25 B). En las hojas superiores a las inoculadas de las dos plantas SC-T restantes y en una segunda planta CV-3 se observaron algunos pequeños focos de fluorescencia de GFP, que se acompañaban por una débil señal de CP en el ensayo de Western blot. El análisis por IC-RT-PCR y secuenciación, confirmó la presencia de

virus en las dos plantas CV-3 con una señal detectable en el Western blot y verificó la ausencia de mutaciones en las dianas de los amiRNAs C y D. También se analizó una nueva planta de la línea CV-1, que al igual que las analizadas inicialmente, no resultó infectada (Fig. III.25 B). Así pues, los resultados del segundo experimento sugieren que la línea CV-4 podría asemejarse a la CV-1 y ST-1 y presentar una resistencia notable a la infección por PPV, y demuestran que, por el contrario, la línea CV3, al igual que la CV-2, carece de una protección eficiente.

### **III.6.2 La resistencia frente al PPV en líneas de *P. domestica* transformadas con la construcción amiR-C+D se correlaciona con un mayor nivel de acumulación de, al menos, amiR-C**

Como un primer paso para determinar la causa de la diferente susceptibilidad a la infección por el PPV de las líneas de *P. domestica* transformadas con la construcción amiR-C+D, se verificó por PCR que todas ellas habían integrado la secuencia codificante del pre-miRNA completa. A continuación se realizó una primera estimación de la expresión del transgén en las diferentes líneas transgénicas analizando la acumulación de amiR-C y amiR-D maduro y estrella por Northern blot. Para este experimento se seleccionaron las líneas CV-1 y ST-1 como posibles resistentes y la CV-3 como susceptible. Se analizaron individualmente dos plantas de cada línea que no habían sido inoculadas previamente. Al igual que en las plantas de *N. benthamiana* transformadas con la construcción amiR-C+D resistentes al PPV, en las plantas de la línea CV-1 se observó una acumulación apreciable de amiR-C maduro y estrella, pero, al contrario de lo observado para las plantas de *N. benthamiana*, no se detectó acumulación de amiR-D (comparar Fig. III.4 y Fig. III.26). En la otra variedad de *P. domestica* potencialmente resistente, ST-1, se notó una acumulación casi imperceptible de amiR-C maduro, pero no se detectó ni amiR-C estrella ni ninguna de las dos formas de amiR-D. Finalmente, en las plantas de la línea susceptible CV-3 no se observó acumulación de ninguna forma de amiRNA-C.

Obviamente se necesitan cuantificaciones más sensibles y precisas para sacar conclusiones definitivas, pero los resultados del Northern sugieren que la expresión de los amiRNAs en las líneas transgénicas de *P. domestica* no es muy alta, y que se necesita un cierto nivel de acumulación de al menos un amiRNA para conseguir un grado de resistencia sustancial.

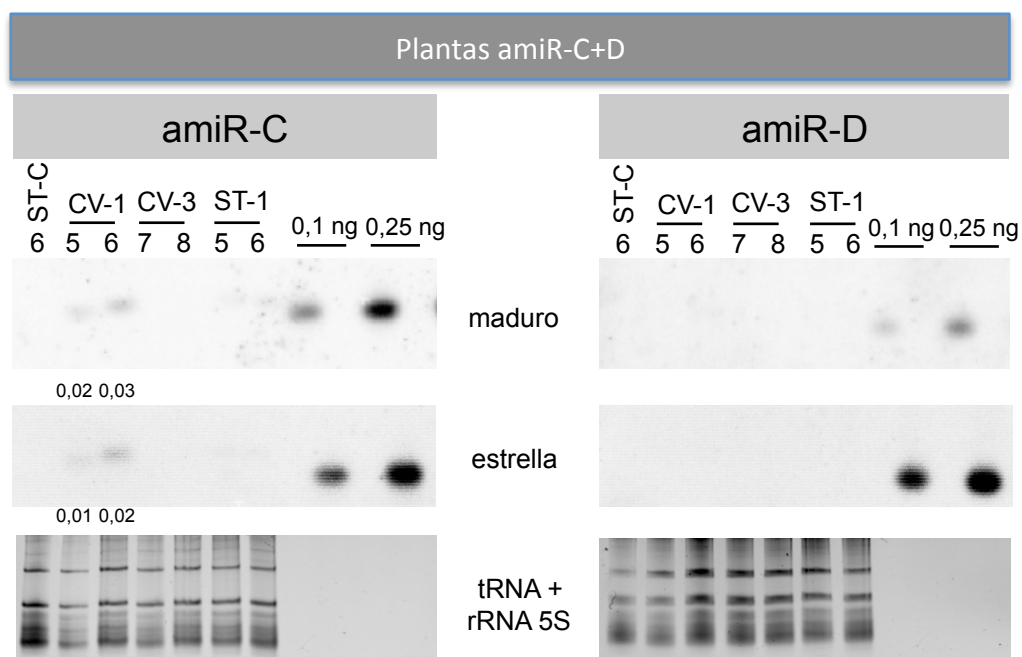


Figura III.26. Acumulación de los amiR-C y amiR-D en diferentes líneas de *P. domestica* transformadas con la construcción amiR-C+D estimada por análisis de Northern blot. Se analizaron hojas jóvenes de dos plantas no inoculadas (5  $\mu$ g de una preparación de RNAs de pequeño tamaño) de cada línea transgénica. Como control negativo se cargaron 5  $\mu$ g de una preparación de RNAs de pequeño tamaño de una planta transformada con vector vacío (ST-C). La membrana fue incubada con oligodeoxinucleótidos complementarios de amiR-C y amiR-D maduros (#1580 y #2019, respectivamente) y de sus bandas estrella (#1579 y #1935, respectivamente) marcados con  $^{32}$ P. Como patrones de calibración se cargaron cantidades conocidas de oligodeoxinucleótidos con la secuencia de amiR-C y amiR-D maduros (#1579 y 1935, respectivamente) y de sus bandas estrella (#1580 y 2019, respectivamente). La densitometría de las señales y la estimación de cantidad de amiRNA acumulado en cada muestra se realizó con el programa Quantity One. Los valores resultantes (en ng) se muestran debajo de cada carril. En la parte inferior se muestran el gel teñido con BrEt antes de la transferencia, como control de carga.

## IV. DISCUSIÓN

Se remontan al año 2006 las primeras evidencias de que era posible aprovechar la maquinaria de silenciamiento de RNA para bloquear la expresión de genes de una planta de manera altamente específica por medio de miRNA artificiales (amiRNAs) producidos encajando en el esqueleto de pre-miRNAs endógenos secuencias del gen que se pretende silenciar (Alvarez *et al.*, 2006; Schwab *et al.*, 2006). En el mismo año 2006, Niu *et al.* (2006), usando como andamiaje al precursor del miR159 de *A. thaliana*, demostraron que la expresión de amiRNAs puede ser empleada para interferir con infecciones virales. Posteriormente, una serie de trabajos realizados con diferentes combinaciones de virus y plantas huésped han demostrado la amplia cobertura de esta estrategia antiviral (por ejemplo, Ai *et al.*, 2011; Duan *et al.*, 2008; Fahim *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2011; Kung *et al.*, 2012; Qu *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011a). Pero, como se muestra en estos trabajos, no todos los amiRNAs dirigidos a dianas virales son capaces de bloquear eficientemente la multiplicación del virus y las propiedades que confieren eficacia a los amiRNA antivirales son prácticamente desconocidas.

### IV.1 ¿Por qué diferentes amiRNAs confieren diferentes niveles de resistencia antiviral?

Teniendo en cuenta la relevancia socioeconómica de la enfermedad de la sharka, causada por el PPV, el primer objetivo de esta tesis ha sido diseñar amiRNAs capaces de bloquear la infección producida por este virus, y, si es posible, encontrar elementos que ayuden en el diseño racional de amiRNAs con actividad antiviral.

En un trabajo previo de nuestro laboratorio, se diseñó una serie de amiRNAs ensamblados en el precursor del miRNA159 de *Arabidopsis* dirigidos a diferentes dianas del genoma del PPV. Para la selección de estos miRNAs se eligieron secuencias del RNA viral que parecían especialmente susceptibles a la acción de la maquinaria del silenciamiento de RNA en base a datos de identificación de siRNAs virales por medio de secuenciación masiva y de mapeo de sitios de fragmentación del RNA viral por 5'-RACE, y su actividad se analizó en un sistema de expresión transitoria por agroinfiltración (M. Zhao, F. Mesel, J.A. García y C. Simón Mateo, manuscrito en preparación).

Para esta tesis, se seleccionaron para su expresión constitutiva en plantas transgénicas tres amiRNAs con potente actividad antiviral frente al PPV en el ensayo de agroinfiltración y con dianas en diferentes regiones del genoma del PPV: amiR-C y amiR-D dirigidos a las secuencias codificantes de las proteínas NIb (nt 8426-8446) y CP (nt 9292-9312), respectivamente, y amiR-H, dirigida a la región 3'NCR (nt 9597-9617). En concordancia con las observaciones de Kung *et al.* (2012), la expresión en plantas transgénicas de estos amiRNAs y la resistencia frente al PPV que generan en ellas no reproduce muy fielmente su comportamiento en los experimentos de expresión transitoria. Si bien el comportamiento de amiR-C y amiR-D frente a la infección del PPV era similar cuando se expresaban transitoriamente por agroinfiltración o constitutivamente en plantas transgénicas, con una eficaz actividad protectora en ambos casos, amiR-H, que impedía la infección del PPV con una eficacia similar a la de amiR-C y amiR-D en el sistema de agroinfiltración, solo mostraba una acción antiviral marginal cuando se expresaba en plantas transgénicas.

Una presunción generalizada en trabajos anteriores que estudian la acción antiviral de amiRNAs es que los pre-amiRNAs recombinantes se procesan de manera equivalente al pre-miRNA endógeno en el que se basan, y que las hebras del amiRNA dúplex resultante se cargan en RISC y se estabilizan en las mismas proporciones que las hebras del miRNA sustituido. Nuestros resultados demuestran que esta suposición no tiene por qué ser siempre necesariamente correcta. En la planta silvestre, la banda de miR159 que se acumula preferentemente y tiene actividad biológica, por lo que se le asigna la consideración de banda madura, es la más cercana al extremo 3' del RNA (Fig. III.1). En este caso, la banda complementaria, a la que se le asigna la consideración de banda estrella, es prácticamente inexistente. La distribución de hebras de amiR-D muestra un cierto paralelismo con la de las hebras de miR159, siendo la hebra localizada al extremo 3' del pre-amiRNA (presunta banda estrella) indetectable en ensayos de Northern blot (Figs. III.3 y III.4); sin embargo, el caso no parece tan extremo como el del miR159 natural, ya que los ensayos de RT-qPCR mostraban un nivel de acumulación de amiR-D estrella muy bajo pero apreciable (Fig. III.6). El ensayo de Northern blot mostraba que la acumulación de las dos bandas de amiR-C era más equilibrada, aunque la de la localizada en la región 3' del pre-amiRNA era mayor (Fig. III.2), por lo que se podía seguir considerando como banda madura. Sin embargo, en el caso de amiR-H, las dos hebras se acumulaban en cantidades muy similares (Fig.

III.4), por lo que no es posible realizar una asignación estricta de las categorías de banda madura y estrella. Estos datos son especialmente relevantes cuando se trata de amiRNAs dirigidos a virus con genoma RNA, ya que, si bien el presunto amiRNA maduro va dirigido al RNA genómico, la hipotética banda estrella tendría la capacidad de actuar contra el RNA viral de polaridad negativa (Fig. III.10), un elemento intermedio clave del proceso de replicación del virus. El estudio de esta posibilidad ha sido un tema fundamental de esta tesis doctoral, como discutiré más adelante.

Los análisis de Northern blot y de secuenciación masiva habían mostrado un patrón de acumulación de bandas de los amiRNAs expresados por agroinfiltración muy distintos (M. Zhao, F. Mesel, J.A. García y C. Simón Mateo, manuscrito en preparación). Para los tres amiRNAs, los niveles de acumulación de las dos bandas eran del mismo orden, y, en el caso de amiR-D la supuesta banda estrella parecía ser más abundante. Más importante, aunque un análisis de secuenciación masiva revelaba la acumulación de las especies derivadas del procesamiento por una de las RNasas DCL en los sitios esperados de los pre-amiRNAs, también se detectaba acumulación abundante de muchas más especies de RNAs de 21-24 nt. Es muy improbable que todas estas especies deriven de cortes primarios de DCLs, por lo que no es arriesgado asumir que son el resultado de un proceso de amplificación del silenciamiento de RNA secundario. El corte por miRNA endógenos no suele inducir una fase de amplificación del silenciamiento por siRNAs secundarios, aunque hay excepciones (Cuperus *et al.*, 2010; Felippes y Weigel, 2009; Felippes *et al.*, 2011; Manavella *et al.*, 2012). Aunque no hemos hecho un análisis de secuenciación masiva de los RNAs pequeños de las plantas que expresan los amiRNAs específicos de PPV a partir de transgenes, es muy improbable que en estas plantas se estén produciendo siRNAs secundarios a partir del corte de los amiRNAs, en primer lugar porque los pre-amiRNAs no tienen las características especiales que se han descrito como determinantes para la inducción del proceso de amplificación y, en segundo lugar, porque la fuerte asimetría de acumulación de las dos hebras de amiR-D (Figs. III. 4-6) no encaja con el proceso de amplificación del silenciamiento de RNA, que, en general, genera cantidad similares de especies de ambas polaridades. No resulta, por tanto, extraño que la expresión por agroinfiltración de lugar a niveles más altos de amiRNAs, como ya ha sido descrito (Kung *et al.*, 2012) y a una actividad antiviral mayor. La alta eficiencia del sistema de agroinfiltración justificaría que no se permitiera detectar la menor actividad antiviral de



amiR-H con respecto a amiR-C y amiR-D que hemos observado en las plantas transgénicas.

¿Por qué amiR-H es menos eficiente que amiR-C y amiR-D? Se ha comprobado en trabajos anteriores que existe una correlación, por otra parte lógica, entre mayores niveles de acumulación de amiRNA y mayor grado de protección antiviral (Ai *et al.*, 2011; Lafforgue *et al.*, 2011; Qu *et al.*, 2007). De manera similar, en los casos de amiR-D y de amiR-H<sub>+3</sub> la diferencia de protección frente al PPV de diferentes líneas de la misma construcción parece estar asociada a diferencias en sus niveles de acumulación de amiRNA (Figs. III.6 y III.24). Sin embargo, los niveles de banda madura de amiR-H son similares a los de la de amiR-D, y los de banda estrella, superiores (Figs. III.3 y III.5), por lo que la escasa actividad de amiR-H no parece deberse a que sus niveles de acumulación sean demasiado bajos. En concordancia con esta suposición, la sustitución del primer nucleótido de amiR-H, A por U, en amiR-Hm (Fig. III.20), que debería facilitar su carga en RISC y, como consecuencia, su estabilidad, no tenía un efecto apreciable de aumento en la actividad antiviral (Tabla III.5 y Fig. III.21). Y también apoyando la idea de que la deficiente capacidad antiviral de amiR-H no está relacionada principalmente con bajos niveles de acumulación, amiR-H<sub>1</sub> parece acumularse en una cantidad superior a la de amiR-H<sub>+3</sub> (Fig. III.24), y, sin embargo, su actividad antiviral es claramente inferior (Tabla III.5 y Fig. III.21).

Podríamos pensar que la menor actividad de amiR-H respecto a amiR-C y amiR-D es debida a que el primero se dirige a una región no codificante, mientras que los segundos lo hacen a secuencias de RNA que codifican a proteína esenciales del virus. Sin embargo, el RNA genómico de los potyvirus es un mRNA policistrónico y el efecto de su procesamiento por RISC debería ser similar independientemente del punto de corte. Por otra parte, RISC puede no solo producir un corte nucleolítico en el RNA, sino también interferir con su traducción (Brodersen *et al.*, 2008), y su efecto sobre esta actividad podría verse favorecida por la localización de la diana en la región 3'NCR.

Una posibilidad atractiva es que la reducida actividad de amiR-H se deba a que su diana está poco accesible a RISC como se ha observado en el caso de un mutante de escape del *Human immunodeficiency virus* (HIV) (Westerhout *et al.*, 2005). A este respecto hay que destacar que se ha descrito para otro potyvirus, *Tobacco etch virus* (TEV), una región estructurada, que comprende parte de la 3'NCR y de la secuencia codificante de la CP, implicada en la replicación del RNA (Haldeman-Cahill *et al.*,

1998). Esta estructura, probablemente también presente en el RNA del PPV, pero aún sin delimitar, podría dificultar el acceso de RISC a alguna de las secuencias que la forman. Un pequeño salto de la diana del amiRNA como la que se produce con el empleo de amiR-H<sub>+3</sub> podría tener un efecto notable sobre la actividad antiviral. Una explicación similar se ha propuesto para justificar la diferente actividad de varios amiRNAs dirigidos a diferentes dianas dentro de la región 3'NCR del RNA3 de CMV (Duan *et al.*, 2008). Por otra parte, cuando se compara la estructura de las diferentes variantes de amiR-H, la única que tiene una actividad antiviral marcada, amiR-H<sub>+3</sub>, difiere de las demás en presentar una energía libre más equilibrada en los extremos del dúplex (Fig. III.20). Aunque esta peculiaridad no parece estar asociada con un patrón de acumulación de hebras madura y estrella particular, como sí se ha descrito en algún otro caso (Khvorova *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003), no podemos descartar que contribuya de alguna forma a la manera en que el amiRNA se cargue en RISC y lo dirija hacia su diana.

En general se asume que la función de los miRNAs la ejecuta la banda madura. Sin embargo, hay estudios que demuestran que las bandas estrella de algunos miRNAs, tanto de animales como de plantas, también pueden tener actividad, en ocasiones cargándose en un AGO diferente del que carga al miRNA maduro (Devers *et al.*, 2011; Guo y Lu, 2010; Manavella *et al.*, 2013; Okamura *et al.*, 2008; Takeda *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011b). Nuestros resultados muestran acumulación apreciable de hebras estrella en todas las líneas que expresan amiRNAs analizadas (Figs. III.2, III.5, III.6, III.24) y al menos en otro trabajo publicado se ha visto acumulación abundante de hebra estrella de amiRNAs destinados a interferir con la infección de un virus de plantas (Fahim *et al.*, 2012). Estas hebras estrella tienen capacidad teórica para dirigir a RISC a la banda de RNA negativa del virus (Fig. III.10 A). Mientras que en dos estudios realizados con virus animales con genoma RNA de polaridad positiva, el tratamiento con pequeños RNAs interferentes dirigidos al RNA anti-genómico carecía de un efecto antiviral significativo (Lisowski *et al.*, 2013; Schubert *et al.*, 2007), un estudio previo de Wilson y Richardson (2005) mostraba indicios de corte en el RNA anti-genómico de HCV como consecuencia de la administración de RNAs de pequeño tamaño adecuados, y un estudio realizado en nuestro laboratorio demostraba que un miRNA natural causaba presión selectiva sobre un PPV recombinante cuyo RNA de polaridad negativa incluía la diana de este miRNA (Simón-Mateo y García, 2006). Para poder comparar el

efecto de un amiRNA sobre el RNA genómico y sobre su RNA complementario, invertimos el RNA dúplex de pre-amiR-D, convirtiéndole en pre-amiR-Di, tratando de que ahora la hebra madura del amiRNA resultante fuera la complementaria del RNA anti-genómico del PPV. El primer resultado interesante es que, en efecto, se produjo el cambio pretendido, y se siguió acumulando con preferencia la hebra más próxima al extremo 3' del pre-amiRNA, que ahora era la complementaria a la cadena de RNA negativa del virus. Este resultado parece indicar que la estructura del pre-miRNA condiciona la hebra del dúplex que se carga en RISC, pero no podemos descartar que se deba a características intrínsecas de las secuencias y que la carga preferente de la hebra más próxima al extremo 3' tanto de amiR-D como de amiR-Di sea una coincidencia. En este sentido las dos hebras de amiR-Di tienen un extremo 5' U, el preferido para su carga en AGO1 (Kim, 2008), pero la hebra con menor estabilidad en su extremo 5' es la más próxima al extremo 3' del pre-amiRNA ( $\Delta G$  -8,2 frente a -12,6, Fig. III.10 B), lo que debería facilitar su carga en RISC (Khvorova *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003). Sin embargo, la hebra con menor estabilidad en su extremo 5' en el caso de amiR-D es la más próxima al extremo 5' del pre-miRNA, que es la que se acumula más pobremente, la justificación en este caso podría ser que el nucleótido del extremo 5' de esta hebra es G, que se supone que no favorece la carga en RISC (Kim, 2008). Independientemente de cuál sea la razón que favorezca la preferencia por la hebra de amiR-Di complementaria al RNA anti-genómico del PPV, lo que está claro es que se acumula en una cantidad superior a la de cualquiera de las dos hebras de amiR-D (Fig. III.12) y sin embargo amiR-Di confiere un nivel de resistencia antiviral muy inferior a la proporcionada por amiR-D (Tablas III.1 y III.4), lo que sugiere fuertemente que dirigir a RISC la cadena de RNA anti-genómica tiene un efecto mucho menor que dirigirla al RNA genómico. Con los datos de que disponemos no podemos descartar formalmente, sin embargo, que la falta de actividad de amiR-Di se deba a que su hebra madura no se esté cargando adecuadamente en RISC, o lo esté haciendo en complejos RISC con algún AGO carente de eficaz actividad antiviral, pero dada su abundancia y la presencia de U en su extremo 5', parece muy improbable que no se haya reclutado eficientemente por AGO1.

## IV.2 ¿Qué nos dice acerca de la acción de los amiRNAs el análisis de la secuencia de los virus mutantes que se escapan de ella?

Uno de los mayores desafíos de cualquier terapia contra un patógeno es la emergencia de mutantes resistentes al tratamiento. Este no deja de ser el caso de la resistencia frente a virus de plantas facilitada por la expresión de amiRNAs. Ya cuando se describió inicialmente la capacidad de los amiRNAs de proteger frente a la infección por virus se advirtió de la alta probabilidad de emergencia de mutantes capaces de escapar de la resistencia, al depender del eficiente apareamiento de una corta secuencia de RNA, que podía perderse por mutaciones discretas que ni siquiera tienen que cambiar secuencias de proteínas (García y Simón-Mateo, 2006). Un trabajo previo con virus recombinantes de plantas susceptibles a la acción de miRNA endógenos (Simón-Mateo y García, 2006) y diversos trabajos de virus de animales tratados con siRNAs artificiales (Das *et al.*, 2004; Gitlin *et al.*, 2005; Sabariego *et al.*, 2006; Westerhout *et al.*, 2005) apoyaban esta visión. Trabajos posteriores confirmaron la frecuente aparición de virus mutantes capaces de vencer la resistencia conferida por la expresión de amiRNAs en plantas transgénicas (Lafforgue *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2009). En este trabajo de tesis hemos obtenido varias líneas de plantas transgénicas transformadas que expresan amiR-D solo o junto con amiR-C ninguna de cuyas plantas de las generaciones F1 y F2 resultó infectada cuando se inoculó con el PPV (Tablas III.1 y III.2). Con el número de plantas que hemos analizado, no podemos garantizar que estas plantas sean completamente inmunes a la infección por PPV. En este sentido, una de las primeras líneas transgénicas productora de un amiRNA que se describió (amiR-HC-Pro<sup>159</sup>), se presentó como una línea inmune al TuMV (Niu *et al.*, 2006), sin embargo, en estudios posteriores con un número mayor de plantas se encontró un pequeño número de escapes (Lafforgue *et al.*, 2013; Lafforgue *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2012). Así pues, nuestro trabajo se ha enfocado más que a demostrar hasta qué punto las líneas que hemos obtenidos son capaces de resistir la infección del PPV, a estudiar cuáles son los elementos de los amiRNAs más relevantes para la resistencia y cómo se las arregla el virus para enfrentarse con ellos, y para ello nos han resultado más útiles aquellas líneas que solo mostraban una resistencia parcial (Tabla III.1 y III.2).

Son tres los factores principales que pueden afectar a la selección de mutaciones que faciliten el escape de la resistencia causada por amiRNAs, y de cualquier resistencia: 1) la facilidad con que se puede generar esa mutación; 2) la ayuda que le

proporciona al virus para superar la resistencia; y 3) posibles efectos secundarios (*trade-off*) sobre otros aspectos de la capacidad replicativa del virus. Respecto al primer punto, no es de extrañar que en el espectro de mutaciones encontradas en las especies virales que escapan de la acción de los diferentes amiRNAs dirigidos contra el PPV dominen fuertemente las transiciones (ver secciones III.2.1 y III.3.3), ya que este tipo de mutaciones se produce con más facilidad que las transversiones (Denver *et al.*, 2004). Además, las transiciones también pueden verse favorecidas con relación al factor 3, ya que pueden causar menores efectos sobre estructuras secundarias y terciarias del RNA, y, debido a la naturaleza de la redundancia del código genético, sobre las proteínas que codifican. Una parecida preferencia de transiciones frente a transversiones la han observado también Lafforgue *et al.* (2011) en los mutantes del TuMV que se escapan de la resistencia causada por amiR159-HCPro (también llamado amiR-HC-Pro<sup>159</sup>), y estos autores discuten minuciosamente este detalle. Es importante destacar que, si bien los factores 1 y 3 favorece a las transiciones, el factor 2 lo debería hacer con las transversiones, porque estas mutaciones deben deteriorar la hibridación del amiRNA con su diana en el RNA viral. La mencionada gran preponderancia de las transiciones sugiere que este último efecto no es demasiado relevante. Sin embargo, el hecho de que en la planta H 8.7.2 a tiempo temprano aparezca la transición C9610U y solo a tiempo más tardío se aprecie la transversión A9607C (Fig. III.7) y, sobre todo, el que en la planta inicialmente infectada D 2.6.2 predomine una especie viral con una transición G a A en la posición 9300 (Fig. III.7) pero al dar un pase en la misma línea transgénica, la que ahora predomine sea la especie viral con la transversión G a C en la misma posición (Fig. III.18), apoyaría la idea de que la transición se produce con más facilidad que la transversión, pero esta mutación resulta más efectiva para escaparse de la acción del amiRNA. Es importante destacar que en este segundo caso la preferencia tardía por la transversión G9300C podría deberse también a un posible menor efecto deletéreo del cambio de aminoácido que causa (alanina a prolina) que el causado por la transición G300A (alanina a treonina) (ver III.4.2).

También parece claro que incorporar dos mutaciones es más complicado que incorporar una sola (factor 1). Además, en este caso el que he llamado factor 3 también está en contra de la selección de variantes con más de una mutación ya que es más fácil que dos mutaciones perturben la replicación del virus que una sola. Así pues, solo se acumularán varias mutaciones si el desapareamiento de un único nucleótido no es

suficiente para impedir la acción del amiRNA. Esto no debe ser algo general ya que Lafforgue *et al.* (2011) encontraban mayoritariamente especies virales con una sola mutación en la progenie del TuMV de plantas que expresan amiR159-HCPro, lo mismo que hemos encontrado nosotros en la progenie del PPV en las plantas que expresan amiR-Di (Fig. III.13). Sin embargo, una sola mutación no parece ser suficiente para un eficiente escape de la acción de amiRNAs particularmente activos, como se deduce de la frecuente acumulación de especies del PPV con dos mutaciones en una primera infección de plantas que expresan amiR-D (Fig. III.7), o después de un primer pase tanto en estas plantas (Fig. III.18 y III.19) como en las que expresan amiR-Di (Fig. III.17).

Como he mencionado antes, la capacidad del virus de librarse de la acción de un amiRNA se puede ver limitada por posibles efectos secundarios sobre la replicación del virus de las mutaciones necesarias para el escape. La comparación de las especies virales que se escapan de la acción de amiR-C, amiR-D y los amiRNAs tipo H ilustra cómo esta restricción depende de la diana del amiRNA elegida. En las especies del PPV que escapan de la acción de amiR-C predominan las que tienen mutaciones silenciosas (Fig. III.7). Entre las mutaciones detectadas en las especies que se ha descrito que se acumulan en presencia de amiR159-HCPro la más abundante era una mutación silenciosa, pero eran también abundantes las que causaban un cambio de aminoácido. De manera similar, no hemos apreciado en nuestro trabajo preferencia por mutaciones silenciosas en las especies del PPV que se escapan de la acción de amiR-D (Fig. III.7). Estos resultados indican que la secuencia de la proteína NIb codificada por la diana de amiR-C tiene mayores restricciones funcionales que las de CP y HCPro codificadas por las dianas de amiR-D y amiR159-HCPro, lo que no quiere decir que no las haya en esta últimas, como queda reflejado en la aparentemente extrema nocividad de mutaciones de A9297 en la diana de amiR-D, que causarían un codón de parada o un cambio de lisina a glutamina o ácido glutámico en la proteína CP (Fig. III.14).

En principio, las restricciones para el escape de la acción de un amiRNA dirigido a una región no codificante, como es el caso de los amiRNAs de tipo H, deberían ser menores. De acuerdo con esta suposición, hay especies virales que se escapan de la acción de estos amiRNAs sufriendo deleciones que eliminan toda la región 3' de la diana del amiRNA, y que pueden afectar también a secuencias externas a la diana (Fig. III.22 y III.23). Es importante destacar que las secuencias no codificantes

incluyen dominios con su propia relevancia funcional, como la región estructurada identificada en el TEV que abarca secuencias codificantes de CP y no codificantes (Haldeman-Cahill *et al.*, 1998) que he mencionado antes, y la funcionalidad de estos dominios debería ser respetada por cualquier mutante que se escape de la acción de un amiRNA.

Como era de esperar no se han observado deleciones en la progenie viral de plantas que expresan amiRNAs dirigidos a regiones codificantes del RNA viral. Sin embargo, sí que se han observado especies virales con pequeñas inserciones en la diana del amiRNA (Fig. III.7 y III.13). Mientras que la inserción de una única A en una especie muy poco abundante de una planta que expresa amiR-Di no parece ser muy relevante (Fig. III.13), la de 3 Aes, que mantiene la fase de lectura, ilustra la diversidad de estrategias que puede encontrar el virus para escapar de la acción de los amiRNAs. Con la salvedad de la deleción encontrada en una de las plantas que expresa amiR-H<sub>3</sub> (Fig. III.22) que he mencionado antes, no hemos observado en la progenie del PPV de plantas que expresan amiRNAs mutaciones localizadas fuera de sus dianas. Sin embargo, se ha descrito una variante del HIV que se escapa de la acción de un siRNA artificial gracias a una mutación externa a su diana, pero que altera su plegamiento, de manera que la hace inaccesible al siRNA (Westerhout *et al.*, 2005). No se puede descartar que esta estrategia la puedan utilizar también virus de plantas para escapar de la acción de amiRNAs. Resumiendo, el conjunto de los datos sugiere que como consecuencia de la variedad de posibles mutaciones en la diana del amiRNA capaces de facilitar los escapes, las restricciones al cambio impuestas por los requerimientos funcionales del virus a nivel de proteína y de RNA afectan poco a la duración de la resistencia.

Cuando se analizan las mutaciones que facilitan el escape del virus a la acción de los diferentes amiRNAs, se observan dos hechos interesantes. El primero es que, a pesar de que las posiciones donde se detectan cambios son numerosas, algunas de ellas resultan preferidas. El segundo es que esas posiciones no son las mismas en todas las dianas de amiRNAs. Mientras que en los mutantes que escapan de la acción de amiR-D la posición en la que se producen más cambios es la 9 (referida a la diana de la banda madura en el RNA genómico) seguida por la 10, en la diana de amiR-H la posición 9 es la segunda preferida, a continuación de la 14, y en la de amiR-C, donde predominan los cambios en las posiciones 10, 16 y 19, no hemos observado ningún cambio en la

posición 9 (Fig. III.7 y Tabla III. 3). Si revisamos datos publicados, vemos que en la diana predicha para amiR159-HCPro, las mutaciones de las especies del TuMV que se escapan de la acción de este amiRNA afectan preferentemente a las posiciones 11 y 12 (Lafforgue *et al.*, 2011). La explicación más intuitiva para estas diferencias sería que el grado de perjuicio que causan las mutaciones en las diferentes posiciones de la diana es, obviamente, diferente para cada secuencia genómica atacada por el amiRNA; esto podría justificar, por ejemplo, el que no se produzcan mutaciones en la posición 9 de la diana amiR-C, que darían lugar a cambios de aminoácido, mientras que la mutación que se produce muy frecuentemente en la posición 10 es silenciosa (Fig. III.7). Sin embargo, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren fuertemente, que hay además efectos, específicos para cada amiRNA, que dependen directamente de la posición. La indicación más fuerte la proporciona la comparación entre las mutaciones que facilitan el escape de amiR-D y amiR-Di. Las secuencias predichas de las hebras de estos dos amiRNAs son casi idénticas, correspondiendo la madura de uno con la estrella del otro. Su única diferencia es que su secuencia está desplazada en un nucleótido, por lo que su sitio de corte en las bandas positiva y negativa del RNA viral también deberían estar desplazadas en un nucleótido (Fig. III.10B). El hecho de que las especies virales preferidas en las plantas que expresan amiR-D tengan una mutación en el nucleótido G9300 y las preferidas en las que expresan amiR-Di tengan una en el nucleótido A9299 (Figs. III.7, III.13 y III.14) no puede justificarse por un efecto mayor sobre la replicación del virus de las mutaciones en uno u otro nucleótido. Parece, por tanto, que la posición en la diana del amiRNA, 9 de la diana en el RNA genómico en los dos casos, es especialmente importante para la actividad del amiRNA y, por tanto, su modificación facilita con mayor eficacia el escape del virus. También apoya la especial relevancia de posiciones específicas del amiRNA o su diana, el hecho de que en los virus que escapan de la acción de tres amiRNAs de tipo H distintos, amiR-Hm, amiR-H<sub>1</sub> y amiR-H<sub>+3</sub> parezcan ser preferidas las mutaciones que afectan al nucleótido que ocupa la posición 18 de su diana en el RNA genómico, independientemente de cuál sea ese nucleótido (Figs. III.22 y III.23).

Para los miRNAs animales se ha definido una región, a la que se conoce como secuencia “*seed*”, que comprende sus nucleótidos 2 a 7, cuya complementariedad con los nucleótidos 15 al 20 de la diana en el RNA es crucial para su actividad (Bartel, 2009). En el caso de plantas, la región más relevante para el reconocimiento se ha



extendido a la que abarca del nucleótido 2 al 13 (9 al 20 de la diana) (Axtell, 2013). Sin embargo, un trabajo de Mallory *et al.* (2004) mostraba, tanto por el análisis general de parejas de miRNAs y sus dianas conocidas, como por la caracterización de mutantes naturales resistentes a miR165/166 y el análisis del efecto de mutaciones puntuales en la diana de estos miRNAs sobre su actividad *in vitro*, que perturbar el apareamiento en la región central de complementariedad tenía un efecto mucho menor que hacerlo en la región más cercana al extremo 5' del miRNA.

Resulta, por tanto, llamativo que las posiciones preferidas por el PPV para escaparse de la acción de los amiRNAs con los que le hemos enfrentado, sean posiciones centrales (Fig. III.24). Como también resulta sorprendente la selección de mutaciones en posiciones de la región 3' del amiRNA maduro, fuera, incluso, de la región 2-13 definida por Axtell *et al.* (2013) (Figs. III.7 y III.24). No es esperable que estas últimas mutaciones afecten a la actividad del amiRNA maduro sobre el RNA genómico, pero sí que deberían interferir con la de la banda estrella sobre la hebra negativa del RNA viral. Así pues, la selección de mutaciones en la región 3' de la diana podría estar indicando una contribución de la actividad de la banda estrella a la resistencia conferida por el amiRNA. En concordancia con los datos de los mutantes de escape, la diana de amiR-C de PPV-PSes, que es capaz de infectar a plantas que expresan este miRNA, solo se diferencia de la de PPV-R, que no infectan a estas plantas, en un nucleótido de la región central y en uno de la opuesta a la región 3' del miRNA.

Curiosamente, en los mutantes de escape del TuMV que se seleccionan en plantas que expresan amiR159-HCPro, también se acumulaban preferentemente mutaciones en la región central de la diana (Lafforgue *et al.*, 2011), por el contrario, las mutaciones seleccionadas en los PPV recombinantes que incluyen dianas de miRNA endógenos en el RNA genómico o en su hebra complementaria, afectaban principalmente a las secuencias enfrentadas a la región 5' del miRNA (Simón-Mateo y García, 2006), es decir, las más relevantes para el silenciamiento según Mallory *et al.* (2004).

Una posible explicación del conjunto de los resultados es que en el caso de los amiRNAs, aunque la acumulación de banda estrella sea muy pequeña, es significativa y es capaz de contribuir a la resistencia antiviral. En este escenario, las mutaciones en la región central de la diana, aunque no fueran las óptimas para eliminar la acción del

amiRNA maduro, tendrían la ventaja de interferir también con la actividad del amiRNA estrella. En el caso de miRNAs endógenos se habrían seleccionado hebras estrella completamente inestables con la finalidad de minimizar efectos “*off-target*”, por dicha razón, en el caso de los PPV recombinantes, las mutaciones seleccionadas serían las más adecuadas para impedir simplemente la acción del miRNA endógeno maduro.

Este modelo asume que la hebra del RNA anti-genómica es accesible a la maquinaria de silenciamiento de RNA mediado por miRNAs. Las localizaciones simétricas de las mutaciones seleccionadas en PPV recombinantes con la diana del miRNA integradas en la banda positiva o en la negativa (Simón-Mateo y García, 2006) apoyan fuertemente esta suposición. Sin embargo, la resistencia mucho menor de las plantas que expresan amiR-Di en comparación con las que expresan amiR-D (discutido más arriba) muestra claramente que la posible contribución antiviral del procesamiento de la banda negativa tiene menos efecto que la del procesamiento del RNA genómico. Esto justificaría la aparente ineficiencia de siRNAs sobre el RNA anti-genómico que se ha descrito para virus RNA de animales (Lisowski *et al.*, 2013; Schubert *et al.*, 2007). La prueba definitiva de que la hebra negativa del RNA viral sí es accesible a la acción de RISC dirigida por miRNAs la ha proporcionado la detección por RACE de cortes específicos en el sitio esperado de la diana de amiR-Di en las plantas transgénicas que expresan este amiRNA (Fig. III.15). Con nuestros datos no podemos determinar si la baja capacidad de estos cortes para proteger frente a la infección viral es algo general por ejemplo debido a que la hebra negativa del RNA se necesita en muy pequeñas cantidades o está muy protegida en los complejos de replicación viral, o a una peculiaridad de la diana de amiR-Di en el RNA anti-genómico que la hace particularmente inaccesible.

La variedad de maneras con las que el virus es capaz de escapar de la acción de los amiRNAs cuestiona su utilidad práctica como estrategia antiviral. Un método que se ha propuesto para mejorar la durabilidad de la resistencia mediada por amiRNAs es la expresión de varios de ellos dirigidos a diferentes dianas del RNA viral, asumiendo que la necesidad de introducir mutaciones en las dos dianas a la vez dificultaría el escape. Sin embargo, la información disponible al respecto no es muy concluyente. En la mayor parte de los casos, el estudio simplemente constata la eficiencia de las construcciones múltiples o su mayor eficiencia con respecto a las construcciones sencillas, sin entrar en una evaluación cuantitativa (Fahim *et al.*, 2012; Kis *et al.*, 2016; Kung *et al.*, 2012). El

estudio que aborda con mayor rigor el problema es, en mi opinión, el de Lafforgue *et al.* (2013). Este estudio muestra la reducción hasta un nivel indetectable del escape de la resistencia cuando la planta expresa un segundo amiRNA; sin embargo, el hecho de que no se haya analizado la frecuencia de escape del virus en plantas que expresan este segundo amiRNA de manera individual, limita en cierta medida el alcance de las conclusiones. Nuestro trabajo tiene la limitación del pequeño número de plantas ensayadas y que muchas de las líneas que expresan amiR-C o amiR-D han resultado ser resistentes, de modo que no podemos evaluar si su expresión conjunta supone una mejora significativa (Tabla III.1 y III.2). Una ventaja de nuestro trabajo sobre el de Lafforgue *et al.* (2013) es que en éste solo se analiza una línea transgénica para cada construcción, mientras que en el nuestro comparamos entre 7 y 11 de cada una. Nuestros datos sugieren que la dificultad de escape de amiR-C+D podría ser algo superior a la de amiR-D ya que, si bien en el análisis de la generación F1 el porcentaje de líneas amiR-D y amiR-C+D aparentemente inmune era similar (Tabla III.1), en el de la generación F2 de líneas definidas en el primer ensayo como inmunes no se observaron escapes en ninguna planta de cuatro líneas amiR-C+D, mientras que una de las plantas de dos líneas amiR-D resultó infectada por especies virales con mutaciones en la diana del amiRNA (Tabla III.2).

Por otra parte, nuestro análisis de los mutantes de escape de una línea amiR-C+D parcialmente resistente mostraba en algunos casos mutaciones en una sola de las dianas de los amiRNAs (Fig. III.7). Se ha sugerido como una potencial limitación de estrategias antivirales basadas en la expresión de múltiples siRNAs la posibilidad de que todos ellos compitan entre sí por RISC, de manera que solo los más favorecidos llegarían a acumularse en forma activa, y siempre en menor cantidad que cuando se expresan individualmente, sin competencia (Castanotto *et al.*, 2007; Liu y Berkhout, 2011; Liu *et al.*, 2008). Tanto si solo uno de los múltiples siRNAs alcanza un nivel de acumulación funcional como si, debido a los bajos niveles de acumulación generales, se necesita la acción conjunta de varios siRNAs, mutaciones en la diana de uno solo de ellos podrían ser suficientes para superar la resistencia. Cualquiera de las dos explicaciones podría ser válida para explicar las mutaciones simples seleccionadas en la línea amiR-C+D 7 (Fig. III.7), en vista de sus bajos niveles de expresión (Figs. III.4 y III.6).

En este trabajo de tesis hemos abordado la producción conjunta de dos amiRNAs usando una construcción policistónica, por ser la estrategia que parece más sencilla. Pero no hay razón para pensar que la expresión de cada amiRNA a partir de su propio RNA no pudiera ser más eficiente. Por ello, nos habíamos propuesto comparar la eficacia de las líneas amiR-C+D con plantas producto del cruce de las líneas amiR-C y amiR-D más resistentes; por falta de tiempo, este proyecto ha tenido que ser aplazado para ser abordado en trabajos futuros. En la misma línea, también sería interesante estudiar la conveniencia de emplear para todos los amiRNAs a combinar, el mismo armazón, miR159 en el caso de nuestro amiR C+D, o armazones diferentes. Finalmente, es importante también destacar que la combinación de amiRNAs con alta eficacia, como parecen ser los usados en el trabajo de Lafforgue *et al.* (2013) podría tener efectos sinérgicos más acusados en términos de durabilidad de la resistencia que la combinación de un amiRNA muy eficaz con otro que lo es menos, como es el caso de amiR-D y amiR-C en nuestro trabajo.

### **IV.3 ¿Cuál es el potencial evolutivo de las especies virales surgidas bajo la presión selectiva de amiRNAs?**

En la sección anterior, he discutido acerca de las fuerzas que contribuyen a la selección de especies virales con diferentes mutaciones en plantas que expresan amiRNAs con alta actividad antiviral pero no suficiente para generar una inmunidad completa. Pero es importante conocer cómo las nuevas poblaciones virales pueden comportarse en sucesivas rondas de infección. Este aspecto, que ha sido poco estudiado en anteriores estudios de amiRNAs antivirales, ha sido objeto principal de atención de esta tesis doctoral.

Nos hemos planteado tres situaciones a las que se pueden enfrentar las especies virales que emergen bajo la presión selectiva derivada de la expresión de amiRNAs según se encuentren con plantas silvestres, con plantas de la misma línea transgénica en la que se generaron, o con plantas de otra línea transgénica que exprese el mismo amiRNA del que escaparon, pero que muestre una mayor resistencia antiviral.

Si consideramos los tres factores que influían en la emergencia de mutantes de escape que mencioné en la sección anterior, está claro que la accesibilidad a la maquinaria de silenciamiento de RNA guiada por el amiRNA no debe ser un factor importante para la competitividad de las nuevas variantes virales cuando se infecten

plantas silvestres, que carecen de esa fuente de resistencia. Dada la alta tasa de mutación de los virus con genoma RNA, no es de esperar que diferencias en la facilidad de introducir nuevas mutaciones o de revertir a la secuencia original condicione significativamente el camino evolutivo de los mutantes de escape de amiRNAs en las plantas silvestres. Así pues, es la eficacia biológica de las nuevas especies virales la que debería definir su destino en estas plantas.

La población viral de la planta Di 6.3 aún conservaba un pequeño porcentaje del virus original (Fig. III.13 y III.17), que debería aumentar cuando se infectaran plantas silvestres si las mutaciones introducidas para escapar de la acción del amiRNA perturbaran la capacidad de replicación del virus. Sin embargo, este no es el caso; aunque la secuenciación masiva por MiSeq detecta al PPV original en las cuatro plantas de *N. benthamiana* silvestre inoculadas con el extracto de la planta Di 6.3, éste sigue siendo muy minoritario, demostrando que no compete de una manera particularmente ventajosa con al menos algunos de los mutantes de escape del amiRNA (Fig. III.17). Esto no quiere decir que todas las mutaciones sean neutras. La especie que es mayoritaria en la población viral de la planta Di 6.3 (mutación G9294A) prácticamente desaparece en las cuatro plantas silvestres inoculadas con dicha población viral (Fig. III.17). De la misma forma, la mutación G9300A, seleccionada en la población viral inicial de la planta D 2.6.2 y en un primer pase de la de la planta D 11.4 en otra planta D 11, desaparece después de uno o dos pases en algunas de las plantas silvestres analizadas (Fig. III.16 y III.18)). Por otra parte, el hecho de que en las plantas silvestres inoculadas con el extracto de la planta Di 6.3 se advierta una disminución de la complejidad de la población viral y que en tres de ellas se imponga una variante viral con la misma mutación (G9300U), que no era la mayoritaria en el inóculo original, (Fig. III.17) sugiere que la selección natural juega un papel importante en la evolución de las poblaciones virales de estas plantas, favoreciendo la acumulación del virus mejor adaptado. Sin embargo, la acumulación, en todos los casos, de más especies virales que se acumulan a un nivel muy superior al del virus silvestre (Fig. III.17), reafirma la pequeñez del efecto sobre la capacidad replicativa del PPV de las mutaciones que facilitan el escape de la acción de amiR-D y amiR-Di. Por otro lado, el hecho de que en una de las plantas silvestres se acumule preferentemente la especie viral con la mutación G9300A (Fig. III.17), que como he discutido antes parece tener un coste para la multiplicación del virus (Fig. III.16 y III.18), sugiere que la deriva genética contribuye a

la dispersión evolutiva de las especies virales surgidas como respuesta a la actividad antiviral de un amiRNA.

El resultado de los pases de las poblaciones virales seleccionadas en plantas que expresan un amiRNA a otras plantas de la misma línea transgénica, sugiere que en esta segunda infección el virus continúa evolucionando para evitar más eficientemente la presión selectiva que le plantea el amiRNA. En algunos casos esta adaptación implica la introducción de una segunda mutación, sin que podamos discernir si había surgido en la primera infección, pero no se había detectado por ser muy minoritaria, o se había producido en la segunda infección. Esta nueva especie viral con dos mutaciones podía convertirse en la mayoritaria, como sucede con el virus surgido en la planta D 11.4 y propagado en otra planta de la línea D 11 (Fig. III.18), o simplemente acumularse como una especie abundante, pero aún minoritaria, como se observa con el virus surgido en la planta Di 6.3 y propagado en las plantas Di 6.6, 6.7 y 6.9 (Fig. III.17). En otros casos, la especie mayoritaria en la planta infectada inicialmente se ve reemplazada después del pase por otra que era minoritaria en la primera planta (Fig. III.17 y III.18). La acumulación mayoritaria de una misma especie viral, la que tiene la mutación A9299G, en tres de las 6 plantas Di 6 inoculadas con el extracto de la planta infectada Di 6.3 (Fig. III.17) es una fuerte evidencia de que fuerzas de selección natural están contribuyendo a modelar la población viral surgida del escape de la acción del amiRNA. Como ya he mencionado antes, en estas plantas se están conjugando las presiones selectivas ejercidas por la acción antiviral del amiRNA y por los posibles efectos deletéreos de las mutaciones que le permiten al virus escapar de ella. Sin embargo, el hecho de que la mutación preferentemente seleccionada en las plantas silvestres, en ausencia de amiRNA, (G9300U) sea diferente de la preferida en las plantas Di 6 (A9299G) (Fig. III.17), sugiere fuertemente que es el escape de la acción del amiRNA la fuerza selectiva primordial en estas últimas plantas. Como en el caso de las plantas silvestres, no en todas las plantas Di 6 se acumula como especie viral mayoritaria la que parece preferida por la selección natural; en las tres plantas Di 6 inoculadas con el extracto de Di 6.3 en las que la especie con la mutación A9299G no es mayoritaria, se acumulan preferentemente, con una muy alta preeminencia, tres especies con mutaciones diferentes que afectan a tres nucleótidos distintos (G9294A, G9300U y A9302G) (Fig. III.17). Este resultado refuerza aún más la evidencia de la contribución de la deriva genética a la evolución de la población de especies virales que se escapan de la

resistencia causada por los amiRNAs. En los países que hemos realizado hemos empleado como inóculo extractos crudos de hojas infectadas sistémicamente, con un tamaño de población viral absoluto muy alto, algo que debería favorecer la competición sobre la deriva genética como fuerza evolutiva. Sin embargo, la aparente contribución de deriva genética que hemos encontrado podría justificarse por los resultados de diversos estudios evolutivos que sugieren que los tamaños de población efectivos de virus de plantas son muy inferiores a los tamaños absolutos, como consecuencia de la existencia de diferentes cuellos de botella (García-Arenal *et al.*, 2003; Zwart *et al.*, 2011).

En su conjunto todos estos resultados muestran que tanto en las plantas que expresan el amiRNA como en las silvestres la selección natural produce una disminución de la complejidad intraplanta de la población de mutantes de escape generada inicialmente, favoreciendo a las especies más eficientes en cada tipo de planta. Sin embargo, las fuerzas de deriva genética favorecen de manera estocástica a diferentes mutantes en diferentes plantas. El resultado final esperado sería que, como resultado del escape de la resistencia, a partir de una simple especie viral (o quasiespecie) silvestre se llegaría al establecimiento no de una única especie viral virulenta sino de un conjunto de especies virulentas distintas (o varias quasiespecies). Sobre el papel esta variabilidad genética supondría una multiplicación de recursos genéticos que podría ayudar al virus a adaptarse mejor a diferentes huéspedes y ambientes. En la práctica, el limitado alcance de las mutaciones introducidas en las nuevas variantes virales cuestiona la relevancia de su potencial adaptativo. Es importante destacar que en los mutantes de escape solo hemos analizado un pequeño fragmento del genoma que contiene la diana de los amiRNA, por lo que no podemos descartar que en regiones distantes de la diana se hayan introducido otras mutaciones que o bien interfieran con el reconocimiento del RNA por la maquinaria de silenciamiento guiada por el amiRNA o bien compensen los posibles efectos deletéreos causados por las mutaciones en la diana. Aunque creemos que este escenario es bastante improbable, si tuviera lugar, su relevancia evolutiva podría ser alta.

Un aspecto que ya había sido advertido con anterioridad, y que hemos confirmado en este trabajo, es que mutaciones seleccionadas en plantas que expresan un amiRNA pero solo muestran una resistencia parcial son capaces de facilitar la infección del virus en plantas que expresan el mismo amiRNA pero que presentan una resistencia

aparentemente completa (Fig. III.19 y Lafforgue *et al.*, 2011). Este resultado resulta de interés porque aspectos ambientales que pudieran atenuar puntualmente la protección de una planta que en condiciones normales sería resistente, podría, no solo facilitar la infección de esa planta en ese momento, sino también propiciar la emergencia de variantes virales capaces de infectar de manera general la línea inmune al virus silvestre. Entre estos aspectos ambientales podemos destacar dos que han sido descritos como capaces de atenuar la resistencia antiviral mediada por silenciamiento de RNA: la baja temperatura (Szittyá *et al.*, 2003) y la coinfección con un segundo virus no relacionado (Mitter *et al.*, 2001; Savenkov y Valkonen, 2001; Simón-Mateo *et al.*, 2003). En este sentido, se ha comprobado que la actividad antiviral frente a TuMV y TYMV conferida por amiR159-HCPro y amiR-P69<sup>159</sup>, respectivamente, se mantiene a una temperatura tan baja como 15°C (Niu *et al.*, 2006), pero que la resistencia frente al TuMV de las plantas que expresan amiR159-HCPro se pierde cuando se infectan previamente con otros virus (Martínez *et al.*, 2013).

Los mutantes de escape no son el único peligro para la resistencia conferida por amiRNAs. Variantes naturales del virus con pequeñas diferencias de secuencia en la diana del amiRNA pueden ser capaces de superar la resistencia. Así, se ha descrito que plantas que expresan amiRNAs específicos del tospovirus *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) eran resistente frente a este virus, pero podían infectarse, aunque con síntomas retrasados, por un virus muy relacionado *Peanut bud necrosis virus*, que tiene un solo nucleótido diferente del de WSMoV en la diana del amiRNA (Kung *et al.*, 2012). Las secuencias de las dianas de amiR-C y amiR-D están totalmente conservadas en los aislados del PPV de la raza D, sin embargo, presentan pequeños cambios de nucleótido en algunos aislados de otras razas del virus. En este caso, los dos y tres desapareamientos de amiR-C con sus dianas en PPV-PSes y PPV-SwCM, respectivamente, facilitaban la infección de estos aislados virales en las plantas que expresan este amiRNA (Fig. III.8). Por el contrario, el único desapareamiento en el RNA de PPV-SwCM y los dos en el de PPV-PSes de amiR-D no impedían que la resistencia conferida por este amiRNA protegiera eficazmente contra los aislados heterólogos (Fig. III.8). Parece, por tanto, que la expresión de amiR-D puede ser capaz de conferir una resistencia de amplio espectro frente al PPV, aunque no se pueda descartar que los pequeños desapareamientos, aunque no supriman la resistencia, faciliten la emergencia de mutantes de escape a medio o largo plazo. Una observación



interesante es que, a pesar de que en la historia evolutiva de PPV-PSes y PPV-SwCM no haya participado amiR-C, su secuencia en la diana de este amiRNA es idéntica (PPV-PSes) o casi idéntica (PPV-SwCM) a la de mutantes de PPV-R surgidos de la presión selectiva ejercida por el amiRNA (Fig. III.9). Este resultado podría sugerir la existencia de restricciones comunes a vías evolutivas del virus trazadas bajo diferentes presiones adaptativas.

#### **IV.4 ¿La actividad antiviral de amiRNAs frente al PPV en *N. benthamiana* es extrapolable a sus huéspedes naturales del genero *Prunus*?**

Los resultados que hemos obtenido acerca del efecto de la expresión de amiRNAs en la susceptibilidad a la infección por el PPV de sus huéspedes naturales del género *Prunus* son muy preliminares. A pesar de ello, he querido incluirlos en esta memoria para resaltar la relevancia de extrapolar los resultados obtenidos en una especie modelo, *N. benthamiana*, a especies de interés agronómico. Como ya he mencionado anteriormente, existe un cierto número de precedentes del estudio de la resistencia antiviral generada por amiRNA en especies modelo, pero los estudios en plantas de utilidad agronómica son mucho más escasos, limitándose a especies herbáceas como el tomate (Vu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2011a), trigo (Fahim *et al.*, 2012) o cebada (Kis *et al.*, 2016). Pero, hasta donde yo conozco, no hay información publicada sobre el uso de amiRNAs en especies leñosas o de cultivo perenne. Esta era una de las razones por las que estábamos interesados en estudiar la capacidad de amiRNAs de proporcionar protección frente al virus de la sharka. Por otra parte, es conocido que los resultados obtenidos en plantas modelo, como *A. thaliana*, *N. benthamiana* o *N. tabacum*, no siempre se reproducen en los huéspedes naturales del virus [por ejemplo, (Batuman *et al.*, 2006), citado en (Khalid *et al.*, 2017)]. Por tanto, comparar el efecto de un mismo amiRNA sobre el mismo virus en dos especies tan alejadas como *N. benthamiana* y *P. domestica* tiene un interés general tanto científico como aplicado.

Aunque no haya precedentes de uso de amiRNAs para la protección de virus en árboles, sí hay evidencias de la utilidad de estrategias mediadas por silenciamiento de RNA estimulado por secuencias largas del genoma viral. El caso más espectacular es, sin duda, el de las variedades de papaya resistentes al potyvirus PRSV Rainbow y SunUp, transformadas con secuencias codificantes de la CP del virus, que salvó a la

industria de este frutal en Hawaii en el año 1998 (Gonsalves, 1998). Posteriormente, se han desarrollado variedades de papaya con un espectro de resistencia frente al PRSV más amplio, expresando secuencias codificantes de CP o HCPro del virus (Bau *et al.*, 2003; Kung *et al.*, 2015). Otro caso de resistencia mediada por silenciamiento de RNA de árboles frutales que ha alcanzado la comercialización es el del ciruelo HoneySweet, resistente al PPV por silenciamiento de RNA dirigido también por secuencias codificantes de la CP viral. También se ha conseguido resistencia frente al PPV en ciruelo en condiciones experimentales suprimiendo por silenciamiento de RNA la expresión de un factor de la planta necesario para la replicación del virus, la proteína eIF(iso)4E (Wang *et al.*, 2013). Era, por tanto, razonable esperar que nuestra estrategia de silenciamiento de RNA mediada por amiRNAs pudiera resultar eficaz.

Para la transformación de árboles del género *Prunus*, establecimos colaboraciones con laboratorios con experiencia en este tipo de tecnología. El grupo de Humberto Prieto (INIA, Santiago de Chile) ha obtenido varios clones de *Prunus salicina* transformados con amiR-C, amiR-D y amiR-C+D, pero aún no hemos tenido la oportunidad de evaluar su susceptibilidad al PPV.

Para transformar *P. domestica* en el laboratorio de Lorenzo Burgos (CEBAS-CSIC, Murcia) elegimos el amiRNA que había resultado más eficiente en *N. benthamiana*, confiando también que la estrategia de dirigirse a dos dianas del genoma viral pudiera resultar útil en *Prunus*. Con las pocas plantas analizadas, de solo cinco líneas transgénicas, parece que la resistencia conferida por amiR-C+D en ciruelo (Fig. III.25) es inferior a la conferida en *N. benthamiana*, y este resultado, más que a un funcionamiento distinto del amiRNA en los dos tipos de plantas, parece deberse a menores niveles de expresión del transgén en el ciruelo (Fig. III.26). Aun así, en tres de las cinco líneas, los resultados preliminares sugieren que el abordaje podría estar funcionando para generar resistencia en un huésped natural del PPV.

Aparte de experimentos adicionales con un mayor número de plantas y, tal vez, con alguna línea transgénica más, es importante estudiar el comportamiento de las plantas inoculadas, tanto el de las que se hayan mostrado resistentes como el de las que hayan resultado infectadas, después de ciclos de vernalización. En el primer caso para darle más tiempo a cantidades residuales del virus que hubieran escapado a la resistencia a evolucionar y ganar virulencia. En cuanto a las plantas que resultaron infectadas, que no hemos advertido que hayan introducido mutaciones, es interesante

verificar si están sometidas a una débil presión selectiva que favorece la aparición de variantes virales mejor adaptadas a esa presión a medio largo plazo.

En nuestros experimentos iniciales hemos usado como método de inoculación, la infiltración con *agrobacterium*, un método eficiente, pero alejado de las condiciones de infección viral naturales. Estudios del comportamiento de los ciruelos transgénicos frente a inoculaciones por injerto y, aún más interesante, por pulgones, serían de gran interés para profundizar en el conocimiento de la resistencia mediada por *amiRNAs* en diferentes condiciones y su potencial utilidad agronómica.

## V. CONCLUSIONES

1. Los amiRNAs dirigidos a regiones del genoma del PPV expresados en plantas de *N. benthamiana* transgénicas generan diferentes grados de resistencia frente a la infección viral.
2. La expresión de un único amiRNA dirigido a una región de la secuencia codificante de la CP del PPV es capaz de conferir resistencia frente a aislados virales de tres razas distintas del PPV.
3. La efectividad de amiRNAs con dianas ligeramente desplazadas puede ser considerablemente diferente.
4. Cuando la resistencia ejercida por la expresión de amiRNAs en plantas de *N. benthamiana* transgénicas no es suficiente para impedir la infección del PPV, origina la emergencia de variantes virales más virulentas, con una o más mutaciones en la diana del amiRNA, algunas de las cuales parecen más favorecidas que otras.
5. Entre los factores que contribuyen a la selección preferencial de diferentes mutantes de escape del PPV en plantas de *N. benthamiana* que expresan amiRNAs se encuentran: i) la facilidad de producirse la mutación, ii) la importancia para la actividad del amiRNAs de posiciones particulares de su diana y iii) los posibles efectos colaterales de la mutación sobre la capacidad replicativa del virus.
6. El RNA complementario al RNA genómico del PPV también es diana de la acción de amiRNAs expresados en plantas transgénicas. El análisis de los mutantes que escapan a la acción de los amiRNAs sugiere que se seleccionan mutaciones que perturban la acción del silenciamiento de RNA sobre ambas hebras del RNA viral.
7. La presión ejercida sobre el PPV por los amiRNAs expresados en plantas de *N. benthamiana* transgénicas genera una población viral de elevada complejidad, que en pases sucesivos tiende a disminuir a nivel de planta individual, pero se mantiene alta en el conjunto de plantas. En la evolución de esta población parecen participar tanto factores de selección natural como de deriva genética.

8. En su mayoría, las mutaciones del PPV seleccionadas bajo la presión selectiva de los amiRNAs se mantienen estables cuando la progenie viral se propaga en plantas silvestres.
9. Las especies del PPV que escapan de la acción de un amiRNA en plantas parcialmente resistentes pueden ser capaces de infectar plantas que expresan el mismo amiRNA pero que son completamente resistentes al virus silvestre.
10. Algunas de las mutaciones seleccionadas bajo la presión ejercida por la expresión de amiRNAs se encuentran también en aislados naturales del PPV, lo que sugiere que las posibilidades para la evolución viral mediante deriva génica o bajo diferentes presiones selectivas están restringidas.
11. Los amiRNAs pueden conferir resistencia frente al PPV también en su huésped natural *P. domestica*.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel, P.P., Nelson, R.S., Barun De, N.H., Rogers, S.G., Fraley, R.T., Beachy, R.N., 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* **232**, 738-743.
- Adenot, X., Elmayan, T., Laressergues, D., Boutet, S., Bouche, N., Gascioli, V., Vaucheret, H., 2006. DRB4-dependent *TAS3* trans-acting siRNAs control leaf morphology through AGO7. *Current Biology* **16**, 927-932.
- Ai, T., Zhang, L., Gao, Z., Zhu, C.X., Guo, X., 2011. Highly efficient virus resistance mediated by artificial microRNAs that target the suppressor of PVX and PVY in plants. *Plant Biology* **13**, 304-316.
- Akbergenov, R., Si-Ammour, A., Blevins, T., Amin, I., Kutter, C., Vanderschuren, H., Zhang, P., Gruissem, W., Meins, F., Jr., Hohn, T., Pooggin, M.M., 2006. Molecular characterization of geminivirus-derived small RNAs in different plant species. *Nucleic Acids Research* **34**, 462-471.
- Al-Kaff, N.S., Covey, S.N., Kreike, M.M., Page, A.M., Pinder, R., Dale, P.J., 1998. Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. *Science* **279**, 2113-2115.
- Al-Kaff, N.S., Kreike, M.M., Covey, S.N., Pitcher, R., Page, A.M., Dale, P.J., 2000. Plants rendered herbicide-susceptible by cauliflower mosaic virus-elicited suppression of a 35S promoter-regulated transgene. *Nature Biotechnology* **18**, 995-999.
- Alazem, M., He, M.H., Moffett, P., Lin, N.S., 2017. Abscisic acid induces resistance against *Bamboo mosaic virus* through *Argonaute 2* and *3*. *Plant Physiology* **174**, 339-355.
- Alvarez, J.P., Pekker, I., Goldshmidt, A., Blum, E., Amsellem, Z., Eshed, Y., 2006. Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species. *Plant Cell* **18**, 1134-1151.
- Aragão, F.J., Nogueira, E.O., Tinoco, M.L., Faria, J.C., 2013. Molecular characterization of the first commercial transgenic common bean immune to the *Bean golden mosaic virus*. *Journal of Biotechnology* **166**, 42-50.
- Aregger, M., Borah, B.K., Seguin, J., Rajeswaran, R., Gubaeva, E.G., Zvereva, A.S., Windels, D., Vazquez, F., Blevins, T., Farinelli, L., Pooggin, M.M., 2012. Primary and secondary siRNAs in geminivirus-induced gene silencing. *PLoS Pathogens* **8**, e1002941.
- Atanasoff, 1932. Plum pox. A new virus disease. *Annals of the University of Sofia, Faculty of Agriculture and Silviculture* **11**, 49-69.
- Axtell, M.J., 2013. Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annual Review of Plant Biology* **64**, 137-159.
- Azevedo, J., Garcia, D., Pontier, D., Ohnesorge, 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.

- Balcells, I., Cirera, S., Busk, P.K.**, 2011. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnology* **11**.
- Bartel, D.P.**, 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-297.
- Bartel, D.P.**, 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215-233.
- Batuman, O., Mawassi, M., Bar-Joseph, M.**, 2006. Transgenes consisting of a dsRNA of an RNAi suppressor plus the 3' UTR provide resistance to *Citrus tristeza virus* sequences in *Nicotiana benthamiana* but not in citrus. *Virus Genes* **33**, 319-327.
- Bau, H.J., Cheng, Y.I.H., Yu, T.A., Yang, J.S., Yeh, S.D.**, 2003. Broad-spectrum resistance to different geographic strains of *Papaya ringspot virus* in coat protein gene transgenic papaya. *Phytopathology* **93**, 112-120.
- Baulcombe, D.**, 2004. RNA silencing in plants. *Nature* **431**, 356-363.
- Baulcombe, D.C.**, 1994. Replicase-mediated resistance: A novel type of virus resistance in transgenic plants? *Trends in Microbiology* **2**, 60-63.
- Baulcombe, D.C.**, 1996. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* **8**, 1833-1844.
- Baulcombe, D.C.**, 2007. Amplified silencing. *Science* **315**, 199-200.
- Baumberger, N., Baulcombe, D.C.**, 2005. *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **102**, 11928-11933.
- Baumberger, N., Tsai, C.H., Lie, M., Havecker, E., Baulcombe, D.C.**, 2007. The poliovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Current Biology* **17**, 1609-1614.
- Berkhout, B., Jeang, K.T.**, 2007. RISCy Business: MicroRNAs, Pathogenesis, and Viruses. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 26641-26645.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J.**, 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-366.
- Bitko, V., Barik, S.**, 2001. Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses. *BMC Microbiology* **1**, 34.
- Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O., Barik, S.**, 2005. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nature Medicine* **11**, 50-55.
- Blevins, T., Rajeswaran, R., Aregger, M., Borah, B.K., Schepetilnikov, M., Baerlocher, L., Farinelli, L., Meins, F., Jr., Hohn, T., Pooggin, M.M.**, 2011. Massive production of small RNAs from a non-coding region of *Cauliflower mosaic virus* in plant defense and viral counter-defense. *Nucleic Acids Research* **39**, 5003-5014.
- 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.

- Bologna, N.G., Iselin, R., Abriata, L.A., Sarazin, A., Pumplin, N., Jay, F., Grentzinger, T., Dal Peraro, M., Voinnet, O., 2018.** Nucleo-cytosolic shuttling of ARGONAUTE1 prompts a revised model of the plant microRNA pathway. *Molecular Cell* **69**, 709-719 e705.
- Bologna, N.G., Voinnet, O., 2014.** The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in *Arabidopsis*. *Annual Review of Plant Biology* **65**, 473-503.
- Borges, F., Martienssen, R.A., 2015.** The expanding world of small RNAs in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **16**, 727-741.
- Borsani, O., Zhu, J.H., Verslues, P.E., Sunkar, R., Zhu, J.K., 2005.** Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell* **123**, 1279-1291.
- Bortolamiol, D., Pazhouhandeh, M., Marrocco, K., Genschik, P., Ziegler-Graff, V., 2007.** The polerovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Current Biology* **17**, 1615-1621.
- Bouché, N., Laressergues, D., Gascioli, V., Vaucheret, H., 2006.** An antagonistic function for *Arabidopsis* DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs. *Embo Journal* **25**, 3347-3356.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y.Y., Sieburth, L., Voinnet, O., 2008.** Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* **320**, 1185-1190.
- Brodersen, P., Voinnet, O., 2006.** The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics* **22**, 268-280.
- 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.
- Calvo, M., Malinowski, T., García, J.A., 2014.** Single amino acid changes in the 6K1-CI region can promote the alternative adaptation of *Prunus*- and *Nicotiana*-propagated *Plum pox virus C* isolates to either host. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**, 136-149.
- Cambra, M., Capote, N., Cambra, M.A., Llácer, G., Botella, P., López-Quílez, A., 2006.** Epidemiology of sharka disease in Spain. *EPPO Bulletin* **36**, 271-275.
- Candresse, T., Cambra, M., 2006.** Causal agent of sharka disease: historical perspective and current status of *Plum pox virus* strains. *EPPO Bulletin* **36**, 239-246.
- Cao, M., Du, P., Wang, X., Yu, Y.-Q., Qiu, Y.-H., Li, W., Gal-On, A., Zhou, C., Li, Y., Ding, S.-W., 2014.** Virus infection triggers widespread silencing of host genes by a distinct class of endogenous siRNAs in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **111**, 14613-14618.
- Carbonell, A., Carrington, J.C., 2015.** Antiviral roles of plant ARGONAUTES. *Current Opinion in Plant Biology* **27**, 111-117.



- Carbonell, A., Fahlgren, N., Garcia-Ruiz, H., Gilbert, K.B., Montgomery, T.A., Nguyen, T., Cuperus, J.T., Carrington, J.C.**, 2012. Functional analysis of three *Arabidopsis* ARGONAUTES using slicer-defective mutants. *Plant Cell* **24**, 3613-3629.
- Carbonell, A., García, J.A., Simón-Mateo, C., Hernández, C.**, 2016. Plant virus RNA replication, Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Willey & Sons, Ltd, Chichester.
- Castanotto, D., Sakurai, K., Lingeman, R., Li, H., Shively, L., Aagaard, L., Soifer, H., Gagnon, A., Riggs, A., Rossi, J.J.**, 2007. Combinatorial delivery of small interfering RNAs reduces RNAi efficacy by selective incorporation into RISC. *Nucleic Acids Research* **35**, 5154-5164.
- Cerutti, H.**, 2003. RNA interference: traveling in the cell and gaining functions? *Trends in Genetics* **19**, 39-46.
- Chang, J., Taylor, J.M.**, 2003. Susceptibility of Human hepatitis delta virus RNAs to small interfering RNA action. *Journal of Virology* **77**, 9728-9731.
- Chen, X.**, 2004. A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development. *Science* **303**, 2022-2025.
- Chirkov, S., Ivanov, P., Sheveleva, A., Zakubanskiy, A., Osipov, G.**, 2017. New highly divergent Plum pox virus isolates infecting sour cherry in Russia. *Virology* **502**, 56-62.
- Chung, B.Y.W., Miller, W.A., Atkins, J.F., Firth, A.E.**, 2008. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **105**, 5897-5902.
- Coburn, G.A., Cullen, B.R.**, 2002. Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *Journal of Virology* **76**, 9225-9231.
- Conti, G., Zavallo, D., Venturuzzi, A.L., Rodriguez, M.C., Crespi, M., Asurmendi, S.**, 2017. TMV induces RNA decay pathways to modulate gene silencing and disease symptoms. *Plant Journal* **89**, 73-84.
- Covey, S.N., Al-Kaff, N., Lángara, A., Turner, D.S.**, 1997. Plants combat infection by gene silencing. *Nature* **385**, 781-782.
- Crescenzi, A., d'Aquino, L., Comes, S., Nuzzaci, M., Piazzolla, P., Boscia, D., Hadidi, A.**, 1997. Characterization of the sweet cherry isolate of plum pox potyvirus. *Plant Disease* **81**, 711-714.
- Csorba, T., Kontra, L., Burgyán, J.**, 2015. Viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology* **479-480**, 85-103.
- Cullen, B.R.**, 2011. Viruses and microRNAs: RISCy interactions with serious consequences. *Genes & Development* **25**, 1881-1894.
- Cuperus, J.T., Carbonell, A., Fahlgren, N., Garcia-Ruiz, H., Burke, R.T., Takeda, A., Sullivan, C.M., Gilbert, S.D., Montgomery, T.A., Carrington, J.C.**, 2010. Unique functionality of 22-nt miRNAs in triggering RDR6-dependent siRNA biogenesis from target transcripts in *Arabidopsis*. *Nature Structural & Molecular Biology* **17**, 997-1003.

- Curtis, M.D., Grossniklaus, U.**, 2003. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiology* **133**, 462-469.
- Dallot, S., Gottwald, T., Labonne, G., Quiot, J.B.**, 2003. Spatial pattern analysis of sharka disease (Plum pox virus Strain M) in peach orchards of southern France. *Phytopathology* **93**, 1543-1552.
- Das, A.T., Brummelkamp, T.R., Westerhout, E.M., Vink, M., Madiredjo, M., Bernards, R., Berkhout, B.**, 2004. Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *Journal of Virology* **78**, 2601-2605.
- De Greve, H., Decraemer, H., Seurinck, J., Van Montagu, M., Schell, J.**, 1981. The functional organization of the octopine *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiB6s3. *Plasmid* **6**, 235-248.
- Denver, D.R., Morris, K., Lynch, M., Thomas, W.K.**, 2004. High mutation rate and predominance of insertions in the *Caenorhabditis elegans* nuclear genome. *Nature* **430**, 679.
- Devers, E.A., Branscheid, A., May, P., Krajinski, F.**, 2011. Stars and symbiosis: microRNA- and microRNA\*-mediated transcript cleavage involved in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* **156**, 1990-2010.
- DeVincenzo, J., Lambkin-Williams, R., Wilkinson, T., Cehelsky, J., Nochur, S., Walsh, E., Meyers, R., Gollob, J., Vaishnav, A.**, 2010. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **107**, 8800-8805.
- Ding, S.W.**, 2010. RNA-based antiviral immunity. *Nature Reviews Immunology* **10**, 632-644.
- Ding, S.W., Voinnet, O.**, 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* **130**, 413-426.
- Donaire, L., Barajas, D., Martinez-Garcia, B., Martinez-Priego, L., Pagan, 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.
- Dosba, F., Lansac, M., Pêcheur, G., Teyssier, B., Piquemal, J.P., Michel, M.**, 1986. Plum pox virus detection by ELISA technique in peach and apricot infected trees at different growing stage. *Acta Horticulturae* **193**, 187-191.
- Dougherty, W.G., Parks, T.D.**, 1995. Transgenes and gene suppression: telling us something new? *Current Opinion in Cell Biology* **7**, 399-405.
- Du, Z., Xiao, D., Wu, J., Jia, D., Yuan, Z., Liu, Y., Hu, L., Han, Z., Wei, T., Lin, Q., Wu, Z., Xie, L.**, 2011. p2 of *Rice stripe virus* (RSV) interacts with OsSGS3 and is a silencing suppressor. *Molecular Plant Pathology* **12**, 808-814.
- Duan, C.G., Wang, C.H., Fang, R.X., Guo, H.S.**, 2008. Artificial microRNAs highly accessible to targets confer efficient virus resistance in plants. *Journal of Virology* **82**, 11084-11095.
- Dunning, J., Sahr, F., Rojek, A., Gannon, F., Carson, G., Idriss, B., Massaquoi, T., Gandi, R., Joseph, S., Osman, H.K., Brooks, T.J., Simpson, A.J., Goodfellow, I., Thorne, L., Arias, A., Merson, L., Castle, L., Howell-Jones, R., Pardinaz-Solis, R., Hope-Gill, B., Ferri, M., Grove, J., Kowalski, M., Stepniewska, K., Lang, T.,**

- Whitehead, J., Olliaro, P., Samai, M., Horby, P.W., team, R.-T.t.**, 2016. Experimental treatment of Ebola virus disease with TKM-130803: A single-arm phase 2 clinical trial. *PLoS Medicine* **13**, e1001997.
- Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C.**, 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acid Research* **19**, 1349.
- Elena, S.F.**, 2016. Evolutionary transitions during RNA virus experimental evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B-Biological Sciences* **371**, p. 20150441.
- Elena, S.F., Fraile, A., Garcia-Arenal, F.**, 2014. Evolution and emergence of plant viruses. *Advances in Virus Research* **88**, 161-191.
- 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.
- Fahim, M., Millar, A.A., Wood, C.C., Larkin, P.J.**, 2012. Resistance to *Wheat streak mosaic virus* generated by expression of an artificial polycistronic microRNA in wheat. *Plant Biotechnology Journal* **10**, 150-163.
- Faize, M., Burgos, L., Faize, L., Piqueras, A., Nicolas, E., Barba-Espin, G., Clemente-Moreno, M.J., Alcobendas, R., Artlip, T., Hernandez, J.A.**, 2011. Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2599-2613.
- Faize, M., Faize, L., Petri, C., Barba-Espin, G., Diaz-Vivancos, P., Clemente-Moreno, M.J., Koussa, T., Rifai, L.A., Burgos, L., Hernandez, J.A.**, 2013. Cu/Zn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase enhance in vitro shoot multiplication in transgenic plum. *Journal of Plant Physiology* **170**, 625-632.
- Felippes, F.F., Weigel, D.**, 2009. Triggering the formation of tasiRNAs in *Arabidopsis thaliana*: the role of microRNA miR173. *EMBO Reports* **10**, 264-270.
- Felippes, F.F.d., Ott, F., Weigel, D.**, 2011. Comparative analysis of non-autonomous effects of tasiRNAs and miRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* **39**, 2880-2889.
- Gandikota, M., Birkenbihl, R.P., Hoehmann, S., Cardon, G.H., Saedler, H., Huijser, P.**, 2007. The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the *Arabidopsis* SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *Plant Journal* **49**, 683-693.
- García, J.A., Glasa, M., Cambra, M., Candresse, T.**, 2014. *Plum pox virus* and sharka: a model potyvirus and a major disease. *Molecular Plant Pathology* **15**, 226-241.
- García, J.A., Simón-Mateo, C.**, 2006. A micropunch against plant viruses. *Nature Biotechnology* **24**, 1358-1359.
- García-Arenal, F., Fraile, A., Malpica, J.M.**, 2003. Variation and evolution of plant virus populations. *International Microbiology* **6**, 225-232.
- Garcia-Ruiz, H., Carbonell, A., Hoyer, J.S., Fahlgren, N., Gilbert, K.B., Takeda, A., Giampetruzzi, A., Garcia Ruiz, M.T., McGinn, M.G., Lowery, N., Martinez Baladejo, M.T., Carrington, J.C.**, 2015. Roles and programming of *Arabidopsis*

ARGONAUTE proteins during *Turnip mosaic virus* infection. *PLoS Pathogens* **11**, e1004755.

**Garnier, M., Mamoun, R., Bové, J.M.**, 1980. TYMV RNA replication *in vivo*: Replicative intermediate is mainly single stranded. *Virology* **104**, 357-374.

**Gascioli, V., Mallory, A.C., Bartel, D.P., Vaucheret, H.**, 2005. Partially redundant functions of *Arabidopsis* DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing *trans*-acting siRNAs. *Current Biology* **15**, 1494-1500.

**Gazzani, S., Lawrenson, T., Woodward, C., Headon, D., Sablowski, R.**, 2004. A link between mRNA turnover and RNA interference in *Arabidopsis*. *Science* **306**, 1046-1048.

**Ge, Q., Filip, L., Bai, A., Nguyen, T., Eisen, H.N., Chen, J.**, 2004. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **101**, 8676-8681.

**Geisbert, T.W.**, 2014. Medical research: Ebola therapy protects severely ill monkeys. *Nature*.

**Geisbert, T.W., Lee, A.C., Robbins, M., Geisbert, J.B., Honko, A.N., Sood, V., Johnson, J.C., de Jong, S., Tavakoli, I., Judge, A., Hensley, L.E., Maclachlan, I.**, 2010. Postexposure protection of non-human primates against a lethal Ebola virus challenge with RNA interference: a proof-of-concept study. *Lancet* **375**, 1896-1905.

**Gildow, F., Damsteegt, V., Stone, A., Schneider, W., Luster, D., Levy, L.**, 2004. Plum pox in North America: Identification of aphid vectors and a potential role for fruit in virus spread *Phytopathology* **94**, 868-874.

**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.

**Gitlin, L., Stone, J.K., Andino, R.**, 2005. Poliovirus escape from RNA interference: Short interfering RNA-target recognition and implications for therapeutic approaches. *Journal of Virology* **79**, 1027-1035.

**Glasa, M., Prikhodko, Y., Predajna, L., Nagyova, A., Shneyder, Y., Zhivaeva, T., Šubr, Z., Cambra, M., Candresse, T.**, 2013. Characterization of sour cherry isolates of *Plum pox virus* from the Volga basin in Russia reveals a new cherry strain of the virus. *Phytopathology* **103**, 972-979.

**Gonsalves, D.**, 1998. Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study. *Annual Review of Phytopathology* **36**, 415-437.

**Gonsalves, D.**, 2014. *Genetics and Genomics of Papaya* Springer, New York.

**Gottula, J., Fuchs, M.**, 2009. Toward a quarter century of pathogen-derived resistance and practical approaches to plant virus disease control. *Advances in Virus Research* **75**, 161-183.

**Grey, F.**, 2015. Role of microRNAs in herpesvirus latency and persistence. *Journal of General Virology* **96**, 739-751.

**Guo, H., Song, X., Xie, C., Huo, Y., Zhang, F., Chen, X., Geng, Y., Fang, R.**, 2013. Rice yellow stunt rhabdovirus protein 6 suppresses systemic RNA silencing by blocking

- RDR6-mediated secondary siRNA synthesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**, 927-936.
- Guo, H.S., García, J.A.**, 1997. Delayed resistance to plum pox potyvirus mediated by a mutated RNA replicase gene: Involvement of a gene silencing mechanism. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**, 160-170.
- Guo, L., Lu, Z.**, 2010. The fate of miRNA\* strand through evolutionary analysis: implication for degradation as merely carrier strand or potential regulatory molecule? *PLoS One* **5**, e11387.
- Ha, M., Kim, V.N.**, 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**, 509-524.
- Hagiwara-Komoda, Y., Choi, S.H., Sato, M., Atsumi, G., Abe, J., Fukuda, J., Honjo, M.N., Nagano, A.J., Komoda, K., Nakahara, K.S., Uyeda, I., Naito, S.**, 2016. Truncated yet functional viral protein produced *via* RNA polymerase slippage implies underestimated coding capacity of RNA viruses. *Scientific Reports* **6**, 21411.
- Haldeman-Cahill, R., Daròs, J.A., Carrington, J.C.**, 1998. Secondary structures in the capsid protein coding sequence and 3' nontranslated region involved in amplification of the tobacco etch virus genome. *Journal of Virology* **72**, 4072-4079.
- Hannon, G.J.**, 2002. RNA Interference. *Nature* **418**, 244-251.
- Hannon, G.J., Rossi, J.J.**, 2004. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* **431**, 371-378.
- Havecker, E.R., Wallbridge, L.M., Hardcastle, T.J., Bush, M.S., Kelly, K.A., Dunn, R.M., Schwach, F., Doonan, J.H., Baulcombe, D.C.**, 2010. The *Arabidopsis* RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *Plant Cell* **22**, 321-334.
- Hayes, R.J., Buck, K.W.**, 1990. Complete replication of a eukaryotic virus RNA in vitro by a purified RNA-dependent RNA polymerase. *Cell* **63**, 363-368.
- Herr, A.J., Molnar, A., Jones, A., Baulcombe, D.C.**, 2006. Defective RNA processing enhances RNA silencing and influences flowering of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103**, 10994-15001.
- Höck, J., Meister, G.**, 2008. The Argonaute protein family. *Genome Biology* **9**, 210-218.
- Horsch, R.B., Fry, J., Hoffmann, N.L., Wallroth, M., Eichholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T.**, 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**, 1229-1231.
- Hull, R.**, 2014. *Plant Virology*, Fifth Edition ed. Academic Press, London.
- Hutvagner, G., Zamore, P.D.**, 2002. RNAi: nature abhors a double-strand. *Current Opinion in Genetics & Development* **12**, 225-232.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H.**, 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Jacque, J.M., Triques, K., Stevenson, M.**, 2002. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* **418**, 435-438.

- James, D., Varga, A.**, 2005. Nucleotide sequence analysis of *Plum pox virus* isolate W3174: Evidence of a new strain. *Virus Research* **110**, 143-150.
- Jiang, F., Song, Y., Han, Q., Zhu, C., Wen, F.**, 2011. The choice of target site is crucial in artificial miRNA-mediated virus resistance in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **76**, 2-8.
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P.**, 2004. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell* **14**, 787-799.
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., Bartel, B.**, 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 19-53.
- Jouannet, V., Moreno, A.B., Elmayan, T., Vaucheret, H., Crespi, M.D., Maizel, A.**, 2012. Cytoplasmic arabidopsis AGO7 accumulates in membrane-associated siRNA bodies and is required for ta-siRNA biogenesis. *Embo Journal* **31**, 1704-1713.
- Katiyar-Agarwal, S., Morgan, R., Dahlbeck, D., Borsani, O., Villegas, A., Zhu, J.K., Staskawicz, B.J., Jin, H.**, 2006. A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103**, 18002-18007.
- Khalid, A., Zhang, Q., Yasir, M., Li, F.**, 2017. Small RNA based genetic engineering for plant viral resistance: Application in crop protection. *Frontiers in Microbiology* **8**, 43.
- Khvorova, A., Reynolds, A., Jayasena, S.D.**, 2003. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115**, 209-216.
- Kim, V.N.**, 2008. Sorting out small RNAs. *Cell* **133**, 25-26.
- Kis, A., Tholt, G., Ivanics, M., Varallyay, E., Jenes, B., Havelda, Z.**, 2016. Polycistronic artificial miRNA-mediated resistance to *Wheat dwarf virus* in barley is highly efficient at low temperature. *Molecular Plant Pathology* **17**, 427-437.
- Kumar, V., Mishra, S.K., Rahman, J., Taneja, J., Sundaresan, G., Mishra, N.S., Mukherjee, S.K.**, 2015. Mungbean yellow mosaic Indian virus encoded AC2 protein suppresses RNA silencing by inhibiting Arabidopsis RDR6 and AGO1 activities. *Virology* **486**, 158-172.
- Kung, Y.-J., Lin, S.-S., Huang, Y.-L., Chen, T.-C., Harish, S.S., Chua, N.-H., Yeh, S.-D.**, 2012. Multiple artificial microRNAs targeting conserved motifs of the replicase gene confer robust transgenic resistance to negative-sense single-stranded RNA plant virus. *Molecular Plant Pathology* **13**, 303-317.
- Kung, Y.J., You, B.J., Raja, J.A., Chen, K.C., Huang, C.H., Bau, H.J., Yang, C.F., Huang, C.H., Chang, C.P., Yeh, S.D.**, 2015. Nucleotide sequence-homology-independent breakdown of transgenic resistance by more virulent virus strains and a potential solution. *Scientific Reports* **5**, 9804.
- Kurihara, Y., Watanabe, Y.**, 2004. Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **101**, 12753-12758.

- 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.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lafforgue, G., Martínez, F., Niu, Q.W., Chua, N.H., Daròs, J.A., Elena, S.F., 2013. Improving the effectiveness of artificial microRNA (amiR)-mediated resistance against *Turnip mosaic virus* by combining two amiRs or by targeting highly conserved viral genomic regions. *Journal of Virology* **87**, 8254-8256.
- Lafforgue, G., Martínez, F., Sardanyes, J., de la Iglesia, F., Niu, Q.W., Lin, S.S., Sole, R.V., Chua, N.H., Daros, J.A., Elena, S.F., 2011. Tempo and mode of plant RNA virus escape from RNA interference-mediated resistance. *Journal of Virology* **85**, 9686-9695.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* **294**, 853-858.
- Lagrimini, L.M., Burkhart, W., Moyer, M., Rothstein, S., 1987. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: Molecular analysis and tissue-specific expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **84**, 7542-7546.
- Lain, S., Riechmann, J.L., García, J.A., 1989. The complete nucleotide sequence of plum pox potyvirus RNA. *Virus Research* **13**, 157-172.
- Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E.J., 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.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., Bartel, D.P., 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**, 858-862.
- Lee, N.S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M.J., Ehsani, A., Salvaterra, P., Rossi, J., 2002. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nature Biotechnology* **20**, 500-505.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., 1993. The *C. elegans* and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843-854.
- Léonard, S., Viel, C., Beauchemin, C., Daigneault, N., Fortin, M.G., Laliberté, J.F., 2004. Interaction of VPg-Pro of *Turnip mosaic virus* with the translation initiation factor 4E and the poly(A)-binding protein *in planta*. *Journal of General Virology* **85**, 1055-1063.
- Li, F., Pignatta, D., Bendix, C., Brunkard, J.O., Cohn, M.M., Tung, J., Sun, H., Kumar, P., Baker, B., 2012. MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **109**, 1790-1795.
- Li, J., Reichel, M., Millar, A.A., 2014. Determinants beyond both complementarity and cleavage govern microR159 efficacy in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* **10**, e1004232.

- Lin, S.S., Wu, H.W., Elena, S.F., Chen, K.C., Niu, Q.W., Yeh, S.D., Chen, C.C., Chua, N.H.**, 2009. Molecular evolution of a viral non-coding sequence under the selective pressure of amiRNA-mediated silencing. *PLoS Pathogens* **5**, e1000312.
- Lindbo, J.A., Silva-Rosales, L., Dougherty, W.G.**, 1993. Pathogen derived resistance to potyviruses: working, but why? *Seminars in Virology* **4**, 369-379.
- Lisowski, L., Elazar, M., Chu, K., Glenn, J.S., Kay, M.A.**, 2013. The anti-genomic (negative) strand of Hepatitis C Virus is not targetable by shRNA. *Nucleic Acids Research* **41**, 3688-3698.
- Liu, Y.P., Berkhout, B.**, 2011. miRNA cassettes in viral vectors: Problems and solutions. *Biochimica et Biophysica Acta* **1809**, 732-745.
- Liu, Y.P., Haasnoot, J., ter Brake, O., Berkhout, B., Konstantinova, P.**, 2008. Inhibition of HIV-1 by multiple siRNAs expressed from a single microRNA polycistron. *Nucleic Acids Research* **36**, 2811-2824.
- Llácer, G.**, 2006. Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: Herbaceous hosts. *EPPO Bulletin* **36**, 227-228.
- Llave, C.**, 2010. Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends in Plant Science* **15**, 701-707.
- Llave, C., Kasschau, K.D., Rector, M.A., Carrington, J.C.**, 2002. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* **14**, 1605-1619.
- Lucini, C.**, 2004. Expresión de proteínas heterólogas en plantas por medio del virus de la sharka (PPV), ETSI Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid.
- Luo, K.Q., Chang, D.C.**, 2004. The gene-silencing efficiency of siRNA is strongly dependent on the local structure of mRNA at the targeted region. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **318**, 303-310.
- Luo, Z.H., Chen, Z.X.**, 2007. Improperly terminated, unpolyadenylated mRNA of sense transgenes is targeted by RDR6-mediated RNA silencing in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 943-958.
- Ma, X., Nicole, M.C., Meteignier, L.V., Hong, N., Wang, G., Moffett, P.**, 2015. Different roles for RNA silencing and RNA processing components in virus recovery and virus-induced gene silencing in plants. *Journal of Experimental Botany* **66**, 919-932.
- Mallory, A., Vaucheret, H.**, 2010. Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *Plant Cell* **22**, 3879-3889.
- Mallory, A.C., Reinhart, B.J., Jones-Rhoades, M.W., Tang, G., Zamore, P.D., Barton, M.K., Bartel, D.P.**, 2004. MicroRNA control of *PHABULOSA* in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *Embo Journal* **23**, 3356-3364.
- Manavella, P.A., Koenig, D., Rubio-Somoza, I., Burbano, H.A., Becker, C., Weigel, D.**, 2013. Tissue-specific silencing of Arabidopsis *SU(VAR)3-9 HOMOLOG8* by miR171a. *Plant Physiology* **161**, 805-812.
- Manavella, P.A., Koenig, D., Weigel, D.**, 2012. Plant secondary siRNA production determined by microRNA-duplex structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **109**, 2461-2466.



- Martínez, F., Elena, S.F., Daròs, J.A.**, 2013. Fate of artificial microRNA-mediated resistance to plant viruses in mixed infections. *Phytopathology* **103**, 870-876.
- Martínez, F., Lafforgue, G., Morelli, M.J., González-Candelas, F., Chua, N.H., Daròs, J.A., Elena, S.F.**, 2012. Ultradeep sequencing analysis of population dynamics of virus escape mutants in RNAi-mediated resistant plants. *Molecular Biology and Evolution* **29**, 3297-3307.
- Matzke, M.A., Mosher, R.A.**, 2014. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature Reviews Genetics* **15**, 394-408.
- Mello, C.C., Conte Jr, D.**, 2004. Revealing the world of RNA interference. *Nature* **431**, 338-342.
- Merits, A., Rajamäki, M., Lindholm, P., Runeberg-Roos, P., Kekarainen, T., Puustinen, P., Mäkeläinen, K., Valkonen, J., Saarma, M.**, 2002. Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells. *Journal of General Virology* **83**, 1211-1221.
- Mette, M.F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M.A., Matzke, A.J.M.**, 2000. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *Embo Journal* **19**, 5194-5201.
- Mette, M.F., van der Winden, J., Matzke, M.A., Matzke, A.J.M.**, 1999. Production of aberrant promoter transcripts contributes to methylation and silencing of unlinked homologous promoters in trans. *Embo Journal* **18**, 241-248.
- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., Chen, S., Hannon, G.J., Qi, Y.**, 2008. Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* **133**, 116-127.
- Mingot, A., Valli, A., López-Moya, J.J.**, 2017. Induction and suppression of silencing by plant viruses, in: Dalmay, T. (Ed.), *Plant Gene Silencing: Mechanisms and Applications*. CAB International, Wallingford, pp. 32-58.
- Miozzi, L., Gambino, G., Burgyán, J., Pantaleo, V.**, 2013. Genome-wide identification of viral and host transcripts targeted by viral siRNAs in *Vitis vinifera*. *Molecular Plant Pathology* **14**, 30-43.
- Mitter, N., Sulistyowati, E., Graham, M.W., Dietzgen, R.G.**, 2001. Suppression of gene silencing: a threat to virus-resistant transgenic plants? *Trends in Plant Science* **6**, 246-247.
- Mlotshwa, S., Pruss, G.J., Peragine, A., Endres, M.W., Li, J., Chen, X., Poethig, R.S., Bowman, L.H., Vance, V.**, 2008. DICER-LIKE2 plays a primary role in transitive silencing of transgenes in Arabidopsis. *PLoS One* **3**, e1755.
- Montgomery, M.K., Xu, S., Fire, A.**, 1998. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**, 15502-15507.
- Morel, J.B., Godon, C., Mourrain, P., Béclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F., Vaucheret, H.**, 2002. Fertile hypomorphic ARGONAUTE (*ago1*) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell* **14**, 629-639.
- Mundry, K.W., Watkins, P.A.C., Ashfield, T., Plaskitt, K.A., Eisele-Walter, S., Wilson, T.M.A.**, 1991. Complete uncoating of the 5' leader sequence of tobacco mosaic

virus RNA occurs rapidly and is required to initiate cotranslational virus disassembly *in vitro*. *Journal of General Virology* **72**, 769-777.

**Murashige, T., Skoog, F.**, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.

**Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., Kimura, T.**, 2007. Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **104**, 34-41.

**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.

**Navarro, B., Gisel, A., Rodio, M.E., Delgado, S., Flores, R., Di Serio, F.**, 2012. Small RNAs containing the pathogenic determinant of a chloroplast-replicating viroid guide the degradation of a host mRNA as predicted by RNA silencing. *Plant Journal* **70**, 991-1003.

**Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., Jones, J.D.**, 2006. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* **312**, 436-439.

**Nemchinov, L., Hadidi, A.**, 1996. Characterization of the sour cherry strain of plum pox virus. *Phytopathology* **86**, 575-580.

**Niu, Q.-W., Lin, S.-S., Reyes, J.L., Chen, K.-C., Wu, H.-W., Yeh, S.-D., Chua, N.-H.**, 2006. Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. *Nature Biotechnology* **24**, 1420-1428.

**Okamura, K., Phillips, M.D., Tyler, D.M., Duan, H., Chou, Y.T., Lai, E.C.**, 2008. The regulatory activity of microRNA\* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nature Structural & Molecular Biology* **15**, 354-363.

**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 potexviral RNA silencing suppressor. *Plant Cell* **26**, 2168-2183.

**Oliver, C., Santos, J.L., Pradillo, M.**, 2014. On the role of some ARGONAUTE proteins in meiosis and DNA repair in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* **5**, 177.

**Olmedo-Monfil, V., Duran-Figueroa, N., Arteaga-Vazquez, M., Demesa-Arevalo, E., Autran, D., Grimanelli, D., Slotkin, R.K., Martienssen, R.A., Vielle-Calzada, J.P.**, 2010. Control of female gamete formation by a small RNA pathway in *Arabidopsis*. *Nature* **464**, 628-U200.

**Olsper, A., Chung, B.Y., Atkins, J.F., Carr, J.P., Firth, A.E.**, 2015. Transcriptional slippage in the positive-sense RNA virus family Potyviridae. *Embo Reports* **16**, 995-1004.

**Overhoff, M., Alken, M., Far, R.K.K., Lemaitre, M., Lebleu, B., Sczakiel, G., Robbins, I.**, 2005. Local RNA target structure influences siRNA efficacy: A systematic global analysis. *Journal of Molecular Biology* **348**, 871-881.

- Parent, J.S., Bouteiller, N., Elmayan, T., Vaucheret, H.**, 2015a. Respective contributions of Arabidopsis DCL2 and DCL4 to RNA silencing. *Plant Journal* **81**, 223-232.
- Parent, J.S., Jauvion, V., Bouche, N., Beclin, C., Hachet, M., Zytnicki, M., Vaucheret, H.**, 2015b. Post-transcriptional gene silencing triggered by sense transgenes involves uncapped antisense RNA and differs from silencing intentionally triggered by antisense transgenes. *Nucleic Acids Research* **43**, 8464-8475.
- Pasquini, G., Barba, M.**, 2006. The question of seed transmissibility of Plum pox virus. *EPPO Bulletin* **36**, 287-292.
- Peng, J., Xia, Z., Chen, L., Shi, M., Pu, J., Guo, J., Fan, Z.**, 2014. Rapid and efficient isolation of high-quality small RNAs from recalcitrant plant species rich in polyphenols and polysaccharides. *PLoS One* **9**.
- Ponz, F., Bruening, G.**, 1986. Mechanisms of resistance to plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* **24**, 355-381.
- Prins, M., Laimer, M., Noris, E., Schubert, J., Wassenegger, M., Tepfer, M.**, 2008. Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Molecular Plant Pathology* **9**, 73-83.
- Qi, Y., He, X., Wang, X.J., Kohany, O., Jurka, J., Hannon, G.J.**, 2006. Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature* **443**, 1008-1012.
- Qu, F., Ye, X., Morris, T.J.**, 2008. Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **105**, 14732-14737.
- Qu, J., Ye, J., Fang, R.**, 2007. Artificial microRNA-mediated virus resistance in plants. *Journal of Virology* **81**, 6690-6699.
- Raja, P., Jackel, J.N., Li, S., Heard, I.M., Bisaro, D.M.**, 2014. Arabidopsis double-stranded RNA binding protein DRB3 participates in methylation-mediated defense against geminiviruses. *Journal of Virology* **88**, 2611-2622.
- 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.
- Revers, F., García, J.A.**, 2015. Molecular biology of potyviruses. *Advances in Virus Research* **92**, 101-199.
- Reyes, C.A., De Francesco, A., Pena, E.J., Costa, N., Plata, M.I., Sendin, L., Castagnaro, A.P., Garcia, M.L.**, 2011. Resistance to Citrus psorosis virus in transgenic sweet orange plants is triggered by coat protein-RNA silencing. *Journal of Biotechnology* **151**, 151-158.
- Rhoades, M.W., Reinhart, B., Lim, L., Burge, C., Bartel, B., Bartel, D.**, 2002. Prediction of plant microRNA targets. *Cell* **110**, 513-520.
- Riechmann, J.L., Laín, S., García, J.A.**, 1989. The genome-linked protein and 5' end RNA sequence of plum pox potyvirus. *Journal of General Virology* **70**, 2785-2789.
- Riechmann, J.L., Laín, S., García, J.A.**, 1991. Identification of the initiation codon of plum pox potyvirus genomic RNA. *Virology* **185**, 544-552.

- Ritzenthaler, C., 2005. Resistance to plant viruses: old issue, news answers? *Current Opinion in Biotechnology* **16**, 118-122.
- Rodamilans, B., Valli, A., Mingot, A., San León, D., Baulcombe, D., López-Moya, J.J., García, J.A., 2015. RNA polymerase slippage as a mechanism for the production of frameshift gene products in plant viruses of the *Potyviridae* family. *Journal of Virology* **89**, 6965-6967.
- Rodríguez-Cerezo, E., Klein, P.G., Shaw, J.G., 1991. A determinant of disease symptom severity is located in the 3'-terminal noncoding region of the RNA of a plant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **88**, 9863-9867.
- Ron, M., Alandete Saez, M., Eshed Williams, L., Fletcher, J.C., McCormick, S., 2010. Proper regulation of a sperm-specific *cis*-nat-siRNA is essential for double fertilization in *Arabidopsis*. *Genes & Development* **24**, 1010-1021.
- Sabariegos, R., Giménez-Barcons, M., Tàpia, N., Clotet, B., Martínez, M.A., 2006. Sequence homology required by human immunodeficiency virus type 1 to escape from short interfering RNAs. *Journal of Virology* **80**, 571-577.
- Salvador, B., 2007. Pathogenicity and host range determinants in *Plum pox virus* infection: A role for P1 protein. Universidad Autónoma de Madrid.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanford, J.C., Johnston, S.A., 1985. The concept of parasite-derived resistance: deriving resistance genes from the parasites own genome. *Journal of Theoretical Biology* **115**, 395-405.
- Savenkov, E.I., Valkonen, J.P.T., 2001. Coat protein gene-mediated resistance to Potato virus A in transgenic plants is suppressed following infection with another potyvirus. *Journal of General Virology* **82**, 2275-2278.
- Schauer, S.E., Jacobsen, S.E., Meinke, D.W., Ray, A., 2002. *DICER-LIKE1*: blind men and elephants in *Arabidopsis* development. *Trends in Plant Science* **7**, 487-491.
- Scholthof, H.B., Alvarado, V.Y., Vega-Arreguin, J.C., Ciomperlik, J., Odokonyero, D., Brosseau, C., Jaubert, M., Zamora, A., Moffett, P., 2011a. Identification of an ARGONAUTE for antiviral RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiology* **156**, 1548-1555.
- Scholthof, K.-B.G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C., Foster, G.D., 2011b. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **12**, 938-954.
- Schubert, S., Grunweller, A., Erdmann, V.A., Kurreck, J., 2005. Local RNA target structure influences siRNA efficacy: systematic analysis of intentionally designed binding regions. *Journal of Molecular Biology* **348**, 883-893.
- Schubert, S., Rothe, D., Werk, D., Grunert, H.P., Zeichhardt, H., Erdmann, V.A., Kurreck, J., 2007. Strand-specific silencing of a picornavirus by RNA interference: evidence for the superiority of plus-strand specific siRNAs. *Antiviral Research* **73**, 197-205.

- Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., Weigel, D., 2006. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 1121-1133.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., Zamore, P.D., 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, 199-208.
- Scorza, R., Callahan, A., Dardick, C., Ravelonandro, M., Polak, J., Malinowski, T., Zagrai, I., Cambra, M., Kamenova, I., 2013. Genetic engineering of *Plum pox virus* resistance: 'HoneySweet' plum: from concept to product. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **115**, 1-12.
- Serçe, C., Candresse, T., Svanella-Dumas, L., Krizbai, L., Gazel, M., Caglayan, K., 2009. Further characterization of a new recombinant group of Plum pox virus isolates, PPV-T, found in orchards in the Ankara province of Turkey. *Virus Research* **142**, 121-126.
- Shao, C., Dong, A.W., Ma, X., Meng, Y., 2014. Is Argonaute 1 the only effective slicer of small RNA-mediated regulation of gene expression in plants? *Journal of Experimental Botany* **65**, 6293-6299.
- Shekhawat, U.K., Ganapathi, T.R., Hadapad, A.B., 2012. Transgenic banana plants expressing small interfering RNAs targeted against viral replication initiation gene display high-level resistance to banana bunchy top virus infection. *Journal of General Virology* **93**, 1804-1813.
- Shimura, H., Pantaleo, V., Ishihara, T., Myojo, N., Inaba, J.-i., Sueda, K., Burguán, J., Masuta, C., 2011. A viral satellite RNA induces yellow symptoms on tobacco by targeting a gene involved in chlorophyll biosynthesis using the RNA silencing machinery. *PLoS Pathogens* **7**, e1002021.
- 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.
- Silvestri, L.S., Taraporewala, Z.F., Patton, J.T., 2004. Rotavirus replication: plus-sense templates for double-stranded RNA synthesis are made in viroplasms. *Journal of Virology* **78**, 7763-7774.
- Simón-Buela, L., Guo, H.S., García, J.A., 1997a. Cap-independent leaky scanning as the mechanism of translation initiation of a plant viral genomic RNA. *Journal of General Virology* **78**, 2691-2699.
- Simón-Buela, L., Guo, H.S., García, J.A., 1997b. Long sequences in the 5' noncoding region of plum pox virus are not necessary for viral infectivity but contribute to viral competitiveness and pathogenesis. *Virology* **233**, 157-162.
- Simón-Buela, L., Osaba, L., García, J.A., López-Moya, J.J., 2000. Preservation of 5'-end integrity of a potyvirus genomic RNA is not dependent on template specificity. *Virology* **269**, 377-382.
- Simón-Mateo, C., García, J.A., 2006. MicroRNA-guided processing impairs *Plum pox virus* replication, but the virus readily evolves to escape this silencing mechanism. *Journal of Virology* **80**, 2429-2436.
- Simón-Mateo, C., García, J.A., 2011. Antiviral strategies in plants based on RNA silencing. *Biochimica et Biophysica Acta* **1809**, 722-731.

- Simón-Mateo, C., López-Moya, J.J., Guo, H.S., González, E., García, J.A.**, 2003. Suppressor activity of potyviral and cucumoviral infections in potyvirus-induced transgene silencing. *Journal of General Virology* **84**, 2877-2883.
- Smith, N.A., Eamens, A.L., Wang, M.-B.**, 2011. Viral small interfering RNAs target host genes to mediate disease symptoms in plants. *PLoS Pathogens* **7**, e1002022.
- Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M.B., Stoutjesdijk, P.A., Green, A.G., Waterhouse, P.M.**, 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407**, 319-320.
- Steinbuch, M., Audran, R.**, 1969. Isolation of IgG immunoglobulin from human plasma using caprylic acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **134**, 279-284.
- Steiner, F.A., Hoogstrate, S.W., Okihara, K.L., Thijssen, K.L., Ketting, R.F., Plasterk, R.H.A., Sijen, T.**, 2007. Structural features of small RNA precursors determine Argonaute loading in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Structural & Molecular Biology* **14**, 927-933.
- Sutic, D., Babovic, M., Markovic, S.**, 1976. Transmissibility of some sharka virus strains by *Mizus persicae*, depending on various infection sources. *Acta Horticulturae* no. **67**, 171-175.
- Swaney, S., Powers, H., Goodwin, J., Silva Rosales, L., Dougherty, W.G.**, 1995. RNA-mediated resistance with nonstructural genes from the tobacco etch virus genome. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**, 1004-1011.
- Szittyá, G., Silhavy, D., Molnár, A., Havelda, Z., Lovas, A., Lakatos, L., Bánfalvi, Z., Burgyán, J.**, 2003. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *Embo Journal* **22**, 633-640.
- Tabara, H., Grishok, A., Mello, C.C.**, 1998. RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science* **282**, 430-431.
- Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M., Watanabe, Y.**, 2008. The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among Argonaute proteins. *Plant and Cell Physiology* **49**, 493-500.
- Taylor, R.S., Tarver, J.E., Hiscock, S.J., Donoghue, P.C.**, 2014. Evolutionary history of plant microRNAs. *Trends in Plant Science* **19**, 175-182.
- Thi, E.P., Mire, C.E., Lee, A.C., Geisbert, J.B., Ursic-Bedoya, R., Agans, K.N., Robbins, M., Deer, D.J., Cross, R.W., Kondratowicz, A.S., Fenton, K.A., MacLachlan, I., Geisbert, T.W.**, 2017. siRNA rescues nonhuman primates from advanced Marburg and Ravn virus disease. *Journal of Clinical Investigation* **127**, 4437-4448.
- Thi, E.P., Mire, C.E., Lee, A.C., Geisbert, J.B., Zhou, J.Z., Agans, K.N., Snead, N.M., Deer, D.J., Barnard, T.R., Fenton, K.A., MacLachlan, I., Geisbert, T.W.**, 2015. Lipid nanoparticle siRNA treatment of Ebola-virus-Makona-infected nonhuman primates. *Nature* **521**, 362-365.
- Tiwari, M., Sharma, D., Trivedi, P.K.**, 2014. Artificial microRNA mediated gene silencing in plants: progress and perspectives. *Plant Molecular Biology* **86**, 1-18.
- Tolia, N.H., Joshua-Tor, L.**, 2007. Slicer and the Argonautes. *Nature Chemical Biology* **3**, 36-43.

- Tomari, Y., Du, T., Zamore, P.D.**, 2007. Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. *Cell* **130**, 299-308.
- Vaistij, F.E., Jones, L.**, 2009. Compromised virus-induced gene silencing in RDR6-deficient plants. *Plant Physiology* **149**, 1399-1407.
- Valli, A., Oliveros, J.C., Molnar, A., Baulcombe, D., 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., Beld, M., Mol, J.N., Stuitje, A.R.**, 1990. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* **2**, 291-299.
- Várallyay, É., Válóczy, A., Agyi, Á., Burgyán, J., Havelda, Z.**, 2010. Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *Embo Journal* **29**, 3507-3519.
- 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.
- Vasudevan, S., Tong, Y., Steitz, J.A.**, 2007. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* **318**, 1931-1934.
- Vaucheret, H.**, 2008. Plant ARGONAUTES. *Trends in Plant Science* **13**, 350-358.
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Crete, P., Bartel, D.P.**, 2004. The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes & Development* **18**, 1187-1197.
- Verdel, A., Jia, S., Gerber, S., Sugiyama, T., Gygi, S., Grewal, S.I., Moazed, D.**, 2004. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* **303**, 672-676.
- Vu, T.V., Choudhury, N.R., Mukherjee, S.K.**, 2013. Transgenic tomato plants expressing artificial microRNAs for silencing the pre-coat and coat proteins of a begomovirus, *Tomato leaf curl New Delhi virus*, show tolerance to virus infection. *Virus Research* **172**, 35-45.
- Wagaba, H., Patil, B.L., Mukasa, S., Alicai, T., Fauquet, C.M., Taylor, N.J.**, 2016. Artificial microRNA-derived resistance to Cassava brown streak disease. *Journal of Virological Methods* **231**, 38-43.
- Wang, M.B., Waterhouse, P.M.**, 2002. Application of gene silencing in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 146-150.
- Wang, X., Kohalmi, S.E., Svircev, A., Wang, A., Sanfacon, H., Tian, L.**, 2013. Silencing of the host factor *eIF(iso)4E* gene confers *Plum pox virus* resistance in plum. *PLoS One* **8**, e50627.
- 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 USA* **107**, 484-489.

Weinheimer, I., Jiu, Y., Rajamaki, M.L., Matilainen, O., Kallijarvi, J., Cuellar, W.J., Lu, R., Saarma, M., Holmberg, C.I., Jantti, J., Valkonen, J.P., 2015. Suppression of RNAi by dsRNA-degrading RNaseIII enzymes of viruses in animals and plants. *PLoS Pathogens* **11**, e1004711.

Westerhout, E.M., Ooms, M., Vink, M., Das, A.T., Berkhout, B., 2005. HIV-1 can escape from RNA interference by evolving an alternative structure in its RNA genome. *Nucleic Acids Research* **33**, 796-804.

Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M., Delbos, R.P., Mazyad, H., Aboul-Ata, A.E., Dunez, J., 1991. Nucleotide sequence of the 3' terminal region of the RNA of the El Amar strain of plum pox potyvirus. *Journal of General Virology* **72**, 1741-1746.

Wilson, J.A., Richardson, C.D., 2005. Hepatitis C virus replicons escape RNA interference induced by a short interfering RNA directed against the NS5b coding region. *Journal of Virology* **79**, 7050-7058.

Wylie, S.J., Adams, M., Chalam, C., Kreuze, J., Lopez-Moya, J.J., Ohshima, K., Praveen, S., Rabenstein, F., Stenger, D., Wang, A., Zerbini, F.M., Ictv Report, C., 2017. ICTV virus taxonomy profile: *Potyviridae*. *Journal of General Virology* **98**, 352-354.

Xie, Z., Allen, E., Wilken, A., Carrington, J.C., 2005. DICER-LIKE 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **102**, 12984-12989.

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**, e104.

Xie, Z.X., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., 2003. Negative feedback regulation of *Dicer-Like1* in *Arabidopsis* by microRNA-guided mRNA degradation. *Current Biology* **13**, 784-789.

Xin, M., Wang, Y., Yao, Y., Xie, C., Peng, H., Ni, Z., Sun, Q., 2010. Diverse set of microRNAs are responsive to powdery mildew infection and heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biology* **24**, 123.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J., 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.

Yoshikawa, M., Peragine, A., Park, M.Y., Poethig, R.S., 2005. A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes & Development* **19**, 2164-2175.

Yuan, J., Cheung, P.K.M., Zhang, H.M., Chau, D., Yang, D., 2005. Inhibition of coxsackievirus B3 replication by small interfering RNAs requires perfect sequence match in the central region of the viral positive strand. *Journal of Virology* **79**, 2151-2159.



- Zagrai, I., Capote, N., Ravelonandro, M., Cambra, M., Zagrai, L., Scorza, R., 2008. Plum pox virus silencing of C5 transgenic plums is stable under challenge inoculation with heterologous viruses. *Journal of Plant Pathology* **90**, 63-71.
- Zhai, J., Jeong, D.H., De Paoli, E., Park, S., Rosen, B.D., Li, Y., Gonzalez, A.J., Yan, Z., Kitto, S.L., Grusak, M.A., Jackson, S.A., Stacey, G., Cook, D.R., Green, P.J., Sherrier, D.J., Meyers, B.C., 2011. MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. *Genes & Development* **25**, 2540-2553.
- 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.
- Zhang, W., Yang, H., Kong, X., Mohapatra, S., Juan-Vergara, H.S., Hellermann, G., Behera, S., Singam, R., Lockey, R.F., Mohapatra, S.S., 2005. Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene. *Nature Medicine* **11**, 56-62.
- Zhang, X., Li, H., Zhang, J., Zhang, C., Gong, P., Ziaf, K., Xiao, F., Ye, Z., 2011a. Expression of artificial microRNAs in tomato confers efficient and stable virus resistance in a cell-autonomous manner. *Transgenic Research* **20**, 569-581.
- 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., Zhao, H., Gao, S., Wang, W.C., Katiyar-Agarwal, S., Huang, H.D., Raikhel, N., Jin, H., 2011b. *Arabidopsis* Argonaute 2 regulates innate immunity via miRNA393\*-mediated silencing of a Golgilocalized SNARE gene, *MEMB12*. *Molecular Cell* **42**, 356-366.
- Zhang, X., Zhu, Y., Liu, X., Hong, X., Xu, Y., Zhu, P., Shen, Y., Wu, H., Ji, Y., Wen, X., Zhang, C., Zhao, Q., Wang, Y., Lu, J., Guo, H., 2015. Suppression of endogenous gene silencing by bidirectional cytoplasmic RNA decay in *Arabidopsis*. *Science* **348**, 120-123.
- Zhang, X.F., Sun, R., Guo, Q., Zhang, S., Meulia, T., Halfmann, R., Li, D., Qu, F., 2017. A self-perpetuating repressive state of a viral replication protein blocks superinfection by the same virus. *PLoS Pathogens* **13**, e1006253.
- Zhang, X.F., Zhang, S., Guo, Q., Sun, R., Wei, T., Qu, F., 2018. A new mechanistic model for viral cross protection and superinfection exclusion. *Frontiers in Plant Science* **9**, 40.
- Zheng, X., Zhu, J., Kapoor, A., Zhu, J.K., 2007. Role of *Arabidopsis* AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *Embo Journal* **26**, 1691-1701.
- Ziebell, H., Carr, J.P., 2010. Cross-protection: A century of mystery. *Advances in Virus Research* **76**, 211-264.
- Zilberman, D., Cao, X., Jacobsen, S.E., 2003. *ARGONAUTE4* control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* **299**, 716-719.
- Zrachya, A., Kumar, P.P., Ramakrishnan, U., Levy, Y., Loyter, A., Arazi, T., Lapidot, M., Gafni, Y., 2007. Production of siRNA targeted against TYLCV coat

protein transcripts leads to silencing of its expression and resistance to the virus. *Transgenic Research* **16**, 385-398.

**Zwart, M.P., Daròs, J.A., Elena, S.F.**, 2011. One is enough: in vivo effective population size is dose-dependent for a plant RNA virus. *PLoS Pathogens* **7**, e1002122.