



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**PAPEL DE *NPR1* EN LA INTERACCIÓN *Nicotiana benthamiana* - *Euphorbia mosaic virus*-Yucatán
Península (*EuMV-YP*): Δ *AV1***

Tesis que presenta

ROSA YAZMÍN US CAMAS

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2013



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "Papel de *NPR1* en la interacción *Nicotiana benthamiana* - *Euphorbia mosaic virus*-Yucatán Península (*EuMV-YP*): Δ AV1" fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Felipe Vázquez Flota

Coordinador de Docencia

Mérida, Yucatán, México, enero 2013.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____



Nombre: IBQ. ROSA YAZMÍN US CAMAS

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado "Papel de *NPR1* en la interacción *Nicotiana benthamiana* - *Euphorbia mosaic virus*-Yucatán Península (*EuMV-YP*): $\Delta AV1$ " bajo la dirección del Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle al Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela por haberme aceptado en su grupo de trabajo y facilitado los recursos necesarios para poder finalizar mi trabajo.

Al técnico del laboratorio QFB. Yereni Minero por brindarme su ayuda cuando se la solicité.

A mi comité tutorial, integrado por el Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela, el Dr. José J. Zuñiga Aguilar y el Dr. Alberto Uc Varguez, por sus comentarios y sugerencias que permitieron la realización de este proyecto.

A mi comité revisor, integrado por la Dra. Cecilia Hernández Zepeda, la Dra. Ileana Echevarría Machado, el Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela, el Dr. José J. Zuñiga Aguilar y el Dr. Alberto Uc Varguez, por sus comentarios y sugerencias que enriquecieron en este trabajo.

Al M. en C. Hernán Villanueva Alonso por su amistad y por toda su ayuda técnica y académica.

A la M. en C. Angélica Moreno por contagiarme de su entusiasmo por la ciencia y por todos los consejos brindados a lo largo de este trayecto, muchas gracias.

A las ingenieras Dulce Álvarez y Marianne Luna por haber hecho más amena y divertida mi estancia y sobretodo por su amistad tan incondicional. Por haber recorrido parte de este camino junto a mí, muchas gracias.

A mis compañeros vecinos de laboratorio por su amistad, Roberto Ku, Adrian Valencia, Sadrac Baeza, Cristian Góngora, Carlos Cruz, Marta y Emily.

A mis amigos Yahaira Cab, Fani Camara, Nallely Cocom, Laura Espinosa, Cecilia Guizar, Salatiel Gutierrez y Jacobo Pérez por su amistad incondicional, por acompañarme en este camino, por sus consejos, por divertirse y llorar conmigo.

A todos los profesores, técnicos y compañeros que integran la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, por su amistad y apoyo, y por toda la felicidad brindada durante mis

caminatas por los pasillos.

Al CONACYT, por la beca (300631) otorgada durante la realización de este proyecto.

Al CICY, por prestarme sus instalaciones para el desarrollo de este proyecto.

DEDICATORIAS

A Dios:

Por brindarme cada día vida y salud para poder alcanzar este objetivo, por estar siempre junto a mí. Gracias por tu amor.

A mis padres:

Por el regalo más preciado que me han dado después de la vida, la educación. Por enseñarme valores humanos y que lo más importante es luchar por tus sueños. Por haberme educado y soportado mis errores. Gracias por sus consejos y el amor que siempre me han brindado. ¡Los quiero mucho!

A mis hermanos:

Por quererme siempre a pesar del poco tiempo que les he dedicado. Por escucharme y brindarme su confianza, ayuda y amistad incondicional.

A mi familia

Muy numerosa y que me resulta muy difícil poder nombrarlos a todos en tan poco espacio. Gracias porque siempre han depositado su confianza en mí y me han impulsado directamente hacia este logro.

Entonces entenderás justicia, juicio y equidad, y todo buen camino,

cuando la sabiduría entrare en tu corazón y la ciencia fuere

grata a tu alma

Proverbios 2:9-10.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1.1 MECANISMOS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS	3
1.1.1 RESPUESTA DE HIPERSENSIBILIDAD (HR)	3
1.1.2 RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA (SAR)	4
NPR1 (NO EXPRESIVO DE GENES PR1)	5
INTERACCIONES PROTEÍNA- PROTEÍNA DE NPR1	7
FAMILIA DE GENES TIPO NPR1 EN <i>ARABIDOPSIS</i>	8
PROTEÍNAS RELACIONADAS A LA PATOGÉNESIS (PR)	9
1.2 GEMINIVIRUS	11
1.2.1 CLASIFICACIÓN DE LA FAMILIA GEMINIVIRIDAE	11
1.2.2 BEGOMOVIRUS	12
ORGANIZACIÓN DEL GENOMA	13
1.1.2.1 <i>EUPHORBIA MOSAIC VIRUS- YUCATÁN PENÍNSULA (EUMV-YP)</i>	15
RANGO DE HOSPEDERO EXPERIMENTAL DEL EUMV-YP	17
1.3 SILENCIAMIENTO GÉNICO INDUCIDO POR VIRUS (VIGS)	20
1.3.1 VIRUS MODIFICADOS PARA EL DESARROLLO DE SISTEMAS VIGS	21
1.4 OBJETIVOS	23
OBJETIVO GENERAL	23

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
1.5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	24
BIBLIOGRAFÍA	25
CAPÍTULO II	39
SILENCIAMIENTO GÉNICO DE <i>NPR1</i> EN LA INTERACCIÓN <i>N. benthamiana</i>- <i>EuMV</i>- <i>YP: ΔAV1</i>	39
2.1 INTRODUCCIÓN	39
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	40
MATERIAL VEGETAL.....	40
OBTENCIÓN DEL VECTOR VIGS <i>EuMV-YP:ΔAV1-NPR1</i>	40
INOCULACIÓN DE PLANTAS DE <i>N. BENTHAMIANA</i>	40
EXTRACCIÓN DE ARN Y CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>NPR1</i> POR PCR EN TIEMPO REAL	41
EXTRACCIÓN DE ADN Y CUANTIFICACIÓN DEL TÍTULO VIRAL POR PCR EN TIEMPO REAL	42
2.3. RESULTADOS	43
ANÁLISIS <i>IN SÍLICO</i> DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS Y DE NUCLEÓTIDOS DE <i>NPR1</i>	43
OBTENCIÓN DEL VECTOR VIGS <i>EuMV-YP:ΔAV1-NPR1</i>	46
SEVERIDAD DE LA INFECCIÓN EN PLANTAS INOCULADAS CON EL VECTOR <i>EuMV</i> - <i>YP:ΔAV1-NPR1</i>	50
NIVELES DE EXPRESIÓN DE <i>NPR1</i> EN PLANTAS DE <i>N. BENTHAMIANA</i>	56
DETERMINACIÓN DEL TÍTULO VIRAL EN PLANTAS DE <i>N. BENTHAMIANA</i>	61

2.4. DISCUSIÓN GENERAL	65
BIBLIOGRAFÍA.....	71
CAPÍTULO III	77
3. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	77
3.1. CONCLUSIONES.....	77
3.2. PERSPECTIVAS.....	77

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Dominios conservados y residuos Cisteína de la proteína NPR1	6
Figura 1.2. Árbol filogenético de las seis proteínas tipo NPR1 en <i>Arabidopsis</i>	8
Figura 1.3. Esquema de la organización genómica de los begomovirus.	13
Figura 1.4. Diagrama de la organización del genoma del EuMV-YP.	16
Figura 1.5. Síntomas de plantas infectadas con EuMV-YP por biobalística.....	18
Figura 1.6. Estrategia experimental para evaluar el papel de <i>NPR1</i> en la interacción <i>Nicotiana benthamiana</i> - <i>EuMV-YP:ΔAV1</i>	24
Figura 2.1. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de NPR1 y localización de las regiones conservadas.....	45
Figura 2.2. Región parcial del alineamiento de secuencias de nucleótidos de NPR1	46
Figura 2.3. Amplificación por PCR convencional de un fragmento de 237 pb de <i>NPR1</i> de <i>Capsicum annuum</i> a partir del ADNc del mismo	46
Figura 2.4. Verificación por PCR convencional a partir de ADN plasmídico de la obtención de las colonias transformadas con el vector <i>EuMV-YP:ΔAV1-NPR1</i>	47
Figura 2.5 Verificación por digestión del vector pGEM- TEasy- <i>NPR1</i> y <i>EuMV-YP:ΔAV1-NPR1</i>	48
Figura 2.6 Secuencia parcial de nucleótidos del vector pGEM-T Easy- <i>NPR1</i>	49
Figura 2.7 Alineamiento del fragmento de 237 nt secuenciado de <i>NPR1</i> (<i>NPR1</i> sec.) con la secuencia reportada correspondiente a dicha región de <i>NPR1</i> de <i>Capsicum annuum</i>	49
Figura 2.8. Niveles de severidad de plantas de <i>N. benthamiana</i> infectadas con <i>EuMV-YP:ΔAV1</i> , <i>EuMV-YP:ΔAV1-NPR1</i> y <i>EuMV-YP</i> a diferentes días post-inoculación	51

Figura 2.9. Síntomas observados en plantas de <i>N. benthamiana</i> a los 7 dpi	52
Figura 2.10. Síntomas observados en plantas de <i>N. benthamiana</i> a los 14 dpi.....	53
Figura 2.11. Síntomas observados en plantas de <i>N. benthamiana</i> a los 21 dpi.....	54
Figura 2.12. Síntomas observados en plantas de <i>N. benthamiana</i> a los 28 dpi.....	55
Figura 2.13. Amplificación por PCR convencional de un fragmento de <i>NPR1</i> y la β - <i>tubulina</i> de <i>N. benthamiana</i>	57
Figura 2.14. Expresión relativa de <i>NPR1</i> en hojas sistémicas de plantas de <i>N. benthamiana</i> en diferentes días post-inoculación.	58
Figura 2.15. Expresión relativa de <i>NPR1</i> en tallo de plantas de <i>N. benthamiana</i> a 21 dpi.	60
Figura 2.16. Amplificación por PCR de <i>AC1</i> del EuMV-YP.....	61
Figura 2.17. Título viral en hojas sistémicas de plantas de <i>N. benthamiana</i> en diferentes días post-inoculación.	63
Figura 2.18. Título viral en tallo de plantas de <i>N. benthamiana</i> a 21 dpi.....	64

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1. Familia de proteínas relacionadas a la patogénesis.....	10
Cuadro 1. 2. Clasificación de la Familia Geminiviridae.....	12
Cuadro 1. 3. Rango de hospedero experimental de EuMV-YP.....	17
Cuadro 1. 4. Rango de hospedero experimental de EuMV-YP.....	19
Cuadro 2.1. Niveles de severidad de la infección por EuMV-YP.	50

ABREVIATURAS

ACMV	<i>African cassava mosaic virus</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNcd	ADN de cadena doble
ADNcs	ADN de cadena sencilla
AGO	Proteína argonauta
ARN	Ácido ribonucleico
ARNcd	ARN de cadena doble
ARNcs	ARN cadena sencilla
ARNi	ARN de interferencia
ARNm	ARN mensajero
ATP	Trifosfato de adenosina
BCTV	<i>Beet curly top virus</i>
BGYMV	<i>Bean golden yellow mosaic virus</i>
BTH	S-metil benzo (1,2,3) tiadiazol-7-carbotioato
BTB/POZ	Dominio conservado de NPR1, implicado en la degradación vía proteosoma
Bzip	Cierre básico de leucina
CaLCuV	<i>Cabbage leaf curl virus</i>
CP	Proteína de la cápside
CR	Region común
EST	Etiqueta de secuencia expresada
EuMV-YP	<i>Eufhorbia mosaic virus</i> - Yucatan Peninsula
HR	Respuesta de hipersensibilidad
ICTV	Comite internacional de taxonomía de virus
INA	Ácido 2,6-dicloro-isonicotínico
JA	Ácido jasmónico
MeJA	Jasmonato de metilo
MP	Proteína del movimiento
MSV	<i>Maize streak virus</i>
NADPH oxidase	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-oxidasa

NIM1	Proteína de la Inmunidad 1 no inducible
NIMIN1	Proteína de la interacción 1 de Nim1
NIMIN2	Proteína de la interacción 2 de Nim1
NIMIN3	Proteína de la interacción 3 de Nim1
NPR1	No-expresivo de genes PR1
NSL	Señal de localización nuclear
NSP	Proteína de transporte nuclear
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDS	Enzima fitoeno desaturada
PR	Proteínas relacionadas a la patogénesis
PTGS	Silenciamiento genico post transcripcional
PVX	<i>Potato virus X</i>
RdRp	ARN polimerasa dependiente de ARN
REn	Proteína potenciadora de la replicación
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SA	Ácido salicílico
SAL 1	Insensible al ácido salicílico 1
SAR	Resistencia sistémica adquirida
TGMV	<i>Tomato golden mosaic virus</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
TPCTV	<i>Tomato pseudo-curly top virus</i>
TrAP	Proteína de transactivación
TRV	<i>Tobacco rattle virus</i>
VIGS	Silenciamiento génico inducido por virus

RESUMEN

La proteína NPR1 (Non-expressor of pathogenesis-related gene 1) es un regulador maestro de la resistencia sistémica adquirida (SAR). A través de su interacción con los factores de transcripción del tipo TGA, permite la expresión de los genes de defensa o proteínas relacionadas a la patogénesis (PR) y así el mejoramiento de la resistencia (Dong, 2004). En el presente trabajo, se realizó el silenciamiento del gen *NPR1* en plantas de *Nicotiana benthamiana*, empleando a un vector viral basado en el *Euphorbia mosaic virus*-Yucatán Península (EuMV-YP), denominado *EuMV-YP:ΔAV1*. Mediante el mecanismo de VIGS, se evaluó el efecto del silenciamiento de *NPR1* en la generación de síntomas y el título viral en plantas de *N. benthamiana*.

Los niveles de expresión de *NPR1* fueron evaluados mediante PCR en tiempo real. En plantas inoculadas con el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1* se observó la inducción de la expresión de *NPR1* a los 7, 14 y 21 dpi, al igual que en plantas inoculadas con el virus silvestre EuMV-YP. En plantas inoculadas con el vector de silenciamiento de *NPR1* (*EuMV-YP:ΔAV1-NPR1*), se observó una disminución significativa en el nivel de expresión de *NPR1* a partir de los 14 dpi hasta los 21 dpi, alcanzando un máximo nivel de silenciamiento del 85% a los 21 dpi respecto a los niveles obtenidos en plantas inoculadas con el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1*. A los 28 dpi se observó una disminución en el nivel de expresión de *NPR1* en plantas inoculadas con el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1*, *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* y el virus silvestre EuMV-YP respecto a plantas sin inocular, que correlacionaba con una disminución en los niveles de severidad (de acuerdo a una escala de severidad establecida) y concentración viral cercanos encontrados entre las plantas con los diferentes tratamientos. Los niveles de concentración viral encontrados en plantas inoculadas con *EuMV-YP:ΔAV1* y *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* correspondían al 45 y 75% respectivamente de la concentración viral encontrada en plantas inoculadas con el virus silvestre EuMV-YP.

A los 21 dpi las plantas inoculadas con la construcción *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* alcanzaron su máximo nivel de severidad, por encima de plantas inoculadas con el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1*, las hojas nuevas presentaban deformaciones y enchinamiento con los bordes plegados hacia el interior y mosaicos amarillos que se extendían en toda la hoja, mientras que en plantas inoculadas con *EuMV-YP:ΔAV1* las hojas presentaron

ondulaciones con los bordes ligeramente plegados hacia el envés y mosaicos amarillos que se extendía parcialmente en la hoja. Las plantas inoculadas con el virus silvestre *EuMV-YP* presentaron los mismos síntomas que los observados en plantas inoculadas con el vector de silenciamiento de *NPR1* a los 21 dpi. Estos resultados correlacionaron con una concentración viral 70 veces mayor en plantas inoculadas con *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* con respecto a la concentración viral de plantas inoculadas con el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1* y, una concentración viral en plantas inoculadas con *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* que corresponde al 80% de la concentración viral encontrada en plantas inoculadas con el virus silvestre *EuMV-YP*.

El sistema vascular de las plantas es el medio por el cual los virus se mueven hasta los tejidos sanos. De esta forma, el movimiento de larga distancia y dependiente de floema juega un papel importante para una infección exitosa de virus en plantas (Carrington *et al.*, 1996) por ello, el nivel de expresión de *NPR1* y el título viral también fueron determinados en el tallo de plantas de *N. benthamiana*. Los resultados obtenidos indicaron una disminución en el nivel de expresión de *NPR1* en plantas inoculadas con el vector *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* del 55% con respecto al nivel de expresión en plantas inoculadas con el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1* a los 21 dpi. La concentración viral en el tallo de plantas inoculadas con el vector de silenciamiento de *NPR1* fue 3 veces mayor a la obtenida en plantas inoculadas con el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1* y representaba cerca de la mitad de la concentración alcanzada en plantas inoculadas con el virus silvestre *EuMV-YP*.

Los resultados obtenidos indican que *NPR1* participa en la interacción de tipo compatible entre plantas de *N. benthamiana* y el vector VIGS *EuMV-YP:ΔAV1* generando síntomas menos severos e interviniendo en la reducción de la concentración del ADN viral.

ABSTRACT

The protein NPR1 (Non-expressor of pathogenesis-related gene 1) is a key regulator of systemic acquired resistance (SAR). Through its interaction with TGA transcription factors, NPR1 allows the expression of defense genes or pathogenesis-related proteins (PR), which improves the resistance mechanism against pathogens (Dong, 2004). In this study, we performed NPR1 transient gene silencing in *Nicotiana benthamiana* plants using a viral vector based on the *Euphorbia mosaic virus*-Yucatan Peninsula (EuMV-YP), called *EuMV-YP: ΔAV1*. Using a VIGS approach, we evaluated the effect of *NPR1* silencing in the evolution of the disease based on symptom severity and viral titer in *N. benthamiana* plants.

Levels of *NPR1* expression were quantified using real time PCR. In plants inoculated with the empty vector *EuMV-YP: ΔAV1* the induction of expression of *NPR1* at 7, 14 and 21 dpi was observed, as well as in the plants inoculated with the wild type virus EuMV-YP. In plants inoculated with the silencing vector of *NPR1* (*EuMV-YP:ΔAV1-NPR1*) a significant decrease in the level of expression of *NPR1* was observed from 14 dpi to 21 dpi, reaching a maximum level of silencing of 85 % at 21 dpi compared to the levels obtained in plants inoculated with the empty vector *EuMV-YP:ΔAV1*. At 28 dpi there was a decrease in the expression of *NPR1* in plants inoculated with the empty vector *EuMV-YP:ΔAV1* with *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* and wild virus EuMV-YP compared to the levels obtained in uninoculated plants, which was correlated with a decrease in symptom severity (according to an established severity scale) and a similar viral concentration was found between plants with each treatment. Viral concentration levels found in plants inoculated with *EuMV-YP:ΔAV1* and *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* corresponded to 45 and 75% respectively compared to the viral concentration found in plants inoculated with the wild type virus EuMV-YP.

At 21 dpi plants inoculated with the construction *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* showed the highest symptom severity compared to plants inoculated with the empty vector *EuMV-YP:ΔAV1*. New leaves showed deformations and wrinkling with inward folded edges and extending yellow mosaic on the entire leaf, whereas plants inoculated with *EuMV-YP:ΔAV1*, showed slight curling with edges folded towards the underside of new leaves

and yellow mosaic. Plants inoculated with EuMV-YP wild type showed the same symptoms as those observed in plants inoculated with the *NPR1* silencing vector at 21 dpi. These results correlated with viral concentration found to be 70 times greater in plants inoculated with *EuMV-YP: ΔAV1-NPR1* with respect to the viral concentration on plants inoculated with the empty vector *EuMV-YP:ΔAV1*, and viral concentration in plants inoculated with *EuMV-YP: ΔAV1-NPR1* corresponding to 80% of the viral concentration found in plants inoculated with the wild type virus EuMV-YP.

The vascular system of plants is the means by which viruses are moved into healthy tissues. Thus, the movement of long distance and phloem dependent plays an important role for a successful virus infection in plants (Carrington *et al.*, 1996). Therefore, the level of expression of *NPR1* and the viral titer were also determined on the stem of plant of *N. benthamiana*. Results showed a diminution of 55% in the level of expression of *NPR1* on plants inoculated with vector *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* with respect to the level of expression in plants inoculated with the empty vector *EuMV-YP:ΔAV1* at 21 dpi. Viral concentration in stems of plants inoculated with the *NPR1* silencing vector was 3 times higher than that obtained in plants inoculated with the empty vector *EuMV-YP:ΔAV1* and represent about half of the concentration achieved in plants inoculated with the wild virus EuMV-YP.

The results suggest that *NPR1* participates in the compatible interaction between plants of *N. benthamiana* and VIGS vector *EuMV-YP:ΔAV1*, involved in the resulting mild symptoms and participating somehow in a reduction of the amount of viral DNA.

INTRODUCCIÓN

En respuesta a la invasión por patógenos, las plantas activan mecanismos de defensa de forma local y sistémica. La respuesta de defensa local, también denominada respuesta de hipersensibilidad (HR), se caracteriza por una muerte celular programada en el sitio de la infección, que restringe el crecimiento del patógeno y su dispersión por toda la planta. Esta defensa local desencadena la resistencia sistémica adquirida (SAR), un mecanismo de defensa en la cual toda la planta se encuentra en un estado de alerta permanente ante infecciones posteriores y que la protege contra un amplio rango de patógenos (Ryals *et al.*, 1996). Un componente crítico de la transducción de señales para la generación del SAR, es la proteína NPR1 (Non-expressor of pathogenesis-related gene-1) (Dong, 2004). En un estado basal, la proteína NPR1 forma un complejo oligomérico a través de puentes disulfuro. Durante el ataque por patógenos se produce un cambio en el estado redox celular, los puentes disulfuro son reducidos y la proteína NPR1 cambia a su conformación monómerica activa. Los monómeros formados son transportados al núcleo, donde interactúan con los factores de transcripción de la familia TGA, activando así la expresión de los genes que codifican para las proteínas relacionadas a la patogénesis (PR) (Kinkema *et al.*, 2000; Mou *et al.*, 2003). Varios trabajos han relacionado la participación del ácido salicílico (SA), NPR1 y de los genes *PR* en interacciones virus – planta (Liu *et al.*, 2002a; Park *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005; Love *et al.*, 2005; Senthil *et al.*, 2005; Whitham *et al.*, 2006; Ascencio-Ibañez *et al.*, 2008) sugiriendo la activación de un mecanismo de defensa mediado por la vía de señalización del SA en respuesta a la infección viral. En una interacción de tipo incompatible, Liu y colaboradores determinaron que el silenciamiento del gen *NPR1* en plantas de *N. benthamiana* genera un incremento en el título viral del TMV (*Tobacco mosaic virus*), así como una disminución en la expresión del gen *PR1* a nivel local y sistémico (Liu *et al.*, 2002a). En plantas de *Arabidopsis* infectadas con el begomovirus *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV), se observaron incrementos en la expresión de los genes de *NPR1*, *TGA1*, *TGA3*, y *TGA5*, así como de los genes *PR1*, *PR2* y *PR5* (Ascencio-Ibañez *et al.*, 2008). Estos resultados sugieren una participación importante de los componentes de la vía de señalización del SA en respuesta a la infección por el begomivirus CaLCuV.

INTRODUCCIÓN

El objetivo del presente trabajo es determinar la participación de *NPR1* en la interacción *N. benthamiana*-*EuMV-YP:ΔAV1* utilizando la técnica de silenciamiento génico inducido por virus. El gen *NPR1* fue silenciado en plantas de *N. benthamiana* utilizando al vector VIGS basado en begomovirus *EuMV-YP*, en el cual se le eliminó un fragmento de 690 nt de la proteína de la cápside (*EuMV-YP:ΔAV1*) y se sustituyó por un fragmento de 237 nt del gen *NPR1* (*EuMV-YP:ΔAV1-NPR1*). El efecto del silenciamiento del *NPR1* utilizando al vector *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* fue evaluado en plantas de *N. benthamiana* cuantificando la expresión del gen *NPR1*, la severidad de los síntomas ocasionados y determinando el título viral.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 MECANISMOS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS

Las plantas se encuentran amenazadas por un amplio rango de patógenos que incluyen virus, bacterias, hongos, nemátodos e insectos (Baker *et al.*, 1997; Chen, 2008), por lo cual, las plantas han desarrollado un amplio sistema de defensa cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar la infección. Estos mecanismos de defensa pueden ser clasificados en dos categorías: los preformados ó constitutivos y los inducibles. Los mecanismos de defensa constitutivos incluyen barreras químicas y físicas que existen desde antes del ataque del patógeno y que evitan la entrada e infección, mientras que los inducibles incluyen mecanismos de defensa que son activados mediante el reconocimiento del patógeno (Dixon y Lamb, 1990; Osbourn, 1996; Scheel, 1998; Chen, 2008).

1.1.1 RESPUESTA DE HIPERSENSIBILIDAD (HR)

El reconocimiento mediado por un receptor en el sitio de infección inicia procesos de señalización celular y sistémica, que dan como resultado el rápido establecimiento de la resistencia local y el desarrollo de la resistencia sistémica adquirida (Ryals *et al.*, 1996; Sticher *et al.*, 1997; Van Loon, 1997; Scheel, 1998). La respuesta de hipersensibilidad, también conocida como resistencia local adquirida, se caracteriza por la muerte celular localizada en el sitio de la infección. Como resultado, el patógeno permanece confinado en una región necrótica, lo cual limita su capacidad de crecer o multiplicarse y de propagarse en toda la planta (Van Loon, 1997; Heath, 1998).

Las primeras reacciones que permiten el desarrollo de la respuesta de hipersensibilidad incluyen cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática, que permiten un influjo de iones Ca^+ y un eflujo de iones K^+ y Cl^- , así como la generación de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) principalmente el radical superóxido (O_2^-) en el sitio de invasión (Apostol *et al.*, 1989; Chandra y Low 1997; Ebel y Scheel, 1997; Apel y Hirt 2004).

La generación extracelular de especies reactivas de oxígeno, como el superóxido (O_2^-) y

CAPÍTULO I

radicales hidroxilo (OH^\cdot) representa un componente importante en la maquinaria de defensa de las plantas (Doke, 1997; Lamb y Dixon 1997). Las ROS pueden actuar directamente como compuestos tóxicos para los patógenos (Baker y Orlandi, 1995), catalizar el reforzamiento de las barreras físicas (Tenhaken *et al.*, 1995), participar en la señalización para activar genes de defensa (Jabs *et al.*, 1997) y permitir la muerte celular programada (Levine *et al.*, 1996; Jabs *et al.*, 1996). Varias evidencias sugieren que la producción de las ROS durante la explosión oxidativa es catalizada por el sistema NADPH oxidasa localizada en la membrana. En animales, la NADPH oxidasa se encuentra en fagocitos y linfocitos B, cataliza la producción de O_2^- a través de la reducción del oxígeno, usando a la NADPH como donador de electrones (Babior, 1999; Apel y Hirt 2004).

1.1.2 RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA (SAR)

La resistencia sistémica adquirida (SAR) es un mecanismo de defensa inducible, activado después de la infección local como parte de la respuesta de hipersensibilidad y que confiere a la planta una protección de larga duración contra un amplio rango de patógenos (Ryals *et al.*, 1996; Fobert y Després, 2005). Molecularmente, la SAR se caracteriza por el incremento en la expresión de un número de genes que codifican a las proteínas relacionados a la patogénesis (PR) (Durrant y Dong 2004; Van Loon, 2006). La participación del ácido salicílico (SA) como molécula señal del SAR ha sido extensamente estudiada (Delaney *et al.*, 1994; Dempsey *et al.*, 1999; Shah y Klessig, 1997). Se ha observado un efecto negativo sobre la expresión de los genes *PR* en plantas que previenen la acumulación de SA (Gaffney *et al.*, 1993; Delaney *et al.*, 1994) y el bloqueo de su síntesis (Wildermuth *et al.*, 2005), mientras que los incrementos en el nivel endógeno de SA ó sus conjugados coinciden con un elevado nivel de expresión de los genes *PR* (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990). Por otro lado, la aplicación del ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) y S-metil benzo [1,2,3] tiadiazol-7-carbotioato (BTH), dos análogos funcionales del SA, permiten la activación de los genes *PR* y un incremento de la resistencia a patógenos (Gaffney *et al.*, 1993; Delaney *et al.*, 1994; Kessmann *et al.*, 1994).

NPR1 (NO EXPRESIVO DE GENES PR1)

La proteína NPR1 es un regulador de la transducción de señales mediada por el SA, que activa la expresión de los genes *PR* y permite la generación del SAR, éste es también conocido como NIM1 (NON-INDUCIBLE IMMUNITY1) (Dépres *et al.*, 2000) y SAL 1 (INSENSIBLE SALICILIC ACID 1) (Shah, 1997). NPR1 es una proteína que fue identificada en *Arabidopsis thaliana* a través de tamizados genéticos de mutantes que comprometían la expresión de los genes *PR* (*PR1* y *PR5*) después de la inducción del SAR (Cao *et al.*, 1994). La proteína NPR1 se localiza en el citoplasma y en el núcleo de las células vegetales (Després *et al.*, 2000). En un estado no inducido, la proteína NPR1 se encuentra en el citoplasma formando un complejo oligomérico interaccionando a través de puentes disulfuro. Durante el ataque por patógenos existe un rápido rompimiento oxidativo, el cual genera un ambiente celular reductor permitiendo la ruptura de los puentes disulfuro lo que induce a que la proteína NPR1 se conforme en su estado monomérico, lo cual le permite trasladarse al núcleo donde interactúa con la subclase de factores de transcripción de tipo TGA con dominios básicos de cierres de leucina (bZIP) (Zhang *et al.*, 1999; Després *et al.*, 2000; Kinkema *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000), activando de esta forma la expresión de los genes *PR* (Kinkema *et al.*, 2000). La mutación en dos residuos Cys, cruciales para la oligomerización de NPR1, permiten la monomerización constitutiva y localización nuclear de NPR1, así como la expresión de *PR1* (Mou *et al.*, 2003).

Durante el desarrollo de SAR, las tioredoxinas regulan la conformación de NPR1 en el ambiente celular redox, generando un ambiente celular reductor requerido para la conversión de NPR1 de su forma oligomérica no funcional a su forma monomérica funcional (Mou *et al.*, 2003; Laloï *et al.*, 2004; Tada *et al.*, 2008). En su estado reducido las tioredoxinas son capaces de reducir puentes disulfuro de numerosas proteínas blanco. En *Arabidopsis* se han identificado ocho tioredoxinas tipo *h* citosólicas, dentro de las cuales la TRX-*h5* parece estar implicada en la defensa. Se han observado altos niveles de expresión de la TRX-*h5* en la interacción de tipo incompatible entre plantas de *Arabidopsis* y *Pseudomonas-syringae* (Laloï *et al.*, 2004). Por otra parte, la TRX-*h3* y TRX-*h5* también permiten la inducción de los genes *PR*, mientras que las mutantes *trx* comprometen la resistencia dependiente de NPR1 (Tada *et al.*, 2008).

CAPÍTULO I

El gen *NPR1* codifica a una proteína que contiene una secuencia de localización nuclear (NLS) y dos dominios conservados de interacción proteína-proteína: un dominio con repeticiones de ankirina y un dominio BTB/POZ (Broad-Complex, Tramtrack, and Bric-a-brac/Pox virus and Zinc finger) (Figura 1.1) (Cao *et al.*, 1997; Aravind y Koonin, 1999; Kinkema *et al.*, 2000).

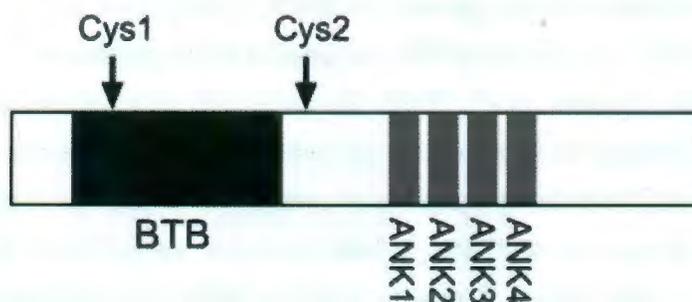


Figura 1.1. Dominios conservados y residuos Cisteína de la proteína NPR1 (Hepworth *et al.*, 2005)

Los análisis genéticos y bioquímicos indican que las proteínas blanco de las ligasas de ubiquitina del complejo Cullin 3 presentan el dominio BTB/POZ (Collins *et al.*, 2001; Pintard *et al.*, 2004; Van den Heuvel, 2004). El segundo dominio conservado constituye una serie de cuatro repeticiones de ankirina, responsables de la interacción de NPR1 con la familia de los factores de transcripción TGA (Zhang *et al.*, 1999; Després *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000). Finalmente, estas proteínas poseen varios residuos de cisteína (Cys) conservados que controlan el estado de oligomerización y la localización nuclear de NPR1 a través del potencial intracelular redox de las células (Mou *et al.*, 2003).

La proteína NPR1 localizada en el citosol, modula la comunicación cruzada entre las vías de señalización del SA y ácido jasmónico (JA) (Spoel *et al.*, 2003). La inhibición mediada por el SA de la expresión de genes en respuesta a JA es abolida en la mutante *npr1*, indicando que NPR1 funciona como un regulador negativo de la señalización de JA (Spoel *et al.*, 2003).

INTERACCIONES PROTEÍNA- PROTEÍNA DE NPR1

Aunque NPR1 carece de un sitio de unión al ADN, se sabe que regula la expresión de los genes *PR* a través de su interacción con factores de transcripción con dominios básicos de cierres de leucina (bZIP), miembros de la subclase TGA (Zhang *et al.*, 1999; Després *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000). La interacción de NPR1 y TGA2 se ha demostrado *in vivo*, esta interacción es inducida por SA y ocurre en el núcleo (Subramaniam *et al.*, 2001).

La sobreexpresión de la forma truncada de TGA2 carente de un dominio de unión a ADN resulta en un fenotipo similar al producido por la mutante *npr1* en el cual las plantas de *Arabidopsis* presentan mayor susceptibilidad a *P. syringae* (Fan y Dong, 2002). Experimentos de inmunoprecipitación de cromatina revelaron que TGA2 y TGA3 son reclutados *in vivo* de manera dependiente de NPR1 y SA (Johnson *et al.*, 2003). En ensayos de doble híbrido se ha demostrado la interacción de NPR1 con TGA2, TGA5 y TGA6 y se sabe que que estos factores de transcripción presentan funciones redundantes y esenciales para la señalización mediada por SA (Zhang *et al.*, 2003). El análisis de la secuencia de aminoácidos de TGA1 y TGA4 reveló que ambos contienen dos residuos Cys capaces de formar puentes disulfuro. La interacción parece ser dependiente del estado redox celular, debido a que ante el tratamiento con SA ambos factores de transcripción pueden interaccionar con NPR1 (Deprés *et al.*, 2003).

Los factores de transcripción de respuesta a defensa WRKY también han sido relacionados con NPR1. Algunos genes *WRKY* son blancos transcripcionales de NPR1 (Wang *et al.*, 2006b). El factor de transcripción WYRY70 funciona activando la señalización de SA y reprimiendo la señalización de JA (Li *et al.* 2004, Li *et al.*, 2006). Otros miembros *WRKY* actúan corriente arriba de NPR1 como reguladores de su expresión (Yu *et al.*, 2001). Las proteínas NIMIN1 (NIM1-INTERACTING1), NIMIN2 y NIMIN3, también interactúan con NPR1 (Weigel *et al.*, 2001; Weigel *et al.*, 2005).

FAMILIA DE GENES TIPO NPR1 EN *Arabidopsis*

El genoma de *Arabidopsis* contiene cinco miembros de genes tipo *NPR1*. El análisis filogenético de la familia tipo *NPR1* en *Arabidopsis* ha revelado que forma tres grupos discretos (**Figura 1.2**), sugiriendo funciones redundantes entre los miembros de cada par (Hepworth *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005).

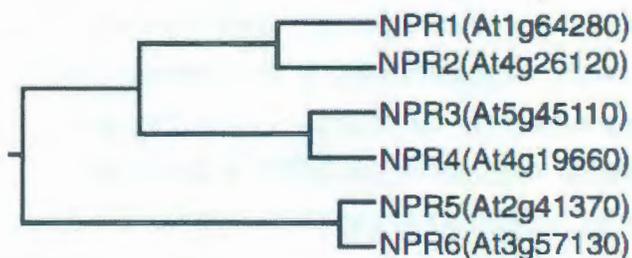


Figura 1.2. Árbol filogenético de las seis proteínas tipo *NPR1* en *Arabidopsis* (Liu *et al.*, 2005).

NPR3 Y *NPR4* actúan como reguladores negativos de la expresión de los genes *PR* y de la resistencia patogénica. Las plantas mutantes *npr3* y *npr3-npr4* presentaron niveles elevados de la expresión de *PR1* y una mayor resistencia a patógenos virulentos como oomicetos y bacterias (Zhang *et al.*, 2006b). En otro trabajo, *NPR4* parece ser requerida en la defensa basal contra patógenos y estar implicada en la comunicación cruzada entre las vías de señalización dependientes de *SA* y *JA* (Liu *et al.*, 2005). *NPR5* y *NPR6* están involucradas en el control de la simetría del crecimiento. El fenotipo de la mutante incluye la pérdida de la abscisión floral y efectos sobre la morfología de la simetría de las hojas y flores (Ha *et al.*, 2004; Hepworth *et al.*, 2005; Norberg *et al.*, 2005). *NPR1* parece ser el único miembro involucrado en la regulación positiva de la defensa a patógenos y de una manera dependiente de *SA* (Cao *et al.*, 1998).

Algunos trabajos han relacionado la participación del *SA*, de la proteína *NPR1* y de los genes *PR* en interacciones virus-planta (Liu *et al.*, 2002a; Whitham *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005; Love *et al.*, 2005; Senthil *et al.*, 2005; Ascencio-Ibañez *et al.*, 2008). En una interacción de tipo incompatible, el silenciamiento del gen *NPR1* en plantas de *N. benthamiana* generó un incremento del título viral del *TMV* en las hojas sistémicas y

una disminución en la expresión de *PR-1* a nivel local y sistémico (Liu *et al.*, 2002a). En plantas de *Arabidopsis* infectadas con el begomovirus *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV), la expresión de los genes de *NPR1*, *TGA1*, *TGA3*, *TGA5*, *PR1*, *PR2* y *PR5* mostraron un incremento cuando se comparaban con plantas sin infectar (Ascencio-Ibañez *et al.*, 2008). Park y colaboradores (2004), determinaron la actividad ribonucleasa de la proteína *PR-10* y su participación en una interacción de tipo incompatible entre plantas de *Capsicum annuum* y el TMV. Sus resultados demostraron incrementos en la expresión de *CaPR10* a nivel local y sistémico sugiriendo su participación en la respuesta de defensa a la infección viral.

PROTEÍNAS RELACIONADAS A LA PATOGÉNESIS (PR)

Si una planta es susceptible o resistente a un patógeno, probablemente es el resultado de la rapidez y la magnitud en que los mecanismos de defensa son activados y expresados (Van Loon *et al.*, 2006). Las proteínas PR son definidas como proteínas codificadas por la planta hospedera, inducidas en situaciones patológicas o relacionadas y representan el principal cambio cuantitativo de proteínas solubles durante la respuesta de defensa (Stintzi *et al.*, 1993; Van Loon *et al.*, 1994). Las proteínas PR fueron reportadas por primera vez en plantas de tabaco infectadas con un patógeno viral (Van Loon y Van Kammen, 1970); sin embargo, también son inducidas por hongos (Niderman *et al.*, 1995), bacterias, (Reimann y Dudler, 1993), viroides (Ruíz-Medrano *et al.*, 1992), insectos (Ryan, 1990) y nemátodos (Rahimi *et al.*, 1996).

Las proteínas PR han sido clasificadas en 17 familias en base a sus propiedades bioquímicas y biológicas, así como el orden en el que fueron apareciendo (**Cuadro 1.1**) (Van Loon *et al.*, 2006). También son consideradas como marcadores moleculares de la HR y la SAR, debido a que se han observado altos niveles de expresión de los genes *PR* durante estos eventos (Lawrence *et al.*, 1996; Van Loon *et al.*, 2006). La familia de proteínas *PR-10* ha sido relacionada directamente en la defensa viral (Van Loon *et al.*, 2006). En una interacción de tipo incompatible entre plantas de *Capsicum annuum* y el *Tobacco mosaic virus* (TMV) se encontraron altos niveles de expresión de *PR-10* en hojas inoculadas y sistémicas, además se demostró que la proteína presentaba actividad ribonucleasa en contra del ARN viral del TMV (Park *et al.*, 2004).

CAPÍTULO I

Cuadro 1.1. Familia de proteínas relacionadas a la patogénesis (Van loon, 2006).

Familia	Miembro	Actividad enzimática	Gen
PR-1	Tabaco PR-1	Desconocida	<i>Ypr1</i>
PR-2	Tabaco PR-2	β -1,3 glucanasa	<i>Ypr2</i> , [<i>Gns2</i> ('Glb')]
PR-3	Tabaco P, Q	Quitinasa tipo I,II,IV,V,VI,VII	<i>Ypr3</i> , <i>Chia</i>
PR-4	Tabaco R	Quitinasas tipo I y II	<i>Ypr4</i> , <i>Chid</i>
PR-5	Tabaco S	Traumatina	<i>Ypr5</i>
PR-6	Inhibidor de Jitomate I	Inhibidor de proteasas	<i>Ypr6</i> , <i>Pis</i> ('Pin')
PR-7	Jitomate P ₆₉	Endoproteasas	<i>Ypr7</i>
PR-8	Pepino	Quitinasa tipo III	<i>Ypr8</i> , <i>Chib</i>
PR-9	Tabaco	Peroxidasas	<i>Ypr9</i> , <i>Prx</i>
PR-10	Perejil	Ribonucleasa	<i>Ypr10</i>
PR-11	Tabaco Clase V	Quitinasa tipo III	<i>Ypr11</i> , <i>Chic</i>
PR-12	Rábano	Defensinas	<i>Ypr12</i>
PR-13	Arabidopsis TH12.1	Tionina	<i>Ypr13</i> , <i>Thi</i>
PR-14	Cebada LTP4	Proteína de transferencia de lípidos	<i>Ypr14</i> , <i>Ltp</i>
PR-15	Cebada OxOa	Oxalato oxidasa	<i>Ypr15</i>
PR-16	Cebada OxOLP	Oxalato oxidasa	<i>Ypr16</i>
PR-17	Tabaco PRp27	Desconocida	<i>Ypr17</i>

1.2 GEMINIVIRUS

Los geminivirus son una familia de virus de ADN que infectan a una gran variedad de cultivos vegetales de importancia económica, causando pérdidas económicas y limitando la producción agrícola en regiones tropicales y subtropicales del mundo (Rojas *et al.*, 2005). Algunos ejemplos de cultivos en donde los geminivirus causan grandes pérdidas económicas son el frijol (*Phaseolus vulgaris*), yuca (*Manihot esculenta*), algodón (*Gossypium herbaceum*), maíz (*Zea Mayz*), chile (*Capsicum annuum* y *Capsicum chinense*) y tomate (*Solanum lycopersicum*) (Polston y Anderson, 1997; Morales y Anderson, 2001; Legg y Fauquet, 2004).

Los geminivirus poseen un genoma compuesto por una o dos moléculas de ADN de cadena simple (ADNcs), cada una con un tamaño aproximado de 2.5-2.8 kb (Harrison, 1985; Rojas, 2005). Una segunda característica distintiva de los geminivirus es que su cápside forma icosaedros geminados, del cual deriva su nombre (del latín “geminus” que significa gemelo), con un tamaño aproximado de 18 nm de diámetro x 30 nm de largo (Zhang *et al.*, 2001; Rojas, 2005).

1.2.1 CLASIFICACIÓN DE LA FAMILIA GEMINIVIRIDAE

La familia Geminiviridae exhibe considerable diversidad en base a la estructura de su genoma, rango de hospederos y al insecto vector que las transmite. Basados en estas propiedades, los geminivirus se clasificaron en cuatro géneros: Mastrevirus, Curtovirus, Begomovirus y Topocuvirus (Fauquet *et al.*, 2008). Sin embargo, actualmente la familia Geminiviridae ha sido reclasificada por el ICTV, incluyendo a un nuevo género denominado Becurtovirus, cuyo miembro tipo es el *Beet curly top Iran virus* (BCTIV) (Heydarnejad *et al.*, 2012) (Cuadro 1.2).

CAPÍTULO I

Cuadro 1. 1. Clasificación de la Familia Geminiviridae (Fauquet et al., 2008; Heydarnejad et al., 2012)

Familia Geminiviridae				
Género	Miembro tipo	Rango de hospederos	Vector	Genoma
Mastrevirus	<i>Maize streak virus</i> (MSV)	Monocotiledóneas y dicotiledóneas	Chicharritas	Monopartita
Curtovirus	<i>Beet curly top virus</i> (BCTV)	Dicotiledóneas	Circulifer tenellus	Monopartita
Begomovirus	<i>Bean golden yellow mosaic virus</i> (BGYMV)	Dicotiledóneas	Bemisia tabaci	Monopartita ó Bipartita
Topocuvirus	<i>Tomato pseudo-curly top virus</i> (TPCTV)	Dicotiledóneas	Membrácidos	Monopartita
Becurtovirus	<i>Beet curly top Iran virus</i>	Dicotiledóneas	Circulifer haemathocephalus	Monopartita

1.2.2 BEGOMOVIRUS

Los geminivirus más numerosos y estudiados (más de 200 especies) son los del género begomovirus (Fauquet *et al.*, 2008) los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en zonas tropicales y subtropicales del mundo (Brown y Bird 1992; Brown, 1994; Morales y Anderson 2001; Brown, 2007). Los begomovirus son transmitidos por la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) e infectan potencialmente a todas las plantas dicotiledóneas. Los begomovirus causan enfermedades en cultivos vegetales de importancia económica, por ejemplo, la enfermedad de los mosaicos de la Yuca en el continente Africano que causa pérdidas anuales estimadas de más de dos mil millones de dólares (Thresh *et al.*, 1997; Legg y Fauquet, 2004). En Brasil las pérdidas ocasionadas por infecciones con begomovirus en cultivos de frijol, tomate, algodón, okra y col ocasionó pérdidas de cinco mil millones de dólares (Lima *et al.*, 2000). Cerca de 7 millones de hectáreas de cultivos

de tomate en 40 países han sido afectadas por el begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). Entre los países americanos afectados por el TYLCV se encuentran México, Cuba, República Dominicana, Jamaica, Venezuela y USA (Martínez *et al.*, 2003; Glick *et al.*, 2009).

Los síntomas típicos de la infección por begomovirus son, un severo enrollamiento de las hojas, aparición de mosaicos dorados y amarillos y una reducción en el tamaño de la planta y calidad de los frutos (Brown, 1996).

ORGANIZACIÓN DEL GENOMA

Los begomovirus poseen un genoma circular de ADNcs, pueden ser monopartitas o bipartitas (Figura 1.3) y se replican a través de intermediarios de ADN de cadena doble (ADNcd) por el mecanismo de círculo rodante (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Gutiérrez, 2000).

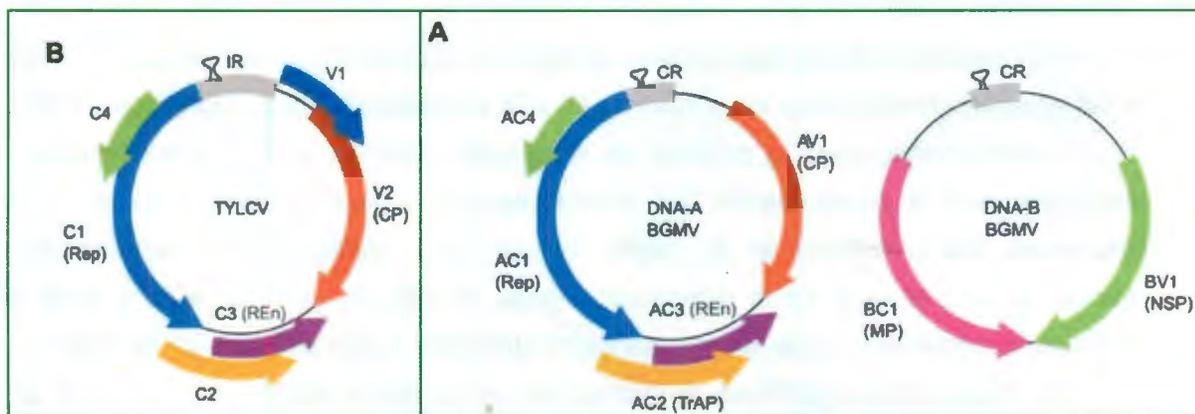


Figura 1.3. Esquema de la organización genómica de los begomovirus. A) bipartitas y B) monopartitas (Rojas, 2005).

El tamaño del genoma de los begomovirus bipartitas es de 5.2 a 5.4 kb, dividido en dos componentes llamados ADN-A y ADN-B, cada uno con un tamaño aproximado de 2.6 kb. (Harrison, 1985; Stanley *et al.*, 2005). Para la mayoría de los begomovirus bipartitas ambos componentes son necesarios para el establecimiento de una infección sistémica eficiente, sin embargo se han reportado que el *Tomato yellow leaf curl Thailand virus*

CAPÍTULO I

(TYLCTHV) y *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) dos begomovirus bipartitas, son capaces de inducir síntomas en plantas de *N. benthamiana* utilizando solamente al ADN-A en ausencia del cognate ADN-B (Rochester *et al.*, 1990; Saunders *et al.*, 2002; Briddon *et al.*, 2010).

Los genomas bipartitas comparten una región común (CR) de aproximadamente 200 nt, altamente conservada entre los componentes de las especies virales. En esta región se localiza una secuencia de nueve nucleótidos (TAATATTAC) flanqueada por repeticiones invertidas que potencialmente podría formar una horquilla, la cual funciona como el sitio de inicio de la replicación (Harrison 1985; Lazarowitz, 1992; Argüello-Astorga *et al.*, 1994; Eagle *et al.*, 1994; Gutiérrez, 2000). Ambos componentes contienen secuencias que codifican a proteínas en el sentido viral (V) ó en el sentido complementario (C) de la cadena. Los genes localizados en la cadena complementaria se expresan de forma temprana en el ciclo de vida del patógeno y los que están en el sentido viral en forma tardía (Xiong, 1998).

En el componente A de los begomovirus bipartitas se encuentran los genes que codifican a las proteínas involucradas en la replicación y la encapsidación del virus (Rojas, 2005). El gen *AV1* codifica para la proteína de la cápside (CP), es altamente conservada y requerida para la encapsidación del ADNcs, así como para la transmisión del virus (Harrison, 1985; Padidam *et al.*, 1995). El gen *AC1* codifica para la proteína Rep, necesaria para el inicio de la replicación. Posee un sitio de unión al ADN e inicia la replicación mediante un corte en el nonanucleotido localizado en el origen de replicación y también posee actividad ATPasa, la cual es requerida para la replicación (Fontes *et al.*, 1992; Hanley-Browdoin *et al.*, 1999). El gen *AC2* codifica para la proteína TrAP, cuya función es la de transactivar a los genes que se expresan en el sentido del virus (*AV1* y *BV1*). TrAp es una proteína que contiene una región N-terminal básica, una señal de localización nuclear (NLS), un dominio central del tipo de dedos de zinc y una región C-terminal que realiza la función de transactivación (Sunter y Bizaro 1992). El gen *AC3* codifica para la proteína Ren, involucrada en la regulación de la replicación a través de su interacción con la proteína Rep (Settlage *et al.*, 1996).

En el componente B de los begomovirus bipartitas se encuentran codificadas las proteínas involucradas en el movimiento viral (Rojas, 2005). El gen *BV1* codifica para una proteína involucrada en el transporte nuclear (NSP) del ADN viral de cadena sencilla, hacia dentro y fuera del núcleo de las células de la planta infectada (Sanderfoot *et al.*,

1996). La región C-terminal de la proteína NSP es requerida para su interacción con la proteína de movimiento (MP) codificada por el gen *BC1* (Sanderfoot y Lazarowitz, 1995; Sanderfoot *et al.*, 1996). La proteína del movimiento codificada por *BC1* es importante para el movimiento sistémico del virus a través del tejido vascular de la planta. Esta proteína es capaz de incrementar el tamaño de exclusión de los plasmodesmos y de potenciar el movimiento del ADN viral de célula a célula (Noueiry *et al.*, 1994; Pascal *et al.*, 1994).

A pesar de que los genes virales de los begomovirus monopartitas se encuentran en un solo componente, el número de genes y las funciones de las proteínas que codifican son análogos a la de los begomovirus bipartitas. Los genes en sentido complementario *C1*, *C2*, y *C3* realizan funciones análogas a *AC1*, *AC2* y *AC3* respectivamente. El gen *V1* es un determinante de la patogenicidad de los begomovirus monopartitas (Navot *et al.*, 1991; Wartig *et al.*, 1997). El gen *V2* codifica para la proteína de la cápside, ha sido implicada en el movimiento sistémico y la transmisión del virus por el insecto vector (Noris *et al.*, 1998)

1.1.2.1 *Euphorbia Mosaic Virus*- Yucatán Península (EuMV-YP)

El virus *Euphorbia mosaic virus* (EuMV) ha sido asociado con plantas de *Euphorbia heterophylla* sintomáticas en toda la región tropical y del Caribe del continente Americano (Costa y Bennett, 1950; Bird y Sanchez, 1971; Bird *et al.*, 1975). Plantas sintomáticas de *Euphorbia heterophylla* fueron reportadas por primera vez en Brasil (Costa y Bennett, 1950) y posteriormente en Puerto Rico (Bird *et al.*, 1975).

La caracterización molecular del genoma completo del EuMV se realizó a partir de aislados provenientes de plantas sintomáticas de *Euphorbia heterophylla* procedentes de la península de Yucatán (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007). La organización del genoma de EuMV-YP es típica de un begomovirus bipartita (**Figura 1.4 A**). El componente A tiene un tamaño de 2613 nt, mientras que el componente B de 2602 nt. El análisis de la secuencia completa del componente A de EuMV-YP comparte un porcentaje de identidad del 95% con el aislado de EuMV de Puerto Rico, además los dos componentes virales comparten una región común (CR) de 165 nt con un 86% de identidad. La región común CR presenta características distintivas de los geminivirus, conteniendo el origen de replicación compuesto por una estructura en forma de horquilla y la secuencia conservada de nonanucleótidos (TAATATTAC) (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007). (**Figura 1.4 B**).

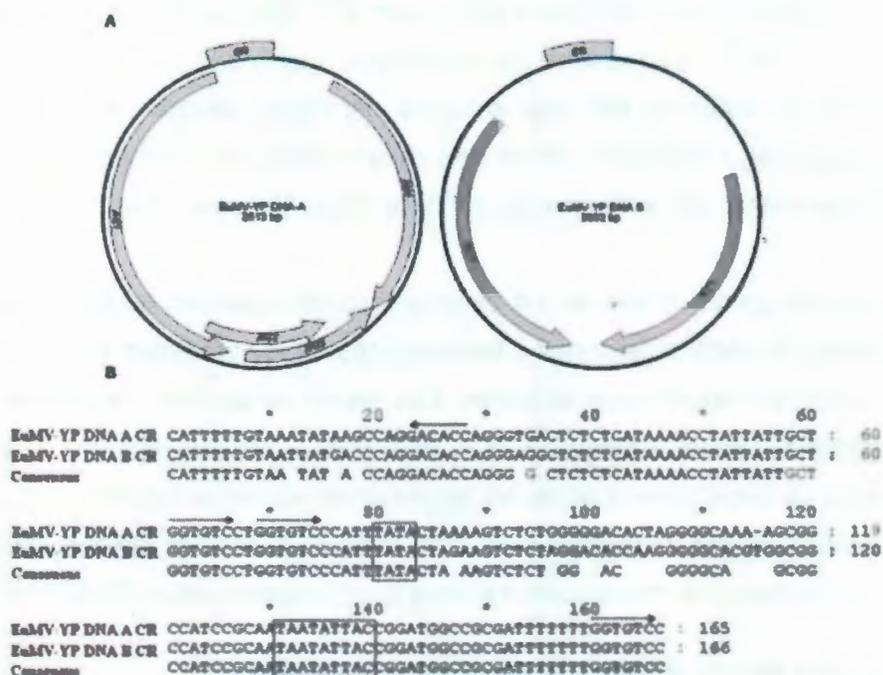


Figura 1.4. Diagrama de la organización del genoma del EuMV-YP. A) Mapa circular de la organización del genoma del EuMV-YP mostrando los componentes A y B. B) Alineamiento y localización de la región común (CR) del ADN-A y ADN-B del EuMV-YP (Hernández-Zepeda et al., 2007).

En Jamaica se ha reportado un aislado de EuMV (EuMV-JM) que infecta plantas de *E. heterophylla* y *W. amplissima*. El genoma presenta las mismas características que otros aislados reportados de EuMV (Collins et al., 2009). En Jalisco, México, plantas de Chile mostrando una variedad de síntomas característicos de la infección con el EuMV como son el enchinamiento en las hojas, mosaicos amarillos, deformaciones en los frutos y una disminución en el crecimiento de la planta, a partir de estas plantas se obtuvo un aislado denominado EUMV-Jal (Gregorio-Jorge et al., 2010). También se ha reportado un aislado del EuMV en plantas de *E. heterophylla* en Venezuela (EuMV-V). Experimentalmente plantas de *S. lycopersicum* y *Capsicum annum* fueron infectadas con EuMV-V, se observaron síntomas característicos de la infección como son mosaicos amarillos y un enchinamiento de las hojas (Zambrano et al., 2012).

RANGO DE HOSPEDERO EXPERIMENTAL DEL EuMV-YP

El rango de hospederos experimental reportado a la fecha del EuMV-YP esta conformado por cinco especies representativas de tres familias de plantas (Euphorbiaceae, Fabaceae y Solanaceae). Los hospederos experimentales identificados fueron: frijol (*Phaseolus vulgaris* cv. Top Crop), *Datura stramonium*, *Euphorbia heterophylla*, chile (*Capsicum annuum* cv. Anaheim) y tomate (*Solanum lycopersicon* cv. Humaya), mientras que el algodón blanco (*Gossypium hirsutum* cv. Delta), *Malva parviflora* y calabaza (*Cucurbita maxima* cv. Big Max) no presentaron susceptibilidad al EuMV-YP (Cuadro 1.3).

Cuadro 1. 3. Rango de hospedero experimental de EuMV-YP (Hernández-Zepeda et al., 2007)

Test plant	Plants with symptoms/ inoculated plants (%)
Cucurbitaceae	
<i>Cucurbita maxima</i> cv. Big Max	0/9 (0)
Euphorbiaceae	
<i>Euphorbia heterophylla</i>	9/9 (100)
Fabaceae	
<i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Top Crop	7/9 (78)
Malvaceae	
<i>Gossypium hirsutum</i> cv. Delta	0/9 (0)
<i>Malva parviflora</i>	0/9 (0)
Solanaceae	
<i>Capsicum annuum</i> cv. Anaheim	9/9 (100)
<i>Datura stramonium</i>	1/9 (11)
<i>Lycopersicon esculentum</i> cv. Humaya	5/9 (56)

Las especies susceptibles fueron identificadas en base a los síntomas presentados y por la detección del virus en hojas nuevas por PCR. Los síntomas de la infección por EuMV-YP incluyen manchas amarillas, mosaicos dorados y un moderado enrollamiento de las hojas emergentes. Los síntomas aparecieron de 7-12 días después de la inoculación (Figura 1.5).



Figura 1.5. Síntomas de plantas infectadas con EuMV-YP por biobalística (a) Chile, (b) frijol y (c) *Euphorbia heterophylla* (Hernández-Zepeda et al., 2007).

El rango de hospero experimental del EuMV-YP fue nuevamente evaluado en nuestro grupo de trabajo utilizando otras especies vegetales, que incluyen plantas modelo de estudio científico (*Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana*) y de importancia comercial (*Capsicum chinense*, *Jatropha curcas*, *Nicotiana tabacum* y *Ricinus comunis*). Los resultados obtenidos indicaron un 100% de infección de plantas de *N. benthamiana*, *N. tabacum* y *Ricinus comunis*, mientras que solo el 80% de las plantas de *Capsicum chinense* fueron infectadas por el EuMV-YP. Las plantas de *Arabidopsis thaliana* y *Jatropha curcas* no presentaron síntomas de la infección por EuMV-YP, sin embargo, el ADN viral pudo detectarse en las hojas sistémicas de la plantas. Los resultados obtenidos se muestran en el **cuadro 1.4** (Villanueva-Alonzo 2013, datos sin publicar).

Cuadro 1. 4. Rango de hospedero experimental de EuMV-YP (Villanueva-Alonzo 2013, datos sin publicar).

Especie	Plantas con síntomas/ plantas inoculadas	Plantas con ADN viral en hojas sistémicas/plantas inoculadas
<i>Arabidopsis thaliana</i>	0/10	10/10
<i>Capsicum chinense</i>	8/10	8/10
<i>Jatropha curcas</i>	0/4	4/4
<i>Nicotiana benthamiana</i>	10 / 10	10 / 10
<i>Nicotiana tabacum</i>	10/10	10/10
<i>Ricinus communis</i>	10/10	10/10

1.3 SILENCIAMIENTO GÉNICO INDUCIDO POR VIRUS (VIGS)

El silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) es una herramienta de la genética reversa utilizada para el análisis de la función de un gen. Es una técnica que emplea a virus recombinantes que reducen de forma específica la actividad de genes endógenos y se basa en el mecanismo del silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS por sus siglas en inglés) (Baulcombe, 1999). El PTGS fue descubierto en plantas de petunia y originalmente se le denominó co-supresión (Napoli *et al.*, 1990; Metzloff *et al.*, 1997), un fenómeno similar denominado “quelling” fue observado en *Neurospora crassa* (Cogoni y Macino, 1997) y “ARN de interferencia” (ARNi) en *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998).

El silenciamiento de ARN es un fenómeno altamente conservado entre los organismos eucariotas, la principal característica es el empleo de moléculas pequeñas de ARN de 21-26 nucleótidos que permiten la represión de secuencias homólogas a ellas (Almeida y Allshir, 2005). La molécula que desencadena el PTGS es un ARN de cadena doble (ARNcd) (Metzloff *et al.*, 1997; Fire *et al.*, 1998; Waterhouse *et al.*, 1998; Waterhouse *et al.*, 2001; Klahre *et al.*, 2002). Este ARNcd es reconocido y digerido en fragmentos más pequeños de 21-26 nt, denominados pequeños ARN de interferencia (ARNi) (Hamilton y Baulcombe, 1999; Martínez *et al.*, 2002) por la enzima DICER, la cual presenta actividad de ribonucleasa tipo III (Bernstein *et al.*, 2001). Estos ARNi bicatenarios son desapareados e incorporados con gasto de ATP al complejo multifactorial RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN) que contiene, entre otras, al menos una proteína Argonauta (AGO), la cual se encarga de separar las cadenas sencillas antes de ser incorporadas al complejo (Matranga *et al.*, 2005).

La hebra antisentido de los ARNi es reconocida por RISC, cuyo blanco serán los ARNm de diversos genes con secuencias complementarias a dicha hebra. Según el grado de complementariedad pueden promover el corte del ARNm y así la inhibición de su traducción (Khvorova *et al.*, 2003). Los ARNi también pueden ser utilizados como cebadores específicos por la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), la cual transforma a los ARNcs blancos en ARNcd, convirtiéndose así en precursores de ARNi y amplificando la señal de silenciamiento (Lipardi *et al.*, 2001).

El sistema denominado “silenciamiento inducido por virus” (VIGS por sus siglas en inglés),

funciona bajo el siguiente principio: un vector viral que contiene la secuencia parcial del gen blanco es introducida dentro de la célula, la maquinaria celular reconoce la amenaza viral e inicia el silenciamiento génico como un mecanismo de defensa, destruyendo no solo a los transcritos de los genes virales sino, también a los transcritos del gen blanco (Ruiz *et al.*, 1998; Waterhouse *et al.*, 2001).

Los sistemas VIGS, junto con los estudios bioquímicos y genéticos, han sido extensamente utilizados en plantas para descifrar las funciones de un gran número de genes participantes en el crecimiento y el desarrollo (Saitoh y Terauchi, 2002; Darnet y Rahier, 2004; Liu *et al.*, 2004a), involucrados en respuestas de defensa (Liu *et al.*, 2002a Ekengren *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004b) y estrés abiótico (Senthil-Kumar *et al.*, 2008). Por otro lado, mediante el empleo de los sistemas VIGS ha sido posible estudiar la función de genes en especies de plantas recalcitrantes a la transformación (Park *et al.*, 2004) y de genes que por mutaciones sería imposible estudiarlas debido a que son necesarios para la sobrevivencia de las plantas (Ratcliff *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004a). La metodología es relativamente simple, la inoculación de las plantas puede ser por agroinfiltración ó biobalística, los resultados se obtienen rápidamente de entre dos a tres semanas posteriores a la inoculación y es posible silenciar múltiples copias del gen (Purkayastha y Dasgupta 2009; Senthil-Kumar y Mysore, 2011).

1.3.1 VIRUS MODIFICADOS PARA EL DESARROLLO DE SISTEMAS VIGS

En los últimos años varios genomas virales han sido modificados para generar vectores VIGS. El primer vector VIGS diseñado fue a partir del *Tobacco mosaic virus* (TMV), un virus de ARN (Kumagai *et al.*, 1995). Otro vector VIGS diseñado es el basado en el *Potato virus X* (PVX) (Ruiz *et al.*, 1998). Aunque el vector es más estable que el TMV, éste tiene un rango de hospedero limitado (Brunt *et al.*, 1996). Ambos vectores presentan algunas desventajas: generan síntomas severos de enfermedad en las plantas, haciendo difícil la interpretación de los resultados y además estaban limitados en puntos de crecimiento como los meristemas, evitando el silenciamiento en estos tejidos (Ratcliff *et al.*, 2001). Algunos virus de ADN modificados como vectores VIGS incluyen al *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) utilizado para el silenciamiento de transgenes, genes meristemáticos y no meristemáticos en tomate (Kjemtrup *et al.*, 1998; Peele *et al.*, 2001), el *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV), utilizado para el silenciamiento de genes en

CAPÍTULO I

Arabidopsis (Turnage *et al.*, 2002), el *African cassava mosaic virus* (ACMV) para el silenciamiento en Yuca (Fofana *et al.*, 2004), el *Pea early browning virus* (PEBV) para el silenciamiento en chicharro (Constantin *et al.*, 2004) y el *Bean pod mottle virus* (BPMV) para el silenciamiento en frijol (Zhang y Ghabrial 2006).

El *Tobacco rattle virus* (TRV), un virus de ARN, también ha sido modificado para ser utilizado como vector de silenciamiento. La ventaja del vector VIGS basado en el TRV es la fácil introducción del vector en la planta, usualmente mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Liu *et al.*, 2002b). Otra propiedad del TRV es que los síntomas causados son más leves comparados con otros virus y puede propagarse en toda la planta, incluyendo tejido meristemático (Ratcliff *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002a; Liu *et al.*, 2002b). El vector VIGS basado en el TRV ha sido utilizado para el silenciamiento de genes en un gran número de plantas que incluyen: *Nicotiana benthamiana* (Ratcliff *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002a) tomate (Liu *et al.*, 2002b; Fu *et al.*, 2005), chile (*Capsicum annuum*) (Chung *et al.*, 2004), papa (*Solanum tuberosum*) (Brigneti *et al.*, 2004), petunia (Chen *et al.*, 2004) y *A. thaliana* (Burch-Smith *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006a).

1.4 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Silenciar de manera transitoria al gen *NPR1* en plantas de *Nicotiana benthamiana* utilizando al vector VIGS *EuMV-YP:ΔAV1*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar el nivel de expresión de *NPR1* en la interacción *Nicotiana benthamiana*- *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1*.

Evaluar el efecto del silenciamiento de *NPR1* en la generación de síntomas y en el título viral en la interacción *Nicotiana benthamiana* - *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1*.

1.5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

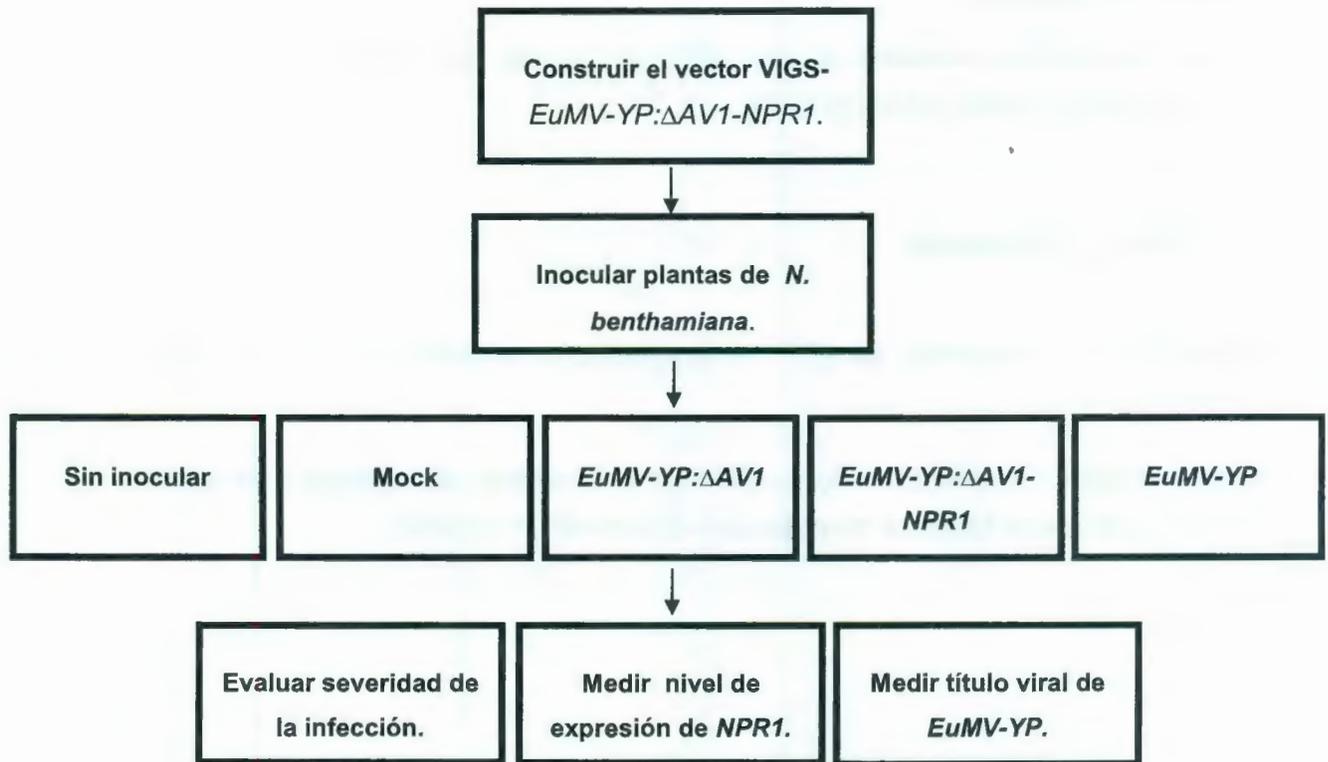


Figura 1.6. Estrategia experimental para evaluar el papel de *NPR1* en la interacción *Nicotiana benthamiana*- *EuMV-YP:ΔAV1*.

BIBLIOGRAFÍA

Almeida R. y Allshire C. (2005). RNA Silencing and genome regulation. *Trends in Cell Biology*, 15: 251-258.

Argüello-Astorga G.R., Guevara-González R.G., Herrera-Estrella L.R., Rivera-Bustamante R.F. (1994). Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: A model for replication. *Virology*, 203: 90-100.

Apel K. y Hirt H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55: 373-399.

Apostol I., Heinstejn P.F. y Low P.S. (1989). Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Role in defense and signal transduction. *Plant Physiol.*, 90: 106-16.

Ascencio-Ibáñez T., Sozzani R., Lee T.J., Chu T.M., Wolfinger R., Cella R., y Hanley-Bowdoin L. (2008). Global analysis of *Arabidopsis* gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during Geminivirus Infection. *Plant Physiol.*, 148: 436-454.

Aravind L. y Koonin E.V. (1999). Fold prediction and evolutionary analysis of the POZ domain: structural and evolutionary relationship with the potassium channel tetramerization domain. *J. Mol. Biol.*, 285: 1353-1361.

Babior B.M. (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood*, 93: 1464-76.

Baker C.J. y Orlandi E.W. (1995). Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopath.*, 33: 299-321.

Baulcombe D.C. (1999). Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr. Opin. Plant. Biol.*, 2: 109-113.

Bernstein E, Caudy A.A., Hammond S.M. y Hannon G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409: 363-366.

Bird J. y Sánchez J. (1971). Whitefly-transmitted viruses in Puerto Rico. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, 55: 461-467.

Bird J., Sánchez J., Rodríguez R.L. y Juliá F.J. (1975). Rugaceous (whitefly-transmitted) viruses in Puerto Rico. *Tropical Diseases of Legumes*. New York, USA: Academic Press, 3-25.

CAPÍTULO I

Briddon R.W., Patil B.L., Bagewadi B., Nawazul-Rehman M.S. y Fauquet C. (2010). Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 97.

Brigneti G., Martin-Hernandez A.M., Jin H., Chen J., Baulcombe D.C., Baker B. y Jones J.D. (2004). Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *Plant J.*, 39: 264–272.

Brown J.K. (1994). Current status of *Bemisia tabaci* as a pest and virus vector in world agro-ecosystems. *FAO Plant Prot. Bull.*, 42: 3–32.

Brown J.K. (1996). Molecular Biology and epidemiology of Subgroup III, Geminiviridae. *Plant microbe Interactions Review Series*, Chapman and Hall, Capítulo, 5: 125-195.

Brown J.K. (2007). The *Bemisia tabaci* complex: genetic and phenotypic variability drives begomovirus spread and virus diversification. *Plant Disease Feature*, January. <http://www.apsnet.org/online/feature/btabaci/>.

Brown JK, Bird J. (1992). Whitefly transmitted geminiviruses and associated disorders in the American and the Caribbean basin. *Plant Disease* 76:220-225.

Brunt A.A., Crabtree K., Dallwitz M.J., Gibbs A.J., Watson L. y Zurcher, E.J.E. (1996). *Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database*. Version: 20th August 1996. URL: [http:// image.fs.uidaho.edu/vide/descr803.htm#Range](http://image.fs.uidaho.edu/vide/descr803.htm#Range).

Burch-Smith M., Schiff M., Liu Y. y Dinesh-Kumar S. P. (2006). Efficient virus-induced gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 142: 21–27.

Cao H., Bowling S.A., Gordon S. y Dong X. (1994), Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 6: 1583-1592.

Cao H., Glazebrook J., Clark J.D., Volko S. y Dong, X. (1997). The *Arabidopsis NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, 88: 57–64.

Cao H., Li X. y Xinnian D. (1998) Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *PNAS*, 95: 6531-6536.

Carrington J.C., Kristin D.K., Sunita K M. y Mary C.S. (1996). Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *The Plant Cell*, 8: 1669-1681.

Chandra S. y Low P.S. (1997). Measurement of Ca²⁺ fluxes during elicitation of the oxidative burst in aequorin-transformed tobacco cells. *J. Biol. Chem.*, 272: 28274-28280.

Chen J.C., Jiang C.Z., Gookin T.E., Hunter D.A., Clark D.G. y Reid M.S. (2004). Chalcone synthase as a reporter in virus-induced gene silencing studies of flower senescence. *Plant Mol Biol.*, 55: 521-30.

Chen S. M. (2008). Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Science*, 15: 101-114.

Chung E., Seong E., Kim Y.C., Chung E.J., Oh S.K., Lee S., Park J.M., Joung Y.H. y Choi D. (2004). A method of high frequency virus-induced gene silencing in chili pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Bukang). *Mol. Cells*, 17: 377–380.

Cogoni C. y Macino G. (1997). Isolation of quelling-defective (*qde*) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. *PNAS*, 94: 10233–10238.

Collins A.M., Brown J.K., Rehman M.M., Roye M.E. (2009). Complete nucleotide sequence of an isolate of *Euphorbia mosaic virus* that infects *Euphorbia heterophylla* and *Wissadula amplissima* in Jamaica. *Arch Virol*, 154: 1859-1860.

Collins, T., Stone, J.R., and Williams, A.J. (2001). All in the family: The BTB/POZ, KRAB, and SCAN domains. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3609–3615.

Constantin G.D., Krath B.N., MacFarlane S. A., Nicolaisen M., Johansen I. E. y Lund O. S. 2004. Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species. *Plant J.*, 40: 622.

Costa A.S. y Bennett C.W. (1950). Whitefly transmitted mosaic of *Euphorbia prunifolia*. *Phytopathology*, 40: 266–283.

Darnet S. y Rahier A. (2004). Plant sterol biosynthesis: identification of two distinct families of sterol 4 alpha-methyl-oxidases. *Biochem. J.*, 378: 889–898.

Dempsey D.A., Shah J. y Klessig D.F. (1999). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit Rev Plant Sci.*, 18: 547-575.

Delaney T.P., Uknes S., Vernooij B., Friedrich L., Weymann K. y Ryals J. (1994). A central role of salicylic acid in plant disease. *Science*, 266: 1247–1250.

CAPÍTULO I

Després C., DeLong C., Glaze S., Liu E y Fobert PR (2000). The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell*, 12: 279-290.

Després C., Chubak C., Rochon A., Clark R., Bethune T., Desveaux D. y Fobert PR. (2003). The *Arabidopsis* NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell*, 15: 2181-2191.

Dixon, R.A. y C.J. Lamb. (1990). Molecular communication in interactions between plant and microbial pathogen. *Annu. Rev. Plant Physiol: Mol. Biol.*, 41: 339-367.

Doke N. (1997). The oxidative burst: roles in signal transduction and plant stress In *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Edited by Scandalios JG. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 785-813.

Dong X. (2004) NPR1, all things considered. *Curr. Opin. Plant. Biol.*, 7: 47–552.

Durrant W.E. y Dong X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol.*, 42: 185-209.

Eagle P.A., Orozco B.M. y Hanley-Bowdoin L. (1994). A DNA-sequence required for geminivirus replication also mediates transcriptional regulation. *Plant Cell*, 6: 1157-1170.

Ebel, J. y Scheel, D. (1997). Signals in host-parasite interactions. In *The Mycota. Plant Relationships, Part A*, G.C. Carroll und P. Tudzynski, eds. (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag), 85-105.

Ekengren S.K., Liu Y., Schiff M., Dinesh-Kumar S.P. y Martin, G.B. (2003). Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in *Pto*-mediated disease resistance in tomato. *Plant J.*, 36: 905–917.

Fan W. y Dong X. (2002). In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 14:1377-1389.

Fauquet C.M., Briddon R.W., Brown J.K., Moriones E., Stanley J., Zerbini M. y Zhou X. (2008). Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Arch. Virol.*, 153: 783-821.

Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E. y Mello C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806–811.

Fontes E.P.B., Luckow V. A. y Hanley-Bowdoin L. (1992). A geminivirus replication protein is sequence specific DNA binding protein. *Plant Cell*, 4: 597-608.

Fobert P.R. y Després C. (2005). Redox control of systemic acquired resistance. *Curr. Opin. Plant. Biol.*, 8: 378–382.

Fofana I.B., Sangare A., Collier R., Taylor C. y Fauquet C.M. (2004). A geminivirus-induced gene silencing system for gene function validation in cassava. *Plant Mol. Biol.*, 56: 613–624.

Fu D.Q., Zhu B.Z., Zhu H.L., Jiang W.B. y Luo Y.B. (2005). Virus-induced gene silencing in tomato fruit. *Plant J.*, 43: 299–308.

Gaffney T., Friedrich L., Vernooij B., Negrotto D. y Nye G. (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, 261: 754–56.

Glick E., Levy Y., Gafni Y. (2009). The viral etiology of Tomato yellow leaf curl disease. *Plant Protect. Sci.*, 45: 81–97.

Gregorio-Jorge J., Bernal-Alcocer A., Bañuelos-Hernández B., Alpuche-Solís A., Hernández-Zepeda C., Moreno-Valenzuela O., Frías-Treviño G. y Argüello-Astorga G.R. (2010). Analysis of a new strain of *Euphorbia mosaic virus* with distinct replication specificity unveils a lineage of begomoviruses with short Rep sequences in the DNA-B intergenic region. *Virology Journal*, 7: 275.

Gutierrez C. (2000). DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *The EMBO Journal*, 19: 792–799.

Hanley-Bowdoin L., Settlage S.B., Orozco B.M., Nagar S. y Robertson D. (1999). Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 105-140.

Ha C.M., Jun J.H., Nam H.G. y Fletcher J.C. (2004). BLADE-ON- PETIOLE1 encodes a BTB/POZ domain protein required for leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 45: 1361–1370.

A.J. y Baulcombe D.C.(1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 286: 950–952.

Harrison B.D. (1985). Advances in geminivirus research. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 23: 83–96.

CAPÍTULO I

Heath M.C. (1998). Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 117-124.

Hepworth S. R., Zhang Y., McKim S., Li X. y Haughna G. (2005). BLADE-ON-PETIOLE-Dependent Signaling Controls Leaf and Floral Patterning in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17: 1434–1448.

Hernández-Zepeda C., Idris A.M., Carnevali G., Brown J.K. y Moreno- Valenzuela O.A. (2007). Molecular characterization and experimental host range of *Euphorbia mosaic virus Yucatan Peninsula*, a begomovirus species in the *Squash leaf curl virus* clade. *Plant pathology*, 56: 763-770.

Heydarnejad J., Keyvani N., Razavinejad S., Massumi H., Varsani A. (2012). Fulfilling Koch's postulates for beet curly top Iran virus and proposal for consideration of new genus in the family Geminiviridae. *Arch Virol*.

Huang Z., Yeakley J.M., Garcia E.W., Holdridge J.D., Fan J.B. y Whitham S. (2005). Salicylic acid-dependent expression of host genes in compatible *Arabidopsis*-virus interactions. *Plant Physiology*, 137: 1147–1159.

Jabs T., Dietrich R.A., Dangl J.L. (1996). Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science*, 273: 1853-1856.

Jabs T., Tschope M., Colling C., Hahlbrock K. y Scheel D. (1997). Elicitor stimulated ion fluxes and O₂ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *PNAS*, 94: 4800-4805.

Johnson C., Boden E. y Arias J. (2003). Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15:1846-1858.

Kessmann H., Staub T., Hofmann C., Maetzke T. y Herzog J. (1994). Induction of systemic Acquired disease resistance In Plants By Chemicals. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 32: 439-459.

Khvorova A., Reynolds A, y Jayasena S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115: 209–216.

Kinkema, M., Fan, W. y Dong, X. (2000). Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *The Plant Cell*, 12: 2339–2350.

Kjemtrup S., Sampson K.S., Peele C.G., Nguyen L.V. y Conkling M.A. (1998). Gene silencing from plant DNA carried by a geminivirus. *Plant J.*, 14: 91–100.

Klahre U., Crete P., Leuenberger S.A., Iglesias V.A. y Meins F. (2002). High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. *PNAS*, 99: 11981–11986.

Kumagai M.H., Donson J., Della-Cioppa G., Harvey D., Hanley K. y Grill L.K. (1995). Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *PNAS*, 92: 1679–1683.

Laloi C., Mestres-Ortega D., Marco Y., Meyer Y., Reichheld J.P. (2004). The *Arabidopsis* Cytosolic Thioredoxin *h5* Gene Induction by Oxidative Stress and Its W-Box-Mediated Response to Pathogen Elicitor. *Plant Physiol.*, 134: 1006-1016.

Lamb C y Dixon RA (1997).The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 48: 251- 275.

Lawrence C.B., Joosten M. y Tuzun S. (1996). Differential induction of pathogenesis-related proteins in tomato by *Alternaria solani* and the association of a basic chitinase isozyme with resistance. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 48: 361-377.

Lazarowits S. G. (1992). Geminiviruses: Genome Structure y gene function. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 11: 372-349.

Legg J.P y Fauquet C.M. (2004). Cassava mosaic geminiviruses in Africa. *Plant Mol. Biol.*, 56: 585–599.

Levine A., Pennell R.I., Alvarez M.E., Palmer R. y Lamb C. (1996). Calcium mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr Biol.*, 6: 427-437.

Li J., Brader G. y Palva, E.T. (2004). The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* 16: 319–331.

Li J., Brader G., Kariola T. y Palva E.T. (2006). WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *Plant J.*, 46: 477–491.

Lima L.H.C., Moretzohn M.C. y Oliveira M.R.V. (2000). Survey of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) biotypes in Brazil using RAPD markers. *Genet. Mol. Biol.* 23: 1–5.

Lipardi C., Wei Q. y Paterson B.M. (2001). RNAi as random degradative PCR: siRNA primers converts mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell*, 296: 1319-1321.

CAPÍTULO I

Liu Y., Schiff M., Marathe R., Dinesh-Kumar S.P. (2002a). Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* like genes are required for N-mediated resistance to *Tobacco mosaic virus*. *Plant J.*, 30: 415–429.

Liu Y., Schiff M. y Dinesh-Kumar S.P. (2002b). Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J.* 31: 777–786.

Liu L., Nakayama N., Schiff M., Litt A., Irish V.F. y Dinesh-Kumar S.P. (2004a). Virus induced gene silencing of a DEFICIENS ortholog in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Mol. Biol.* 54: 701-711.

Liu Y., Schiff M. y Dinesh-Kumar, S.P. (2004b) Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB transcription factors, COI1 and CTR1 in N-mediated resistance to *Tobacco mosaic virus*. *Plant J.*, 38: 800–809.

Liu G., Holub E.B., Alonso J.M., Ecker J.R. y Fobert P.R. (2005). An *Arabidopsis NPR1*-like gene, *NPR4*, is required for disease resistance. *Plant J.*, 41:304–318.

Love A.J., Wook Yun B., Laval V., Loake G.J. y Milner J. (2005). *Cauliflower mosaic virus*, a compatible pathogen of *Arabidopsis*, engages three distinct defense-signaling pathways and activates rapid systemic generation of reactive oxygen species. *Plant Physiol.*, 139: 935–948.

Lu R., Malcuit I., Moffett P., Ruiz M.T., Peart J., Wu A.J., Rathjen J.P., Bendahmane A., Day L. y Baulcombe D.C. (2003). High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *EMBO J.*, 22: 5690–5699.

Martinez J., Patkaniowska A., Urlaub H., Luhrmann R. y Tuschl T. (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, 110: 563–574.

Martinez Y., Quinones M., Fonseca D., Mirandal. (2003). National surveys of begomovirus in tomato crop in Cuba. *Revista de Proteccion Vegetal*, 18: 168–175.

Malamy J., Carr J.P., Klessig D.F. y Raskin I. (1990). Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, 250: 1002–4.

Matranga C., Tomari Y., Shin C., Bartel D.P. y Zamore P.D. (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*, 123: 607–620.

Métraux J.P., Signer H., Ryals J., Ward E., Wyss-Benz M., (1990). Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science*, 250: 1004–1006.

Metzlaff M., O'Dell M., Cluster P.D. y Flavell R.B. (1997). RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase. A silencing in petunia. *Cell*, 88: 845–854.

Morales F.J. y Anderson P.K. (2001). The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America—brief review. *Arch Virol.*, 146: 415-44.

Mou Z., Fan W. y Dong X. (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, 113: 935–944.

Napoli C., Lemieux C. y Jorgensen R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results unreversible co-suppression of homologous gene in trans. *Plant Cell*, 2: 279-289.

Navot N., Pichersky E., Zeidian M., Zamir D. y Czosnek H., (1991). *Tomato yellow leaf curl virus*: a whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component. *Virology*, 185: 151-161.

Norberg M., Holmlund M. y Nilsson, O. (2005). The Blade on Petiole genes act redundantly to control the growth and development of lateral organs. *Development*, 132: 2203–2213.

Noris E., Vaira A.M., Caciagli P., Masenga V., Gronenborn B., Accotto G.P. (1998). Amino acids in the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus that are crucial for systemic infection, particle formation, and insect transmission. *J.Virol.* 72: 10050–57.

Noueiry A.O., Lucas W.L. y Gilbertson R.L. (1994). Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*, 76: 925-932.

Osborn A.E. (1996). Preformed antimicrobial compounds and plants defense against fungal attack. *Plan Cell*, 8: 1812-1831.

Padidam M., Beachy R.N. y Fauquet C.F. (1995). Classification and identification of geminiviruses using sequence comparison. *J. Gen. Virol.*, 76: 246:263.

Park C.J., Kim K.J., Shin R., Park J.M., Shin Y.C. y Paek K.H. (2004). Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *Plant J.*, 37: 186–198.

Pascal E., Sanderfoot A.A., Ward B.M., Medville R., Turgeon R. y Lazarowitz S.G., (1994). The geminivirus BR1 movement protein binds single stranded DNA and localize to the cell nucleus. *Plant Cell*, 6: 995-1006.

CAPÍTULO I

Peele C., Jordan C.V., Muangsan N., Turnage M., Egelkrou E., Eagle P., Hanley-Bowdoin L. y Robertson D. (2001). Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived vectors. *Plant J.*, 27: 357–366.

Pintard L., Willems A. y Peter M. (2004). Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *EMBO J.*, 23: 1681–1687.

Polston J.E. y Anderson P.K. (1997). The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Dis.*, 81: 1358–69.

Purkayastha A. y Dasgupta I. (2009). Virus-induced gene silencing: A versatile tool for discovery of gene functions in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 967–976.

Rahami S., Perry R.N. y Wright D.J. (1996). Identification of pathogenesis-related proteins induced in leaves of potato plants infected with potato cyst nematodes, *Globodera* species. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 49: 49-59.

Ratcliff F., Martin-Hernandez A.M. y Baulcombe D.C. (2001). *Tobacco rattle virus* as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J.*, 25:237–245.

Reimann C. y Dudler R. (1993). cDNA cloning and sequence analysis of a pathogen-induced thaumatin-like protein from rice (*Oriza sativa*). *Plant physiol.*, 101: 1113-1114.

Rochester D.E., Kosiratana W. y Beachy R.N. (1990). Systemic movement and symptom production following agroinoculation with a single DNA of *Tomato yellow leaf curl* geminivirus (Thailand). *Virology*, 178: 520-526.

Rojas M., Hagen C., Lucas W. y Gilbertson R. (2005). Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and Emergence of Geminiviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43: 361–94.

Ruiz-Medrano R., Jimenez-Moralia B., Herrera-Estrella L. y Rivera- Bustamante R.F. (1992). Nucleotide sequence of an osmotin-like cDNA induced in tomato during viroid infection. *Plant Mol. Biol.*, 20: 1199-1202.

Ruiz M.T., Voinnet O. y Baulcombe, D.C. (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell*, 10: 937– 946.

Ryals J. A., Neuenschwander U.H. , Willits M.G., Molina A., Steiner H.Y. y Hunt M.D. (1996). Systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, 8: 1809–1819.

Ryan C.A. (1990). Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insect and pathogens. *Annu Rev. Phytopathol.*, 28: 425-449.

Sanderfoot A.A., Ingham D.J. y Lazarowitz S.G. (1996). The geminivirus BR1 movement protein contains domains essential for interaction with BL1 and nuclear localization. *Plant Physiol.*, 110: 23-33.

Sanderfoot A.A. y Lazarowitz S.G. (1995). Cooperation in viral movement: The geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. *Plant Physiol.*, 7: 1185-1194.

Saitoh H. y Terauchi R. (2002). Virus-induced silencing of FtsH gene in *Nicotiana benthamiana* causes a striking bleached leaf phenotype. *Genes Genetic Systems*, 77: 335-340.

Saunders K., Salim N., Mali V.R., Malathi V.G., Briddon R.W., Markham P.G. y Stanley J. (2002). Characterization of *Sri Lankan cassava mosaic virus* and *Indian cassava mosaic virus*: evidence for acquisition of a DNA B component by a monopartite begomovirus. *Virology*, 293: 63-74.

Scheel D. (1998). Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1: 305-310.

Shah J., Tsui F. y Klessig D.F. (1997). Characterization of a salicylic acid- insensitive mutant (*sai1*) of *Arabidopsis thaliana* identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the *tms2* gene. *Mol. Plant Microbe Interact*, 10: 69-78.

Senthil G., Liu H., Puram V.G., Clark A., Stromberg A., y Goodin M. M. (2005). Specific and common changes in *Nicotiana benthamiana* gene expression in response to infection by enveloped viruses. *J. Gen. Virol.*, 86: 2615-2625.

Senthil-Kumar M., Rame Gowda H.V., Hema Ramanna M. Kirankumar S. y Udayakumar M. (2008). Virus -induced gene silencing and its application in characterizing genes involved in water-deficit-stress tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 165: 1404-1421.

Senthil-Kumar M. y Mysore K.S. (2011). New dimensions for VIGS in plant functional genomics. *Trends in Plant Science*, 16: 656-665.

Settlage S.B., Miller A.B. y Hanley- Bowdoin L. (1996). Interactions between geminivirus replication proteins. *J. Virol.*, 70: 6790-95.

Spoel S.H., Koornneef A., Claessens S.M., Korzelius J.P., Van Pelt J.A., Mueller M.J., Buchala A.J., Métraux J-P., Brown R. y Kazan K. (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell*, 15: 760-770.

CAPÍTULO I

Stanley J, Bisaro D.M., Briddon R.W., Brown J.K., Fauquet C.M., Harrison B.D., Rybicki E.P. y Stenger D.C. (2005). Geminiviridae. Virus Taxonomy. VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses London: Elsevier/Academic Press
Fauquet C, Mayo M, Maniloff J, Desselberger U, Ball L, 301-326.

Sticher L., Mauch-Mani B., Métraux J.P. (1997). Systemic acquired resistance. Annu Rev Phytopath., 35: 235-270.

Stintzi A., Heitz T., Prasad V., Wiedemann- Merdinoglu S., Kaufmann S., Geoffroy P., Legrand M. y Fritig B. (1993). Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. Biochimie, 75: 687-706.

Sunter G. y Bizarro D.M. (1992). Transactivation of geminivirus *AR1* and *BR1* gene expression by the viral *AL2* gene product occurs at the level of transcription. Plant cell, 4: 1312-1331.

Subramaniam R., Desveaux D., Spickler C., Michnick S.W., Brisson N. (2001). Direct visualization of protein interactions in plant cells. Nat Biotechnol, 19: 769-772.

Tada Y., Spoel S.H., Pajeroska-Mukhtar K., Mou Z., Song J., Wang C., Zuo J., Dong X. (2008). Plant Immunity Requires Conformational Changes of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins. Science, 321: 952-955.

Tenhaken R., Levine A., Brisson L.F., Dixon R.A. y Lamb C. (1995). Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. PNAS, 92: 4158-4163.

Thresh J.M., Otim-Nape G.W., Legg J.P. y Fargette D. (1997). *African cassava mosaic virus* disease: the magnitude of the problem. Afri. J. Root Tub. Crops, 2: 13-19.

Turnage M.A., Muangsan N., Peele C.G. y Robertson D. (2002). Geminivirus-based vectors for gene silencing in *Arabidopsis*. Plant J., 30: 107-117.

Van den Heuvel S. (2004). Protein degradation: CUL-3 and BTB-partners in proteolysis. Curr. Biol., 14: R59-R61.

Van Loon L.C., Pierpoint W.S., Boller T. y Conejero V. (1994). Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. Plant Mol Biol Rep., 12: 245-264.

Van Loon L.C. (1997). Induced resistance in plants and role of pathogenesis-related proteins. Eur. J. Plant Pathol., 103: 35-270.

Van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol.*, 44: 135–162.

Van Loon L.C. y Van Kammen A. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun N N'.II. Changes in protein constitution after infection with *Tobacco mosaic virus*. *Virology*, 40: 199–211.

Villanueva-Alonso H. (2013). Desarrollo de un vector de silenciamiento basado en el EuMV-YP. Tesis doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.

Wang C., Cai X., Wang X. y Zheng Z. (2006a). Optimisation of *Tobacco rattle virus* induced gene silencing in *Arabidopsis*. *Funct. Plant Biol.*, 33: 347–355.

Wang D., Amornsiripanitch N. y Dong, X. (2006b). A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathog* 2: 1042-1050.

Wartig L., Kheyr-Pour A., Noris E., De Kouchkovsky F., Jouanneau F., Gronenborn B. y Jupin I. (1997). Genetic analysis of the monopartite *Tomato yellow leaf curl geminivirus* roles of V1, V2, and C2 ORFs in viral pathogenesis. *Virology*, 228: 132–140.

Waterhouse P.M., Graham M.W. y Wang M.B. (1998). Virus resistance and gene silencing in plants is induced by double stranded RNA. *PNAS*, 95: 13959–13964.

Waterhouse P.M., Wang M. y Lough T. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*, 411: 834–842.

Weigel R.R., Bauscher C., Pfitzner A. J. y Pfitzner U.M. (2001). NIMIN-1, NIMIN-2 and NIMIN-3, members of a novel family of proteins from *Arabidopsis* that interact with NPR1/NIM1, a key regulator of systemic acquired resistance in plants. *Plant Mol. Biol.*, 46: 143–160.

Weigel R.R., Pfitzner U.M. y Gatz C. (2005). Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates *PR* gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell.*, 17: 1279–1291.

Wildermuth M.C., Dewdney J., Wu G. y Ausubel F.M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defense. *Nature*, 414: 562-565.

Whitham S.A., Yang C., Goodin M.M. (2006). Global impact: elucidating plant responses to viral infection. *Mol Plant Microbe Interact*, 19: 1207–1215.

Xiong Z. (1998). "Single-stranded DNA viruses: Geminiviruses and their relatives". <http://ag.arizona.edu/~zxiong/gemini.html>.

CAPÍTULO I

Yu D., Chen C. y Chen Z. (2001). Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of *NPR1* gene expression. *Plant Cell*, 13: 1527–1540.

Zambrano K., Fernández-Rodríguez T. y Marys E. (2012). Molecular characterization of a new begomovirus that infects *Euphorbia heterophylla* and *Solanum lycopersicum* in Venezuela. *Arch Virol.*, 157: 379–382.

Zhang C. y Ghabrial S. A. (2006a). Development of *Bean pod mottle virus*-based vectors for stable protein expression and sequence-specific virus-induced gene silencing in soybean. *Virology*, 344: 401–411.

Zhang Yuelin, Cheng Yu Ti, Qu Na, Zhao Qingguo, Bi Donglin, and Li Xin. (2006b). Negative regulation of defense responses in *Arabidopsis* by two NPR1 paralogs. *The Plant Journal.*, 48: 647–656.

Zhang W., Olson N.H., Baker T.S., Faulkner L., Agbandje-McKenna M., Boulton M.I., Davies J.W., McKenna R. (2001). Structure of the *Maize streak virus* geminate particle. *Virology*, 279: 471– 477.

Zhang Y., Fan W., Kinkema M., Li X. y Dong X. (1999). Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *PNAS*, 96: 6523–6528.

Zhang Y.L., Tessaro M.J., Lassner M. y Li X. (2003). Knockout analysis of *Arabidopsis* transcription factors TGA2, TGA5, and TGA6 reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 15: 2647-2653.

Zhou J.M., Trifa Y., Silva H., Pontier D., Lam E., Shah J. y Klessig D.F. (2000). NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid. *Mol. Plant Microbe Interact*, 13: 191-202.

CAPÍTULO II**SILENCIAMIENTO GÉNICO DE *NPR1* EN LA INTERACCIÓN *N. BENTHAMIANA*- *EUMV-YP: ΔAV1*****2.1 INTRODUCCIÓN**

La resistencia sistémica adquirida (SAR) es una respuesta de defensa en plantas, inducida después de una infección local (Friedrich *et al.*, 1996; Sticher *et al.*, 1997). El inicio de la SAR requiere de la acumulación de ácido salicílico (SA) y la expresión coordinada de los genes que codifican a las proteínas relacionadas a la patogénesis (PR) (Van Loon *et al.*, 2006). Un regulador de la transducción de señales mediada por el SA y que permite la expresión de los genes *PR* es la proteína *NPR1* (Dong, 2001). Ensayos de doble híbrido han indicado que *NPR1* actúa a través de la activación de miembros de la familia de factores de transcripción del tipo TGA, permitiendo de esta forma la expresión de los genes *PR* (Zhang *et al.*, 1999; Després *et al.*, 2000). En plantas de *Arabidopsis* infectadas con el begomovirus *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV), se han observado incrementos en la expresión de los genes de *NPR1*, *TGA1*, *TGA3*, y *TGA5*, así como de los genes *PR1*, *PR2* y *PR5*, (Ascencio-Ibañez *et al.*, 2008). En otro trabajo realizado, en plantas de *N. benthamiana* el silenciamiento del gen *NPR1* comprometió la resistencia mediada por el gen *N* hacia el TMV, generando plantas más susceptibles a la infección y un incremento del título viral en hojas sistémicas (Liu *et al.*, 2002). En otras interacciones virus-planta, se ha reportado la participación de componentes de la vía de señalización del SA (Liu *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2005; Love *et al.*, 2005; Senthil *et al.*, 2005; Whitham *et al.*, 2006; Ascencio-Ibañez *et al.*, 2008), indicando de esta forma una respuesta de defensa a la infección viral mediada por esta vía.

En este capítulo se describe la metodología empleada y los resultados obtenidos de la evaluación del nivel de expresión de *NPR1* en la interacción *Nicotiana benthamiana*-*EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* y del efecto del silenciamiento de *NPR1* en la generación de síntomas y el título viral.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron semillas de *Nicotiana benthamiana* las cuales fueron colocadas en un recipiente con una mezcla de agrolita, vermiculita y tierra, en una relación de 1:1:3 respectivamente, para su germinación. Cuando las semillas germinaron, las plántulas fueron trasladadas a recipientes individuales de nieve seca de 4 Oz con la misma mezcla. Las plantas se mantuvieron en fotoperiodo 16 hrs luz y 8 hrs oscuridad a 25 °C. Las plantas fueron fertilizadas dos veces por semana con la solución comercial Ultra Fol Agro Grow a una concentración de 1 ml/L de agua.

OBTENCIÓN DEL VECTOR VIGS *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1*

Un fragmento de 237 pb del gen *NPR1* de *Capsicum annuum* (# de accesión: DQ648785.1) fue amplificado partiendo del ADNc del mismo. La secuencia de nt de los cebadores utilizados fue: NPR1F1: AGGAAGAAGATGGCTGATGC y NPR1R1: CCTTTCCTTCTTCAGTTGAC. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min., seguido por 30 ciclos a 95°C por 1 min., 55°C por 30 seg., 72°C por 1 min. y una elongación final a 72°C por 10 min. El fragmento obtenido fue purificado y ligado en el vector comercial pGEM-T Easy Vector (Promega) siguiendo las especificaciones del proveedor. El producto de ligación fue utilizado para transformar células de *E. coli* DH5α utilizando procedimientos estándares. El fragmento correspondiente del gen *NPR1* fue liberado del vector pGEM-T Easy utilizando las enzimas de restricción *SphI* y *PstI*. El fragmento fue purificado y ligado con la enzima ligasa T4 (Promega) al vector VIGS *EuMV-YP:ΔAV1* previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. La construcción obtenida, denominada *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1*, fue utilizada para transformar células de *E. coli* DH5α.

INOCULACIÓN DE PLANTAS DE *N. benthamiana*.

Plantas de *N. benthamiana* de 4-6 hojas verdaderas fueron inoculadas por bombardeo con micropartículas de oro previamente mezcladas con el ADN viral (Kjemtrup *et al.*, 1998; Turnage *et al.*, 2002). Partículas de oro de 1 μm de diámetro resuspendidas en 50 μl de alcohol absoluto a una concentración final de 0.6 mM, fueron mezcladas con 5 μg de ADN de cada componente viral, 50 μl de 2.5 M CaCl₂ y 20 μl de espermidina al 0.1 M. La

solución fue agitada en vortex por 3-5 min y después incubada en hielo por el mismo tiempo, luego fue centrifugada a 10,000 rpm por 15 seg. La pastilla se lavó con 250 µl de alcohol absoluto y fue nuevamente centrifugada a 10,000 rpm por 15 seg. La pastilla obtenida se resuspendió en 65 µl de alcohol absoluto. De ahí se tomaron 10 µl de la solución y se colocaron en un filtro millipore con poros de 1 cm de diámetro para cada disparo. Las plantas fueron bombardeadas a 30 psi a una distancia de 4 cm, se utilizó gas He y una pistola de bombardeo casero.

Las plantas fueron inoculadas con la construcción *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* y con los testigos correspondientes, el virus silvestre *EuMV-YP* y el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV*. Además, se mantuvieron plantas sin inocular e inoculadas solamente con partículas de oro (mock). Se utilizaron 10 plantas por tratamiento y el experimento se realizó en tres experimentos diferentes. La infección viral se determinó por PCR convencional, utilizando como templado el ADN total extraído de hojas sistémicas de plantas de *N. benthamiana* inoculadas con el *EuMV-YP*, *EuMV-YP:ΔAV1* y *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1*. Se utilizaron los cebadores denominados: REPF: GACACCAGGACACCAGCAAT y REPR: TTTGGGAACATCGCACTGAG que amplifican un fragmento de 148 nt del gen *AC1* que codifica a la Replicasa de *EuMV-YP*.

EXTRACCIÓN DE ARN Y CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *NPR1* POR PCR EN TIEMPO REAL

La extracción del ARN total fue realizada utilizando el método de Trizol (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del proveedor, a partir de hojas sistémicas de plantas sin inocular, inoculadas solamente con partículas de oro (mock) e inoculadas con el virus silvestre *EuMV-YP*, con el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1* y la construcción *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1*.

El ARN obtenido fue tratado con ADNasas (Epicentre) libres de ARNasas. La cadena de ADNc fue sintetizada a partir de 2.5 µg de ARN total utilizando el kit MMLV Reverse Transcriptase 1st-Strand cDNA Synthesis (Epicentre), para lo cual se utilizaron: 2.5 µl de buffer 10X MMLV-RT, 2.5 µl de DTT 0.1 M, 5 µl de DNTp's 10 mM, 1 µl de Oligo dT 10 mM y 2.5 µl de transcritasa reversa MMLV-RT a 10 U/µl. El volumen final de la reacción fue de 25 µl.

Para la cuantificación de la expresión del gen *NPR1* por PCR tiempo real se utilizó el kit Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), siguiendo las especificaciones

CAPÍTULO II

del proveedor. Se partió de 1 µl de ADNc a una concentración de 100 ng/µl, generado a partir de 2.5 µg de ARN total en un volumen final de 25 µl. La secuencia de nt de los cebadores utilizados fue: NPR1NtF: CAGGCGATGATTTGCGTATG y NPR1NtR: ATCTACTGTTGTCCTCTGTG los cuales amplifican un fragmento de 158 pb de *NPR1* de *Nicotiana tabacum* (# de accesoión: DQ837218.1). Como gen constitutivo se utilizó a la β -*tubulina* (# de accesoión: EF495259.1), la secuencia de nt de los cebadores utilizados fue: TUBF: GCACTTGAATCGGCTTATGG y TUBR: TATCCTCGGTGAACGCTTTG que amplificaron una región de 212 pb del gen. La cuantificación de los fragmentos sintetizados fueron determinados utilizando el equipo StepOne Software v2.2.2 -Real Time PCR sytem (Applied Biosystems). El programa de amplificación utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min., seguido por 35 ciclos a 95°C por 30 seg., 60°C por 30 seg., 72°C por 30 seg. y una elongación final a 72°C por 10 min.

EXTRACCIÓN DE ADN Y CUANTIFICACIÓN DEL TÍTULO VIRAL POR PCR EN TIEMPO REAL

La extracción de ADN total se realizó por el método de CTAB (Doyle y Doyle, 1990). Para la cuantificación del título viral, se partió de 100 ng de ADN total extraído a partir de hojas sistémicas de plantas inoculadas con el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1*, con la construcción *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* y con el virus silvestre *EuMV-YP*. Se utilizó el kit de PCR en tiempo real Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del proveedor. Los cebadores utilizados fueron: REPF: GACACCAGGACACCAGCAAT y REPR: TTTGGGAACATCGCACTGAG que amplifican un fragmento de 148 nt del gen *AC1* del *EuMV-YP* (# de accesoión: NC_008304.1). Como control se amplificó un fragmento del gen constitutivo β -*tubulina*. La cuantificación de los fragmentos amplificados se realizó mediante el equipo StepOne Software v2.2.2 -Real Time PCR sytem (Applied Biosystems). El programa de amplificación utilizado fue: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min., seguido por 35 ciclos a 95°C por 30 seg., 60°C por 30 seg., 72°C por 30 seg. y una elongación final a 72°C por 10 min.

2.3. RESULTADOS

ANÁLISIS *IN SÍLICO* DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS Y DE NUCLEÓTIDOS DE NPR1

El gen de *NPR1* codifica a una proteína que contiene dos dominios conservados de interacción proteína-proteína: el dominio de cuatro repeticiones de ankirina, responsable de la interacción de la proteína NPR1 con la familia de factores de transcripción TGA (Cao *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1999; Després *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000) y el dominio BTB/POZ (Broad-Complex, Tramtrack, and Bric-a-brac/Pox virus and Zinc finger) que contiene secuencias blanco para la degradación vía proteosoma a través del complejo Cullin 3 (Aravind y Koonin, 1999; Kinkema *et al.*, 2000; Collins *et al.*, 2001; Pintard *et al.*, 2004; Van den Heuvel, 2004). Con la finalidad de que el silenciamiento sea específico, se diseñaron cebadores que amplifican un fragmento del gen *NPR1* que codifique a una región no conservada de la proteína de *Capsicum annuum*. Para localizar dicha región se realizó un alineamiento de secuencias de aminoácidos reportadas en el GenBank de NPR1 de *Capsicum annuum* (# de acceso: DQ648785.1), NPR1 de *Capsicum chinense* (# de acceso: AM900559.1), NPR1 de *Nicotiana tabacum* (# de acceso de: DQ837218.1), NPR1 de *Arabidopsis* (# de acceso: AT1G64280) y NPR4 de *Arabidopsis* (# de acceso: AT4G19660) (**Figura 2.1**).

La secuencia completa de aminoácidos de NPR1 de *C. annuum* es de 582, donde el dominio BTO/BTB se localiza entre los aminoácidos 64 y 184, presentando un tamaño de 120 aa, mientras que el dominio conservado de las cuatro repeticiones de ankirina presenta un tamaño de 130 aa y se localiza entre los aminoácidos 258 y 388. Se localizaron tres regiones no conservadas de la proteína NPR1, la localizada en la región N-terminal de la proteína que corresponde a los primeros 63 aa, la región intermedia de 74 aa localizada entre los dos dominios conservados y la región C-terminal que presenta un tamaño de 194 aa.

A partir de la secuencia de nucleótidos de *NPR1* de *Capsicum annuum* que codifica la región C-terminal no conservada de la proteína, se diseñaron los cebadores NPR1F1: AGGAAGAAGATGGCTGATGC y NPR1R1: CCTTTCCTTCTTCAGTTGAC que amplifican un fragmento de 237 pb del gen de *NPR1* de *Capsicum annuum*. El fragmento se localiza entre los nt 1643 y 1879 de la secuencia completa del gen *NPR1* de *Capsicum annuum*.

Figura 2.1. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de NPR1 y localización de las regiones conservadas marcadas en rojo. NPR1C.c: NPR1 de *Capsicum chinense* (# de accesión AM900559.1); NPR1C.a: NPR1 de *Capsicum annuum* (# de accesión: DQ648785.1); NPR1N.t: NPR1 de *N.tabacum* (# de accesión de: DQ837218.1); NPR1Ara: NPR1 de *Arabidopsis* (# de accesión: AT1G64280) y NPR4Ara: NPR4 de *Arabidopsis* (# de accesión AT4G19660). El análisis se realizó utilizando el programa de alineamiento múltiple de secuencias Clustal W.

El fragmento amplificado fue utilizado para la construcción del vector de silenciamiento *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1*. Para determinar si el fragmento de 237 bp podría ser utilizado para silenciar a *NPR1* de *N. benthamiana*, se realizó un alineamiento de nucleótidos de la secuencia de *NPR1* de *Capsicum annuum* con la secuencia reportada de *NPR1* de *Nicotina tabacum*. Se utilizó la secuencia de nucleótidos de *NPR1* de *N. tabacum*, debido a que la secuencia para *N. benthamiana* no ha sido reportada.

El análisis *in silico* mostró que las secuencias completas de *NPR1* de *C. annuum* y de *N. tabacum* presentaron un 88% de similitud y 82% de identidad, mientras que el fragmento correspondiente de 237 pb presentó un 92% de identidad con la región correspondiente a la de *N. tabacum*. A pesar de que la secuencia de 237 nt de *Capsicum annuum* no presentó un 100% de identidad con la de *N. tabacum*, ésta contiene fragmentos con una secuencia de más de 23 nt con el 100% de identidad, indicando que dicha secuencia podría ser utilizada para silenciar a *NPR1* de *N. benthamiana* (Thomas *et al.*, 2001) (**Figura 2.2**).

CAPÍTULO II

```

NPR1C.a.   ATTGCTCAAGTTGATGGCACATCTGAGTTC4CCCCCTGGCTAGCATCAGGAAGAAGATGGCT
NPR1N.t.   ATTGCTCAAGTTGATGGCACTTCTGAGTTC4CCCACTGGCTAGCATCAGCAAAAAGATGGTT
*****
NPR1C.a.   GATGCACAGAGGACAACAGTGGATTTGAACGAAGCTCCTTTCAAGATGAAAGAGGAGCAC
NPR1N.t.   AATGCACAGAGGACAACAGTAGATTTGAACGAGGCTCCTTTCAGGATAAAAGAGGAGCAC
*****
NPR1C.a.   TTGAATCGGCTTATGGCGCTGTCTAGA1ACTGTGGA1ACTGGAAAACGCTTCTTTCCACGT
NPR1N.t.   TTGAATCGGCTTAGAGCACTCTCTAGA1ACTGTGGA1ACTGGAAAACGCTTCTTTCCACGA
*****
NPR1C.a.   TGTTCAGAAGTTCTAAATAAGATCATGGATGCTGATGACTTGTCTGAGATAGCTTACATG
NPR1N.t.   TGTTCAGAAGTTCTAAATAAGATCATGGATGCTGATGACTTGTCTGAGATAGCTTACATG
*****
NPR1C.a.   GGGAATGATACGCCAGAAGAGCGTCAACTGAAGAAGCAAAGGTACATGGA1ACTTCAAGAA
NPR1N.t.   GGGAATGATACGGCGGAAGAGCGTCAACTGAAGAAGCAAAGGTACATGGA1ACTTCAAGAA
*****

```

Figura 2.2. Región parcial del alineamiento de secuencias de nucleótidos de NPR1C.a: *NPR1* de *Capsicum annuum* (# de accesión del GenBank: DQ648785.1) y NPR1N.t: *NPR1* de *Nicotiana tabacum* (# de accesión de: DQ837218.1). En rojo, localización de la región de 237 nt utilizada para el silenciamiento.

OBTENCIÓN DEL VECTOR VIGS *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1*

El fragmento utilizado para el silenciamiento del gen *NPR1* de *Capsicum annuum* fue amplificado a partir del ADNc del mismo (**Figura 2.3**), el fragmento amplificado fue purificado y ligado al vector comercial pGEM-T Easy.

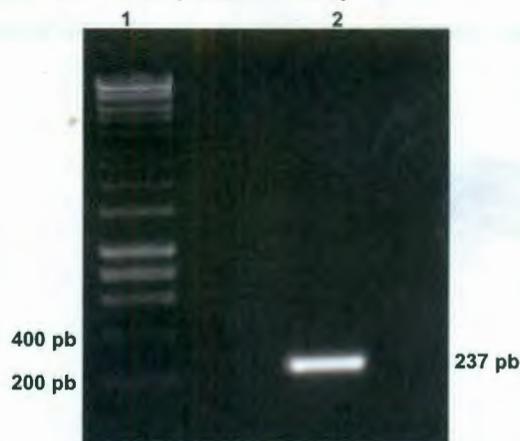


Figura 2.3. Amplificación por PCR convencional de un fragmento de 237 pb de *NPR1* de *Capsicum annuum* a partir del ADNc del mismo. Carril 1: marcador de peso molecular (Hiperladder 1) y carril 2: *NPR1*. Los cebadores utilizados son los denominados NPR1F1 y NPR1R1

La verificación de las colonias transformadas con la construcción *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* fue realizada por PCR convencional, utilizando como templado ADN plasmídico (Figura 2.4).

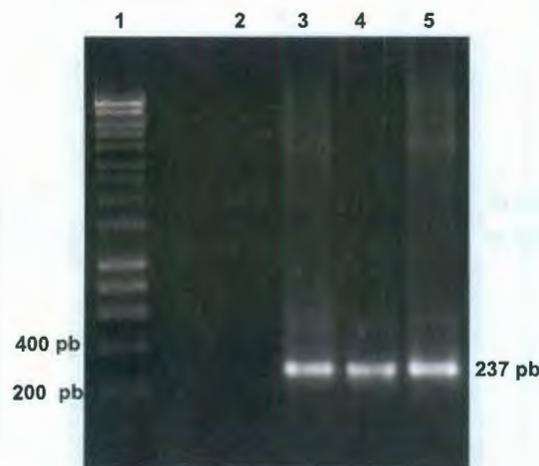


Figura 2.4. Verificación por PCR convencional a partir de ADN plasmídico de la obtención de las colonias transformadas con el vector *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1*. Carril 1: marcador de peso molecular (Hiperladder 1); carril 2: control negativo (Vector *EuMV-YP:ΔAV1*); carril 3: control positivo (pGEM-TEasy-*NPR1*); carril 4 y 5: ADN plasmídico de colonias transformadas con el vector *EuMV-YP:ΔAV1:NPR1*. Los cebadores utilizados son los denominados NPR1F1 y NPR1R1.

Para identificar los plásmidos recombinantes pGEM-T Easy-*NPR1* y *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* se utilizó a la enzima de restricción *Xba*I. El fragmento de 237 pb del gen *NPR1* contiene un único sitio de corte para la enzima *Xba*I ubicado en el nt 97 de la secuencia, mientras que el plásmido comercial pGEM-T Easy de 3015 pb no presenta ninguno sitio de corte para esta enzima. Así, la construcción pGEM-T Easy-*NPR1* presentaría un único sitio de corte para la enzima *Xba*I ubicado dentro de la secuencia de *NPR1*, por lo que al ser digerida sería linealizada. El tamaño teórico es de 3252 pb. Por otro lado, el vector *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* presenta un tamaño teórico de 5661 pb y dos sitios de corte para la enzima *Xba*I, una presente en el sitio múltiple de clonación del vector pBluescript II KS(+) como parte del vector VIGS *EuMV-YP:ΔAV1* localizada a 3431 pb del nt inicial y otra correspondiente al fragmento de 237 pb de *NPR1* localizada a 1282 pb del nt inicial, así la digestión con la enzima *Xba*I generó dos fragmentos, uno de 2100 pb

CAPÍTULO II

correspondiente al fragmento ubicado entre los dos sitios de corte de la enzima y otro de 3560 pb correspondiente al resto del vector (Figura 2.5).

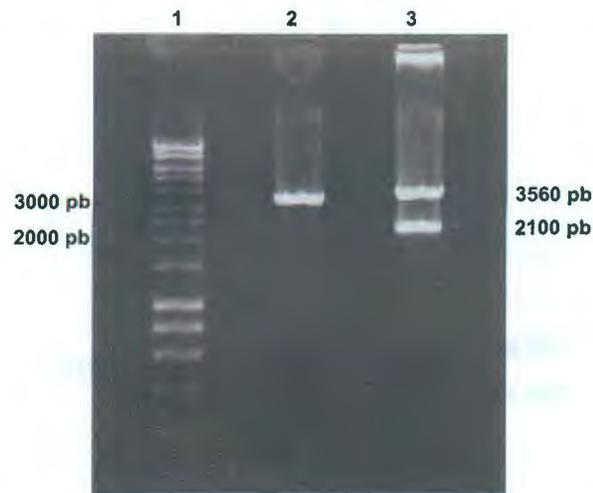


Figura 2.5 Verificación por digestión del vector pGEM-TEasy-NPR1 y *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1*. Carril 1: Hiperladder 1; carril 2: pGEM-TEasy-NPR1 digerido con *Xba*I (fragmento de 3252 pb); carril 3: *EuMV-YP:ΔAV1:NPR1* digerido con *Xba*I (fragmentos 2100 y 3560 pb).

SECUENCIACIÓN DEL INSERTO CLONADO EN EL VECTOR pGEM-T Easy- NPR1

La región aguas abajo a partir del promotor T7 del vector pGEM-T Easy- NPR1, utilizado para la obtención del vector *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* fue secuenciada. El análisis de la secuencia de nucleótidos confirmó la presencia del fragmento de 237 nt de NPR1. La Figura 2.6 muestra parte de los resultados de la secuenciación correspondiente a la localización de los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *Sac*II, *Not*I, *Eco*RI y *Spe*I del vector pGEM-T Easy y de la secuencia de 237 nt de NPR1. La secuencia de 237 nt de NPR1 fue alineada con la secuencia correspondiente de NPR1 de *Capsicum annumm* reportada utilizando el programa de Clustal W. Se obtuvo un 99% de identidad, lo anterior sugiere que la secuencia de NPR1 utilizada para la construcción del vector *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* corresponde al fragmento del 237 nt del gen que codifica parte de la región C-terminal de la proteína NPR1 (Figura 2.7).

SacII **NotI** **EcoRI**
CGGGCCGCGGGAATTCGATTAGGAAGAAGATGGCTGATGCACAGAGGACAACAGTGG
ATTGAACGAAGCTCCCTTCAAGATGAAAGAGGAGCACTTGAATCGGCTTATGGCGCTG
AGAACTGTGGAACCTTGAAAAACGCTTCTTTCCACGTTGTTTCAGAAGTTCTAAATAAGACA
TGGATGCTGATGACTTGTCTGAGATAGCTTACATGGGGAATGATACGCCAGAAGAGC
GTCAACTGAAGAAGGAAAGGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGC
SpeI EcoRI NotI

Figura 2.6 Secuencia parcial de nucleótidos del vector pGEM-T Easy- *NPR1*. Localización de los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *SacII*, *NotI*, *EcoRI* y *SpeI* (marcados con diferentes colores) del vector pGEM-T Easy y la secuencia de 237 nt de *NPR1*.

NPR1 Sec.	AGGAAGAAGATGGCTGATGCACAGAGGACAACAGTGGATTTGAACGAAGCTCCCTTCAAG
NPR1 C.a	AGGAAGAAGATGGCTGATGCACAGAGGACAACAGTGGATTTGAACGAAGCTCCCTTCAAG *****
NPR1 Sec.	ATGAAAGAGGAGCACTTGAATCGGCTTATGGCGCTGTCTAGAACTGTGGAACCTTGAAAA
NPR1 C.a	ATGAAAGAGGAGCACTTGAATCGGCTTATGGCGCTGTCTAGAACTGTGGAACCTTGAAAA *****
NPR1 Sec.	CGCTTCTTTCCACGTTGTTTCAGAAGTTCTAAATAAGATCATGGATGCTGATGACTTGTCT
NPR1 C.a	CGCTTCTTTCCACGTTGTTTCAGAAGTTCTAAATAAGATCATGGATGCTGATGACTTGTCT *****
NPR1 Sec.	GAGATAGCTTACATGGGGAATGATACGCCAGAAGAGCGTCAACTGAAGAAGGAAAGG
NPR1 C.a	GAGATAGCTTACATGGGGAATGATACGCCAGAAGAGCGTCAACTGAAGAAGCAAAGG *****

Figura 2.7 Alineamiento del fragmento de 237 nt secuenciado de *NPR1* (*NPR1* sec.) con la secuencia reportada correspondiente a dicha región de *NPR1* de *Capsicum annuum* (# de accesión: DQ648785.1) (*NPR1* C.a)

El fragmento de *NPR1* enviado a secuenciar fue amplificado a partir de ADNc de hojas de plantas de *Capsicum annuum* cv. Anaheim, mientras que la secuencia de *NPR1* reportada (# de accesión: DQ648785.1) y utilizada en el alineamiento pertenece a *Capsicum annuum* cv. Guiyan5, esto puede explicar en parte el porqué no se obtuvo un 100% de identidad. Por otra parte, pudiera deberse a un error generado durante la secuenciación. Diferentes tasas de error han sido reportadas para la Taq polimerasa como consecuencia de no presentar actividad correctora 3'-5' (Tindall *et. al.*, 1988; Barnes *et. al.*, 1992). Durante la PCR es poco probable que se hayan generado errores debido a que el tamaño del fragmento amplificando es relativamente pequeño.

CAPÍTULO II

SEVERIDAD DE LA INFECCIÓN EN PLANTAS INOCULADAS CON EL VECTOR *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1*

Para evaluar la severidad de la infección en los diferentes tiempos post-inoculación en plantas inoculadas con el vector de silenciamiento *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1*, se utilizó una escala arbitraria de severidad elaborada, enumerada del 0 al 6, donde el valor 0 indica la ausencia de síntomas en las plantas y el valor 6 describe los síntomas más severos de la infección con *EuMV-YP* (Villanueva-Alonzo, 2013) (**Cuadro 2.1**). Los niveles de severidad también fueron evaluados con la misma escala en plantas inoculadas con el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1* y el virus silvestre *EuMV-YP*, basándose en la misma escala.

Cuadro 2.1. Niveles de severidad de la infección por *EuMV-YP* (Villanueva-Alonzo, 2013).

Nivel de severidad	Síntomas en las últimas 6 hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> causados por la infección de <i>EuMV-YP</i> .
0	Asintomática
1	Ligeros mosaicos
2	Mosaicos y ondulaciones sin curvatura de la periferia hacia abajo
3	Mosaicos, ondulaciones y ligera curvatura hacia abajo en la periferia
4	Mosaicos, ondulaciones y curvaturas hacia abajo en la periferia
5	Enrollamiento parcial
6	Enrollamiento total con mosaicos.

Los diferentes síntomas observados a los 7, 14, 21 y 28 dpi en plantas de *N. benthamiana* infectadas con *EuMV-YP:ΔAV1*, *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* y *EuMV-YP* fueron clasificados de acuerdo a la escala de severidad. Los resultados fueron resumidos en la **figura 2.8**.

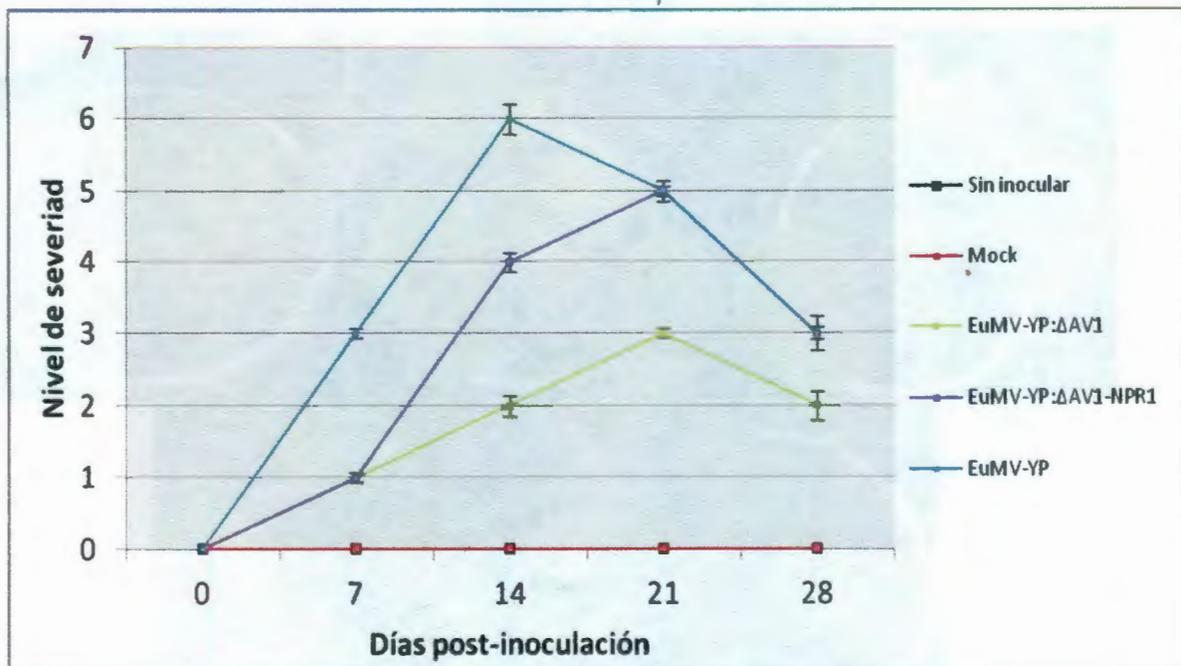


Figura 2.8. Niveles de severiad de plantas de *N. benthamiana* infectadas con *EuMV-YP:ΔAV1*, *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* y *EuMV-YP* a diferentes días post-inoculación.

A los 7 dpi las plantas inoculadas con los vectores *EuMV-YP:ΔAV1* y *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* presentaron síntomas foliares similares, los cuales fueron pequeños mosaicos amarillos en los sitios de infección, mientras que en las hojas nuevas los síntomas de la infección no fueron evidentes, ubicándose en el nivel 1 de la escala de severidad. En las plantas inoculadas con el virus silvestre *EuMV-YP* a los 7 dpi se pudo observar en las hojas nuevas pequeños mosaicos amarillos, adicionalmente se observaron ondulaciones y una ligera curvatura de los bordes de las hojas hacia abajo, síntomas que correspondían al nivel 3 de la escala de severidad (**Figura 2.8** y **Figura 2.9**).

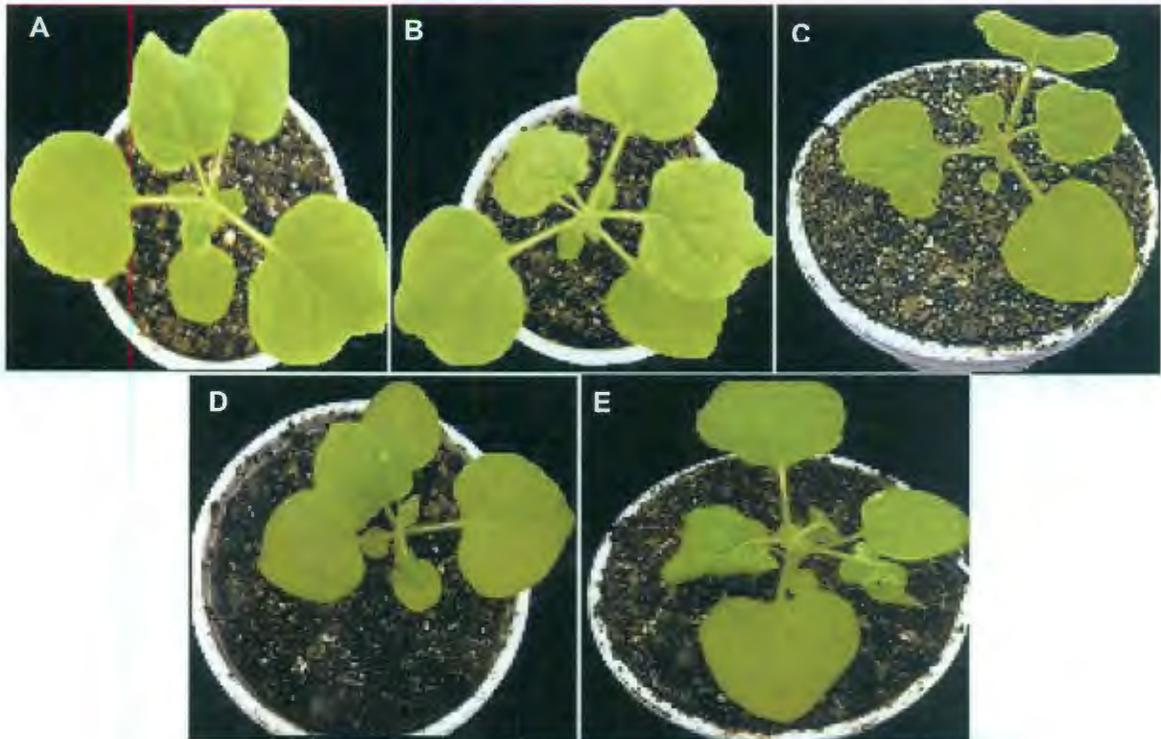


Figura 2.9. Síntomas observados en plantas de *N. benthamiana* a los 7 dpi. A: plantas sin inocular; B: mock inoculadas; C: inoculadas con *EuMV-YP:ΔAV1*; D: inoculadas con *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* y E: inoculadas con *EuMV-YP*.

A los 14 dpi en plantas inoculadas con *EuMV-YP:ΔAV1* se observaron síntomas correspondientes al nivel 2 de la escala de severidad, presentaron ondulaciones con los bordes ligeramente plegados hacia el envés, mosaicos amarillos principalmente en las nervaduras y deformaciones que se extendían a lo largo de la hoja. Las hojas nuevas solo presentaron ondulaciones con los bordes ligeramente plegados hacia el envés. Por otro lado, en plantas inoculadas con *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* se observaron síntomas correspondientes al nivel 4 de la escala, un mayor número de hojas presentaron ondulamientos con los bordes ligeramente plegados hacia el envés. En las hojas nuevas, los bordes se encontraban plegados casi completamente hacia el envés dando el aspecto de un arrugamiento, también presentaron deformaciones y mosaicos amarillos que se extendían en las nervaduras.

En plantas infectadas con el virus silvestre *EuMV-YP* se observaron síntomas más intensos de la infección en relación a los otros tratamientos. Las hojas inoculadas y nuevas se encontraban completamente enrolladas, presentaban deformaciones y mosaicos amarillos que se extendía por la hoja, ubicándose en el nivel más alto de la escala de severidad con un valor de 6 (Figura 2.8 y Figura 2.10).



Figura 2.10. Síntomas observados en plantas de *N. benthamiana* a los 14 dpi. A: plantas sin inocular; B: mock inoculadas; C: inoculadas con *EuMV-YP:ΔAV1*; D: inoculadas con *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* y E: inoculadas con *EuMV-YP*.

A los 21 dpi las hojas nuevas de las plantas inoculadas con *EuMV-YP:ΔAV1* presentaron ondulaciones en los bordes, ligeramente plegados hacia el envés y mosaicos amarillos que se extendía parcialmente en la hoja, síntomas descritos en el nivel 3 de la escala de severidad. Las hojas inferiores e inoculadas también presentaban ondulaciones en los bordes y mosaicos amarillos que se extendían por toda la hoja. Las plantas inoculadas

CAPÍTULO II

con *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* presentaron síntomas más severos que los observado a los 14 dpi, las hojas nuevas presentaron deformaciones y enchinamiento con los bordes plegados hacia el envés. También presentaron mosaicos amarillos en toda la hoja. Por otro lado, en plantas inoculadas con el virus silvestre *EuMV-YP* se observaban síntomas similares a los observados en plantas inoculadas con el vector de silenciamiento de *NPR1*, un enchinamiento con los bordes plegados hacia el envés y mosaicos amarillos en toda la hoja, ubicando a ambos tratamientos en el nivel 5 de la escala de severidad. Los síntomas observados en plantas inoculadas con el virus silvestre *EuMV-YP* a los 21 dpi fueron menos severos que los observados a los 14 dpi, debido a que las hojas nuevas presentaron una disminución en el enchinamiento y ondulaciones en los bordes (**Figura 2.8 y Figura 2.11**).

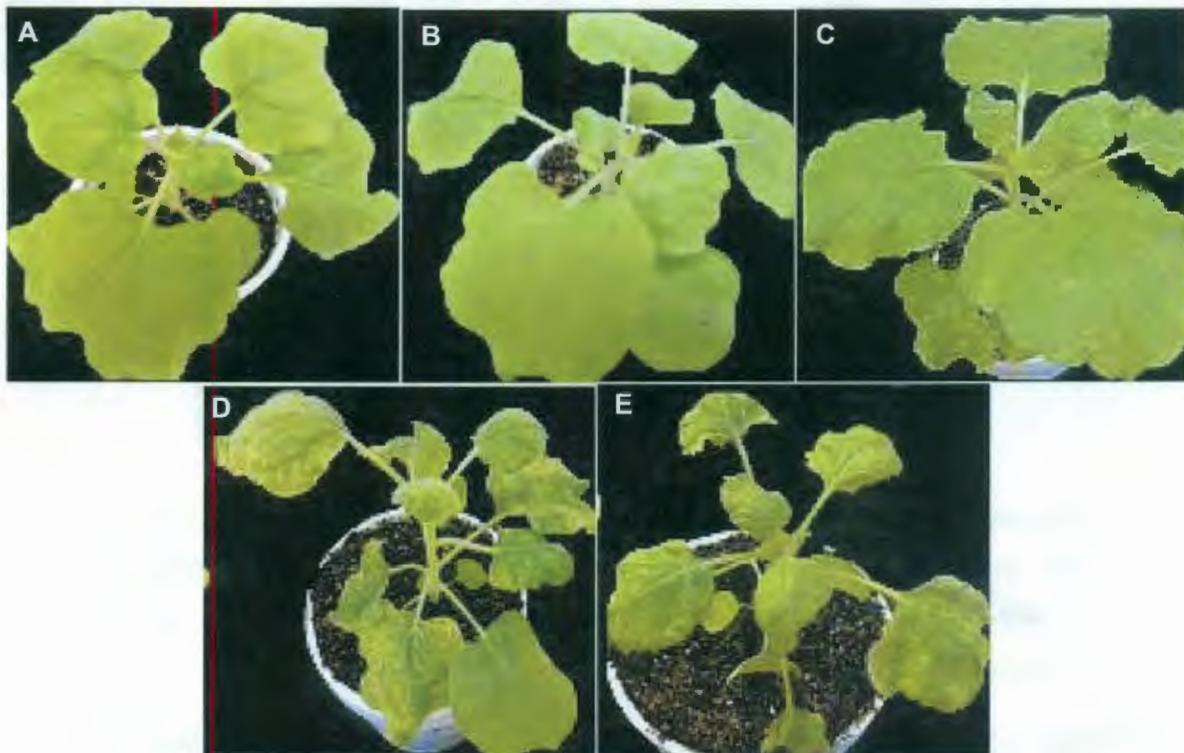


Figura 2.11. Síntomas observados en plantas de *N. benthamiana* a los 21 dpi. Plantas sin inocular: A: plantas sin inocular; B: mock inoculadas; C: inoculadas con *EuMV-YP:ΔAV1*; D: inoculadas con *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* y E: inoculadas con *EuMV-YP*.

A los 28 dpi se observó una remisión de síntomas en las plantas con los diferentes tratamientos. Las hojas nuevas de las plantas inoculadas con *EuMV-YP:ΔAV1* todavía presentaban ondulaciones con los bordes ligeramente plegados hacia el envés y algunos mosaicos amarillos, presentaron una disminución en el nivel de severidad con un valor de 2. En las hojas nuevas de las plantas inoculadas con *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* y *EuMV-YP* aun se pudo observar la presencia de mosaicos amarillos y un ligero plegamiento de los bordes hacia el envés, aunque en menor grado que el observado a los 21 dpi. El nivel de severidad alcanzado en ambos tratamientos fue de 3. Las plantas sin inocular y mock inoculadas permanecieron asintomáticas a lo largo de todo el curso temporal. (Figura 2.8 y Figura 2.12).

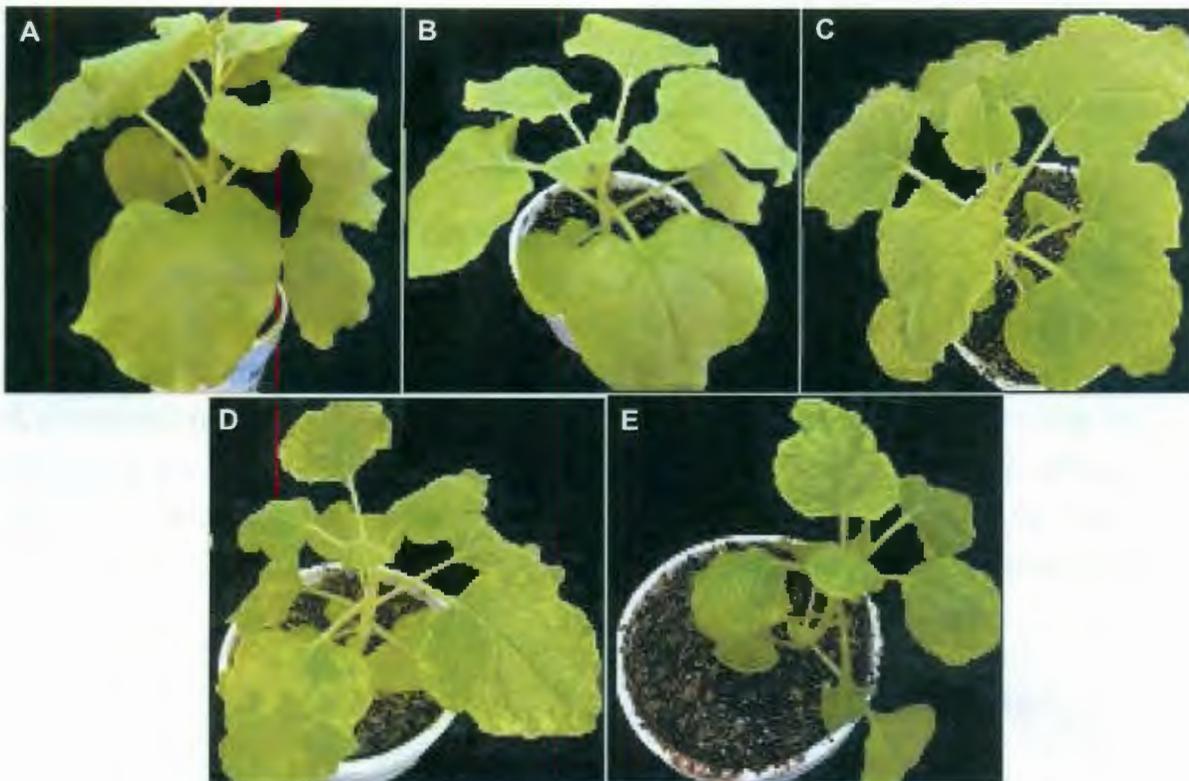


Figura 2.12. Síntomas observados en plantas de *N. benthamiana* a los 28 dpi. A: plantas sin inocular; B: mock inoculadas; C: inoculadas con *EuMV-YP:ΔAV1*; D: inoculadas con *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* y E: inoculadas con *EuMV-YP*.

CAPÍTULO II

De acuerdo a la escala de severidad y a los valores otorgados a los síntomas observados en plantas de *N. benthamiana* inoculadas a diferentes días post-inoculación, se puede concluir que el silenciamiento de *NPR1* utilizando al vector *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* generó un incremento en la severidad de la infección cuando se comparaba con el nivel de severidad alcanzado en plantas inoculadas con el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1*. Este incremento en el nivel de severidad en plantas inoculadas con el vector *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* sobre plantas inoculadas con el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1* se generó a partir de los 14 dpi y se mantuvo durante el curso temporal. A los 21 dpi las plantas inoculadas con el vector *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* alcanzaron su máximo nivel de severidad, siendo similar al nivel alcanzado en plantas inoculadas con el virus silvestre *EuMV-YP* en este mismo tiempo.

NIVELES DE EXPRESIÓN DE *NPR1* EN PLANTAS DE *N. benthamiana*

Los niveles de expresión de las plantas tratadas fueron determinados por PCR en tiempo real con ayuda de cebadores específicos diseñados a partir de la secuencia de *NPR1* de *N. tabacum* (# de accesión de: DQ837218.1) que amplifican un fragmento del gen localizado fuera de la región blanco utilizado para el silenciamiento. Como control del nivel de expresión se determinó al mismo tiempo el nivel de expresión del gen constitutivo β -*tubulina*. Las condiciones de amplificación de los cebadores para *NPR1* y la β -*tubulina* fueron los mismos establecidos previamente por PCR convencional y que fueron descritas en materiales y métodos (**Figura 2.13**)

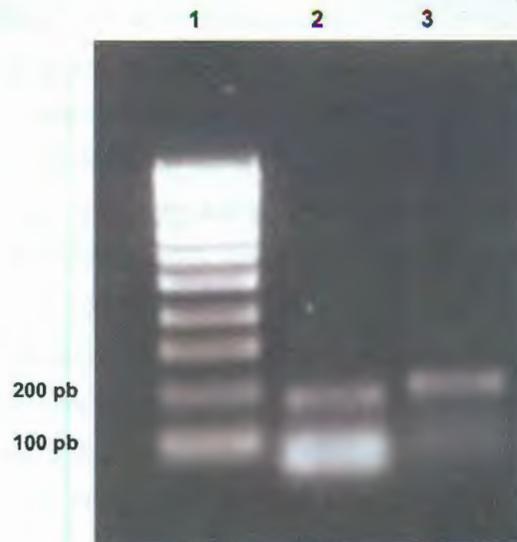


Figura 2.13. Amplificación por PCR convencional de un fragmento de *NPR1* y la β -*tubulina* de *N. bentamiana*. Carril 1: marcador de peso molecular (Hiperladder IV); carril 2: *NPR1* (158 pb) y carril 3: β -*tubulina* (202 pb).

Las hojas fueron colectadas inmediatamente después de la inoculación con los diferentes tratamientos en el tiempo cero. En el tiempo cero, los resultados de los niveles de expresión de *NPR1* mostraron una variación en los diferentes tratamientos, siendo menores a la unidad en plantas inoculadas con *EuMV-YP: Δ AV1* y *EuMV-YP* y, 0.8 veces mayor en plantas inoculadas con el vector de silenciamiento de *NPR1* cuando se comparaban con los niveles de expresión de *NPR1* en plantas sin inocular y mock inoculadas. A los 7 dpi los niveles de expresión de *NPR1* en plantas inoculadas con *EuMV-YP: Δ AV*, *EuMV-YP: Δ AV1-NPR1* y mock inoculadas presentaron valores similares e incrementos de casi 0.5 veces cuando se compararon con el nivel de expresión de plantas sin inocular, mientras que en plantas inoculadas con *EuMV-YP* el nivel de expresión de *NPR1* fue cercano a la unidad y similar al nivel de expresión de plantas sin inocular.

A los 14 dpi los niveles de expresión de *NPR1* en plantas mock e inoculadas con el virus silvestre *EuMV-YP* presentaron valores cercanos a la unidad de plantas sin inocular. Por otro lado, el nivel de expresión de *NPR1* en plantas inoculadas con el vector vacío *EuMV-YP: Δ AV1* se observó un incremento de 0.2 veces respecto al nivel observado en plantas sin inocular. El nivel de expresión de *NPR1* en plantas inoculadas con el vector de

CAPÍTULO II

silenciamiento de *NPR1* fue menor en comparación con los niveles de expresión obtenidos en plantas sin inocular e inculadas con el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1*, la disminución en el nivel de expresión de *NPR1* correspondió a dos y tres ordenes de magnitud respectivamente. A los 21 dpi se pudo observar un nivel de expresión de *NPR1* cercano a la unidad de plantas mock, mientras que los niveles de expresión en plantas inculadas con el virus silvestre *EuMV-YP* y el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1* se observó un incremento de 0.7 y 0.4 veces respectivamente, comparados con el nivel de expresión de *NPR1* en plantas sin inocular. En plantas inculadas con el vector de silenciamiento de *NPR1* se observaron niveles de expresión con una disminución de tres a cuatro ordenes de magnitud a los obtenidos en plantas sin inocular e inculadas con el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1* respectivamente. A los 28 dpi las plantas inculadas con *EuMV-YP:ΔAV1*, *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* y el virus silvestre *EuMV-YP* presentaron un disminución en los niveles de expresión de *NPR1* cercana a 0.5 veces respecto a los niveles de expresión de plantas sin inocular y mock inculadas (Figura 2.14).

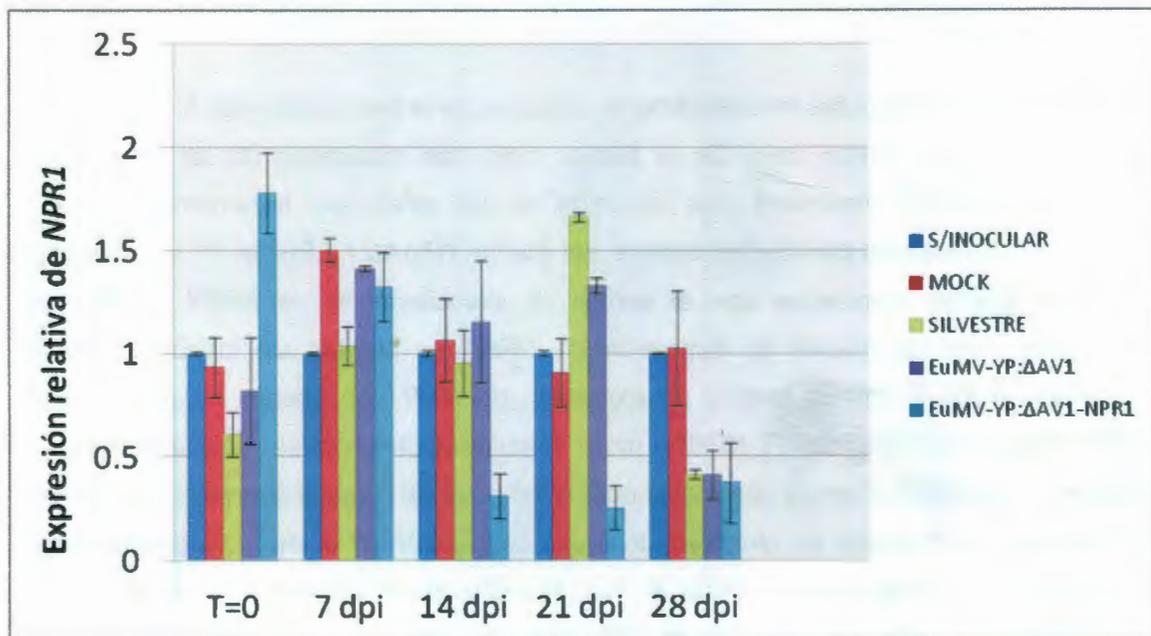


Figura 2.14. Expresión relativa de *NPR1* en hojas sistémicas de plantas de *N. benthamiana* en diferentes días post-inoculación. Los niveles de expresión de *NPR1* fueron evaluados por PCR tiempo real. Se utilizó a la β -*tubulina* como gen normalizador.

Los resultados obtenidos indican que el vector *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* funcionó exitosamente en plantas de *N. benthaminana*, silenciando a *NPR1* en un 73 % a partir de los 14 dpi. El máximo nivel de silenciamiento alcanzado en hoja fue de un 86% a los 21 dpi. A pesar de que se observó una disminución en el nivel de expresión de *NPR1* en los diferentes tratamientos a los 28 dpi, en las plantas inoculadas con la construcción *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* el nivel de expresión de *NPR1* se mantuvo menor al observado en plantas inoculadas con el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1*. La disminución en los niveles de expresión de *NPR1* en los diferentes tratamientos sugiere una disminución de la participación del gen en la defensa a los 28 dpi, correlacionando con una remisión de síntomas en este mismo tiempo.

El sistema vascular de las plantas es el medio por el cual los virus se mueven hasta los tejidos sanos. De esta forma, el movimiento a larga distancia es dependiente de floema y necesaria para una infección exitosa de virus en plantas (Carrington *et al.*, 1996). Por lo que muestras de tallo de plantas con los diferentes tratamientos fueron colectadas a los 21 dpi. Se realizó el análisis de expresión de *NPR1* en ese tiempo debido a que las plantas inoculadas con la construcción *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* presentaron los síntomas más severos de la infección. Las plantas inoculadas con el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1* presentaron un incremento en el nivel de expresión de *NPR1* 0.2 veces mayor a los niveles de expresión observados en plantas sin inocular y mock inoculadas. El nivel de expresión de *NPR1* en plantas inoculadas con *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* fue 0.5 veces menor al nivel de expresión obtenido en plantas sin inocular y mock inoculadas. En plantas inoculadas con *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* se alcanzó una disminución en el nivel de expresión de *NPR1* del 55% con respecto al nivel obtenido en plantas inoculadas con el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1*. En plantas inoculadas con el virus silvestre *EuMV-YP* el nivel de expresión de *NPR1* fue menor al obtenido en plantas mock, sin inocular e inoculadas con el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1*, sin una diferencia significativa con el nivel de expresión observado en plantas inoculadas con el vector de silenciamiento de *NPR1* (Figura 2.15).

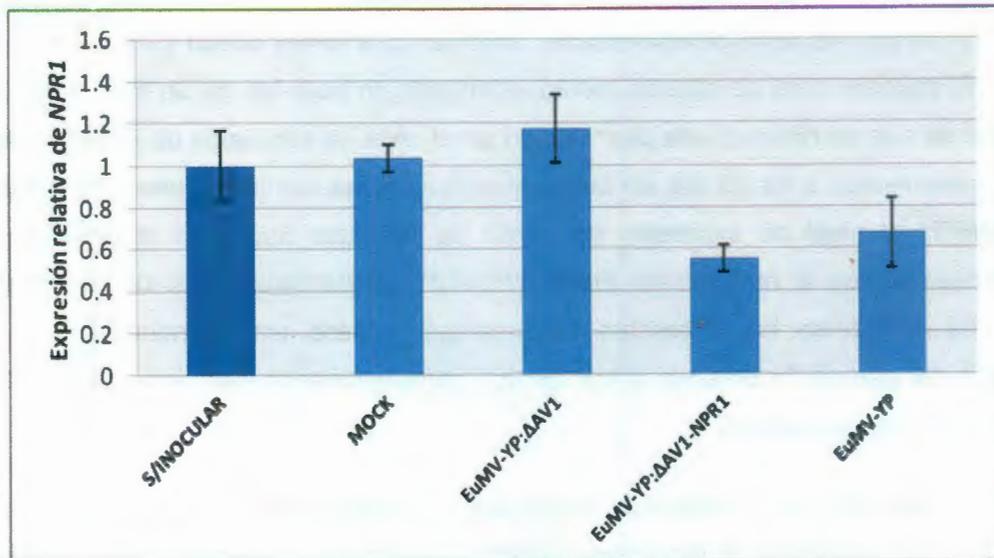


Figura 2.15. Expresión relativa de *NPR1* en tallo de plantas de *N. benthamiana* a 21 dpi. Los niveles de expresión de *NPR1* fueron evaluados por PCR en tiempo real. Se utilizó al gen de la β -tubulina como gen normalizador.

DETERMINACIÓN DEL TÍTULO VIRAL EN PLANTAS DE *N. benthamiana*

El título viral se realizó en hojas sistémicas a los 7, 14, 21, 28 dpi y en tallo a los 21 dpi. Los ensayos de PCR en tiempo real se realizaron siguiendo protocolos establecidos y descritos con anterioridad en materiales y métodos. Las condiciones de amplificación de los cebadores del gen *AC1* del EuMV-YP fueron establecidas por PCR (**Figura 2.16**).

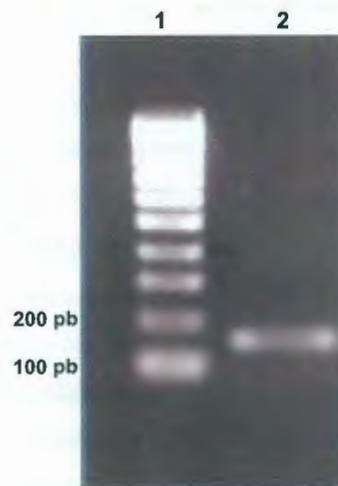


Figura 2.16. Amplificación por PCR de *AC1* del EuMV-YP. Carril 1: marcador de peso molecular (Hiperladder IV); carril 2: Fragmento de 148 pb del gen *AC1* del EuMV-YP.

Los resultados obtenidos indican que en plantas inoculadas con la construcción *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* la concentración viral a los 7 y 14 dpi fueron 3 y 7 veces mayores a la concentración viral obtenida en plantas inoculadas con el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1*. Sin embargo, en plantas inoculadas con el virus silvestre EuMV-YP los niveles de concentración viral fueron 100 veces mayores a los obtenidos en plantas inoculadas con el vector vacío y el vector de silenciamiento de *NPR1* a los 7 y 14 dpi (**Figura 2.17**). Estos resultados correlacionan con la severidad de los síntomas observados a los 7 dpi entre plantas inoculadas con *EuMV-YP:ΔAV1* y *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1*, en donde se observaron síntomas similares como son mosaicos amarillos en los sitios de infección, mientras que las hojas nuevas no presentaron síntomas claros de la infección. Por otro lado, en plantas inoculadas con el virus silvestre EuMV-YP a los 7 dpi las hojas nuevas

CAPÍTULO II

presentaron síntomas como mosaicos amarillos, ondulaciones y una curvatura de los bordes de las hojas hacia abajo (**Figura 2.9**). A los 14 dpi el nivel de severidad de plantas inoculadas con *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* fue mayor que el observado en plantas inoculadas con el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1*, las plantas presentaban mosaicos amarillos, ondulamientos con los bordes ligeramente plegados hacia el interior y enchinamiento en las hojas (**Figura 2.10**). Por otro lado, los niveles de severidad en plantas inoculadas con el virus silvestre *EuMV-YP* a los 7 y 14 dpi fueron mayores a los alcanzados en plantas inoculadas con *EuMV-YP:ΔAV1* y *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1*, a los 14 dpi las hojas nuevas de las plantas inoculadas con *EuMV-YP* se encontraban completamente enrolladas, presentaban deformaciones y mosaicos amarillos por toda la hoja (**Figura 2.9 y 2.10**).

A los 21 dpi las plantas inoculadas con *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* presentaron una concentración viral 70 veces mayor con respecto a la concentración viral de plantas inoculadas con el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1* y una concentración viral que corresponde al 80% de la concentración viral encontrada en plantas inoculadas con el virus silvestre *EuMV-YP* (**Figura 2.17**). Esto correlaciona con la generación de síntomas más severos observados en plantas inoculadas con *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* en comparación con la severidad que se obtuvo en plantas inoculadas con el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1* a los 21 dpi. Por otra parte, el nivel de severidad en plantas inoculadas con el *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* y *EuMV-YP* fue similar a los 21 dpi, las hojas nuevas presentaban deformaciones y enchinamiento con los bordes plegados hacia el interior, también presentaban mosaicos amarillos que se extendían en toda la hoja (**Figura 2.11**). A los 28 dpi los valores de concentración viral en plantas inoculadas con *EuMV-YP:ΔAV1* y *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* presentaban valores correspondiente al 45 y 75% respectivamente de la concentración viral encontrada en plantas inoculadas con el virus silvestre *EuMV-YP* (**Figura 2.17**), correlacionando con la remisión de síntomas y con valores cercanos de la escala de severidad alcanzados en este mismo tiempo en los tres tratamientos (**Figura 2.12**).

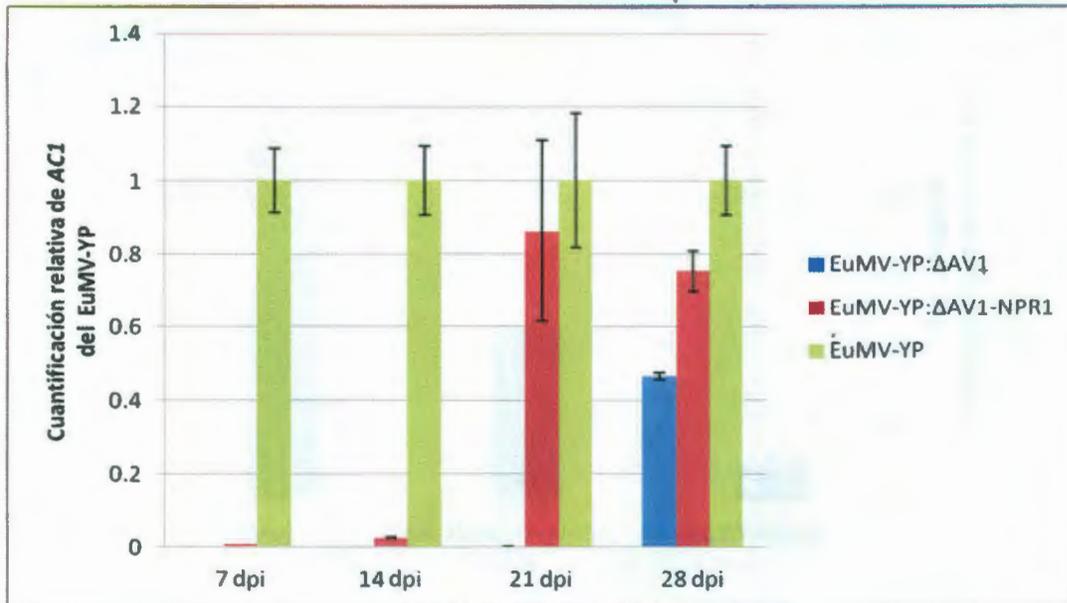


Figura 2.17. Título viral en hojas sistémicas de plantas de *N. benthamiana* en diferentes días post-inoculación. Cebadores de *AC1* fueron utilizados para determinar los niveles de concentración viral. Los niveles fueron evaluados por PCR en tiempo real. Se utilizó la β -tubulina como gen normalizador.

El análisis de la concentración viral en tallo a los 21 dpi indicó que en plantas inoculadas con el vector de silenciamiento de *NPR1* los niveles de concentración del gen *AC1* presentaron 3 veces más cantidad comparado con los niveles del mismo gen en plantas inoculadas con el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1*. Por otro lado, la concentración viral alcanzada en plantas infectadas con el virus silvestre *EuMV-YP* fue del doble al alcanzado en plantas inoculadas con el vector *EuMV-YP:ΔAV-NPR1*. Aunque los niveles de concentración del gen *AC1* en plantas inoculadas con el *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* fueron menores que en plantas inoculadas con el virus silvestre *EuMV-YP*, estas presentaban un incremento significativo en comparación con los niveles obtenidos en plantas inoculadas con el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1*, indicando de esta forma un papel importante de *NPR1* en la concentración y movimiento viral en plantas de *N. benthamiana* (**Figura 2.18**)

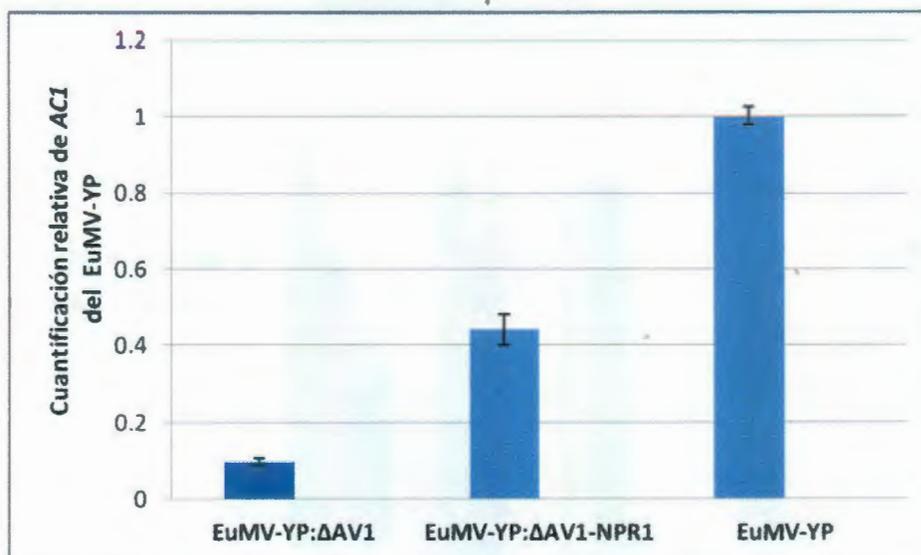


Figura 2.18. Título viral en tallo de plantas de *N. benthamiana* a 21 dpi. Cebadores de AC1 fueron utilizados para determinar los niveles de concentración viral. Los niveles fueron evaluados por PCR en tiempo real. Se utilizó la β -tubulina como gen normalizador.

2.4. DISCUSIÓN GENERAL

El análisis *in silico* realizado mostró que ambas secuencias, NPR1 de *C. annuum* y *A. thaliana* comparten un porcentaje de similitud del 48% y un porcentaje de identidad del 89%. A pesar de estas diferencias, se ha observado que las proteínas conservan dominios y funciones similares (Shi *et al.*, 2010; Peraza-Echeverría *et al.*, 2012). En *Arabidopsis* el dominio BTB/BOZ de la proteína NPR1 se localiza entre los aminoácidos 65 y 195 presentando un tamaño de 130 aa, mientras que el dominio de cuatro repeticiones de ankirina se localiza entre los aminoácidos 265 y 394 con un tamaño de 129 aa (Hepworth *et al.*, 2006). La proteína NPR1 de *C. annuum* mostró tener los dos dominios conservados: el dominio BTB/BOZ localizado entre los aminoácidos 64 y 184 con un tamaño de 120 aa y, el dominio de cuatro repeticiones de ankirina localizado entre los aminoácidos 258 y 388 con un tamaño de 130 aa.

En *A. thaliana* se han reportado seis miembros de la familia NPR, con funciones diferentes (Hepworth *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2006). Con la finalidad de hacer el silenciamiento específico, a partir de la región C-terminal no conservada de la proteína NPR1 de *C. annuum* se diseñaron cebadores que amplifican un fragmento de 237 pb. En plantas de *Nicotiana edwardsonii* la utilización de una secuencia genética que codifica una región conservada de proteínas de resistencia (R) permitió el silenciamiento de la familia completa de los genes que codifican a estas proteínas, comprometiendo la respuesta de hipersensibilidad desencadenada por dos tomosvirus (Balaji *et al.*, 2007).

Debido a la susceptibilidad de *Nicotiana benthamiana* a la infección por diferentes patógenos, ésta ha sido ampliamente utilizada como planta modelo en interacciones virus-planta (Goodin *et al.*, 2008). Mientras que el número de EST (Expressed sequende tag) reportados en *N. benthamiana* es relativamente bajo, el alto nivel de homología presente entre las secuencias codificantes entre especies de la familia Solanaceae ha permitido realizar trabajos de caracterización funcional de genes no reportados en esta planta (Rensink *et al.* 2005; Goodin *et al.*, 2008). La secuencia del gen que codifica a la proteína NPR1, un regulador maestro de la defensa en plantas (Dong, 2004) no ha sido reportada en *N. benthamiana* sin embargo, se ha reportado que se puede obtener silenciamiento a partir de secuencias heterólogas (Senthil-Kumar *et al.*, 2007; Hosseini Tafreshi *et al.*, 2012). En un trabajo previo, la secuencia genética que codifica a la fitoenodesaturasa (PDS) y a la subunidad menor de la ribulosa 1-5 bifosfato (*rbcS*) de *C. annuum* fueron

CAPÍTULO II

utilizadas para silenciar de forma exitosa estos mismos genes en plantas de *N. benthamiana*. La comparación de las secuencias de nucleótidos de la *PDS* de *Capsicum annuum* y *N. sylvestris* demostró que ambas comparten un nivel de identidad del 87%, mientras que para la *rbcS* de *C. annuum* y *N. benthamiana* el nivel de identidad fue de un 93% (Chung *et al.*, 2004).

Para determinar si la secuencia seleccionada de 237 pb de *NPR1* de *C. annuum* podría ser utilizada para silenciar a *NPR1* de *N. benthamiana*, se realizó un alineamiento de las secuencias de nucleótido de *NPR1* reportadas de *N. tabacum* y *C. annuum*. Se obtuvo un 92 % de identidad entre las regiones correspondientes de 237 pb de ambas especies de plantas, con segmentos de secuencias de más de 23 nt que presentaban un 100% de identidad, indicando que dicho fragmento podría ser utilizado para silenciar a *NPR1* en *N. benthamiana*. Se ha reportado que una secuencia mínima de 23 nt con un 100% de identidad puede iniciar el PTGS, aunque para alcanzar una mayor eficiencia en el silenciamiento se requieren secuencias idénticas de un mayor tamaño (Thomas *et al.*, 2001).

La secuencia obtenida del fragmento de 237 pb clonado en el vector comercial pGEM-T Easy y utilizado para la obtención del vector VIGS *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* comparte un porcentaje de identidad del 99% con el gen *NPR1* reportado de *C. Annuum*. El fragmento clonado y secuenciado de *NPR1* en el vector pGEM-T Easy se obtuvo a partir de cDNA de plantas de *Capsicum annuum* cv. Anaheim, mientras que la secuencia de *NPR1* reportada y utilizada para la comparación pertenece a *C. annuum* cv. Guiyan5, esto podría explicar el que no se haya obtenido un 100% de identidad entre las secuencias. Por otra parte, pudiera deberse a un error generado durante la secuenciación. Diferentes tasas de error han sido reportadas para la Taq polimerasa como consecuencia de no presentar actividad correctora 3'-5'. La tasa de introducción de errores es de aproximadamente 1 por cada 10,000 nucleótidos (Tindall *et. al.*, 1988; Barnes *et. al.*, 1992) Durante la amplificación del fragmento enviado a secuenciar es poco probable que se hayan generado errores debido a que el tamaño del fragmento amplificando es relativamente pequeño.

El vector viral *EuMV-YP:ΔAV1* utilizado para silenciar de manera transitoria a *NPR1*, fue construido modificando el componente A del virus silvestre *EuMV-YP*, sustituyendo parte del gen que codifica a la proteína de la cápside (CP) por un sitio múltiple de clonación. Esta modificación generó una atenuación de síntomas en plantas de *N. benthamiana*

inoculadas con el vector VIGS *EuMV-YP:ΔAV1* a lo largo del curso temporal, coincidiendo con una disminución del ADN viral en hojas sistémicas (Villanueva-Alonzo, 2012, datos sin publicar). Estos mismos resultados han sido reportados en otros sistemas de silenciamiento basados en geminivirus. En plantas de *N. benthamiana* inoculadas con el vector viral basado en el *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) se observaron síntomas menos severos y una disminución del ADN viral en hojas nuevas (Kjemtrup *et al.*, 1998; Peele *et al.*, 2001). En plantas de espinaca y tomate inoculadas con el vector VIGS basado en el *Beet curly top virus* (BCTV) se obtuvieron los mismos resultados (Golenberg *et al.*, 2009). Para virus de ARN como el *Tobacco etch virus* (TEV) y el *Turnip crinkle virus* (TCV) la CP ha sido implicada en el movimiento célula-célula y de la larga distancia (Dolja *et al.*, 1995; Cao *et al.*, 2010). En el caso de los geminivirus, la CP parece no ser necesaria para el movimiento sistémico (Tuttle *et al.*, 2008). Se ha sugerido que la CP puede actuar como una señal de inicio de la replicación de ADNcs durante las etapas tempranas de infección y que además puede unirse al ADNcs sin encapsidar y evitar que se reintegre al pool de replicación (Qin *et al.*, 1998). Esto explicaría en parte porque hay una drástica reducción de la concentración viral en ausencia de la CP en plantas inoculadas con el vector VIGS *EuMV-YP:ΔAV1* cuando se comparó con plantas infectadas con el virus silvestre *EuMV-YP*.

En plantas de *N. benthamiana* inoculadas con el vector de silenciamiento de *NPR1* (*EuMV-YP:ΔAV1-NPR1*) a partir de los 14 hasta los 28 dpi se observaron síntomas más severos a los encontrados en las plantas inoculadas con el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1*. A los 21 dpi las plantas silenciadas alcanzaron el mayor nivel de severidad con síntomas ligeramente menores a los observados en plantas infectadas con el virus silvestre *EuMV-YP*, lo anterior se correlacionó con la obtención de valores de concentración viral similares entre plantas silenciadas e infectadas con el virus silvestre. Estos resultados difieren a los reportados en otras interacciones de tipo compatible virus-planta. Por mencionar algunos ejemplos, Ascencio-Ibañez y colaboradores (2008) reportaron en plantas de *Arabidopsis* infectadas con el begomovirus CaLCuV los mismos niveles de severidad entre plantas mutantes *npr1* y plantas infectadas con el virus silvestre. En otro trabajo realizado en plantas de *Arabidopsis* la inducción dependiente de SA de la expresión de la mayoría de los genes fue independiente de la expresión de *NPR1*. Las plantas mutantes *npr1* infectadas con el *Cucumber mosaic virus strain Y* (CMV-Y) y el *Oilseed rape mosaic virus* (ORMV) no mostraron un incremento en la susceptibilidad en base a los síntomas

CAPÍTULO II

observados y la acumulación viral (Huang *et al.*, 2005). En plantas de *Arabidopsis* la mutante *npr1* tampoco generó plantas más susceptibles a la infección con el *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) ni un incremento del ADN viral (Love *et al.*, 2007).

En otros sistemas compatibles, *NPR1* parece estar involucrada en la reducción del grado de severidad. En plantas de *Arabidopsis* la mutante *npr1* presentó una disminución en la expresión del gen *PR-1* y un incremento en el título bacteriano de *P.syringae* pv. *maculicola* (*Psm* ES4326) (Kinkema *et al.*, 2000, Tada *et al.*, 2008). Por otro lado, la sobreexpresión de *NPR1* en plantas de *Arabidopsis* generó mayor tolerancia a los patógenos virulentos *Psm* ES4326 y *P. parasitica* Noco (Cao *et al.*, 1998). Esta misma resistencia como consecuencia de la sobreexpresión de *NPR1* ha sido obtenida en otras especies vegetales como tabaco (Meur *et al.*, 2008; Priya *et al.*, 2011), manzana (Malnoy *et al.*, 2007) y arroz (Chern *et al.*, 2004).

En interacciones de tipo incompatible se sabe que *NPR1* juega un papel importante en la respuesta de defensa. En plantas de *N. benthamiana* el silenciamiento de *NPR1* comprometió la resistencia mediada por el gen *N* hacia el TMV, generando un incremento del título viral en hojas sistémicas (Liu *et al.*, 2002). En plantas de tomate el silenciamiento de *NPR1* utilizando al vector VIGS basado en el TRV comprometió la resistencia a la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* generando síntomas más severos y un incremento del título bacteriano (Ekengren *et al.*, 2003).

La expresión de *NPR1* parece ser inducida en plantas inoculadas con el virus silvestre *EuMV-YP* y el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1*, con valores ligeramente superiores a los encontrados en plantas mock y sin inocular. En plantas de *Arabidopsis* se observaron incrementos en los niveles de expresión de *NPR1* y de algunos genes *PR* en respuesta a la infección con el begomovirus *Cabbage leaf curl virus* (Ascencio-Ibañez *et al.*, 2008), también se observaron niveles de expresión de *NPR1* del doble en respuesta a la inducción con el SA (Cao *et al.*, 1997; Kinkema *et al.*, 2000). En plantas de manzana infectadas con el hongo *Botryosphaeria berengeriana* se observó un ligero incremento en los niveles de expresión de *NPR1* (Zhang *et al.*, 2011). Sin embargo, comparaciones de los niveles de expresión de *NPR1* entre interacciones de tipo compatible e incompatible no presentaron diferencias significativas (Le Henanff *et al.*, 2009). Al parecer la regulación de la función de *NPR1* se da a nivel proteínico. Una secuencia de localización nuclear permite que la forma monomérica de *NPR1* pueda entrar al núcleo en donde funciona como un co-activador transcripcional (Kinkema *et al.*, 2000). Spoel y

colaboradores (2009) demostraron que la degradación mediada por proteosoma de la proteína NPR1 en el núcleo promueve la expresión de genes en respuesta a la defensa y también previene la activación de la respuesta de defensa en ausencia de la infección.

El nivel máximo de silenciamiento de *NPR1* alcanzado en hojas de plantas inoculadas con el vector *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* fue de un 85% a los 21 dpi. A partir de los 14 dpi se observó una drástica reducción en el nivel de expresión de *NPR1*. En el tallo de plantas de *N. benthamiana* el nivel de silenciamiento de *NPR1* alcanzado fue de un 55% a los 21 dpi. Estos resultados difieren a los obtenidos durante la caracterización del vector VIGS *EuMV-YP:ΔAV1*, en donde, a los 21 dpi, el nivel de silenciamiento del gen de la magnesio quelatasa (*Chill*) en hojas fue de un 47% y en tallo de un 87% (Villanueva-Alonzo, 2012). En otros trabajos que han utilizado un vector viral basado en el TRV también se han observado variaciones en los niveles de silenciamiento que dependen del gen elegido, por ejemplo, en hojas de plantas de *N. benthamiana* el silenciamiento de *NPR1* fue de un 78%, de un 88% para el gen *EDS1* y de un 95% para el gen *Rar1* (Liu *et al.*, 2002). Por otro lado, la cantidad de transcritos de *NPR1* generados en hoja y tallo pudieron haber influido en los niveles de silenciamiento alcanzados en estos tejidos. Se ha reportado que *NPR1* se expresa de forma diferencial en los diferentes tejidos. En plantas de *Theobroma cacao* el nivel de expresión basal de *NPR1* en semillas y hojas fue diferente, siendo mayores en hojas. Las hojas jóvenes presentan niveles de expresión de *NPR1* incluso mayores que las hojas maduras (Shi *et al.*, 2010). En plantas de *Carica papaya* L. los niveles de expresión *NPR1* son mayores en hojas y en flores y menores en peciolo y frutos (Peraza-Echeverría *et al.*, 2012).

A lo largo del curso temporal, la concentración viral en hojas de plantas silenciadas con el vector *EuMV-YP:ΔAV1-NPR1* fue mayor que en plantas inoculadas con el vector vacío *EuMV-YP:ΔAV1*, alcanzando valores de concentración viral cercanos al virus silvestre *EuMV-YP*. En el tallo de plantas de *N. benthamiana* a los 21 dpi, se observó el mismo comportamiento de la concentración viral. El sistema vascular de las plantas es el medio por el cual los virus se mueven hasta los tejidos sanos, así, el movimiento vascular es dependiente de floema y es necesario para una infección exitosa de los virus de plantas (Carrington *et al.*, 1996). Liu y colaboradores (2002) encontraron que durante el silenciamiento de *NPR1* se generó un incremento del título viral del TMV en hojas sistémicas, estos resultados implican una participación de *NPR1* en el movimiento viral.

Los geminivirus son virus de ADNcs que se replican a través de intermediarios de ADNcd,

CAPÍTULO II

para poder replicarse requieren que la maquinaria replicativa celular se encuentre activa (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000). Otros autores han reportado que NPR1 funciona como un regulador negativo de la endoreplicación durante el desarrollo de las hojas en *Arabidopsis* (Vanacker *et al.*, 2001). Por otro lado se ha encontrado que intermediarios virales de ADNcd son más abundantes en células que se encuentran en la fase S del ciclo celular (Accotto *et al.*, 1993). Así, el silenciamiento de *NPR1* parece favorecer la replicación viral y como consecuencia genera un incremento del ADN viral en las plantas de *N. benthamiana*.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que *NPR1* participa en la interacción de tipo compatible entre plantas de *N. benthamiana* y el vector VIGS *EuMV-YP:ΔAV1*, generando síntomas menos severos y disminuyendo la concentración viral.

BIBLIOGRAFÍA

Accotto G.P., Mullineaux P.M., Brown S.C. y Marie D. (1993) *Digitaria streak geminivirus* replicative forms are abundant in S-phase nuclei of infected cells. *Virology*, 195: 257–259.

Aravind L. y Koonin E.V. (1999). Fold prediction and evolutionary analysis of the POZ domain: structural and evolutionary relationship with the potassium channel tetramerization domain. *J. Mol. Biol.*, 285: 1353–1361.

Ascencio-Ibáñez T., Sozzani R., Lee T.J., Chu T. M., Wolfinger R., Cella R., y Hanley-Bowdoin L. (2008). Global analysis of *Arabidopsis* gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during Geminivirus Infection. *Plant Physiology*, 148: 436–454.

Balaji B., Cawly J., Angel C., Zhang Z., Palanichelvam K, Cole A. y Schoelz J.(2007). Silencing of the N Family of Resistance Genes in *Nicotiana edwardsonii* Compromises the Hypersensitive Response to Tombusviruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20: 1262–1270.

Barnes W.M. (1992). The Fidelity of Taq polymerase catalyzing PCR is improved by an N-terminal deletion." Assay: loss of LacZ function. *Gene*, 112: 29-35.

Cao H., Glazebrook J., Clark J.D., Volko S. y Dong X. (1997). The *Arabidopsis NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, 88: 57–64.

Cao H., Li X. y Xinnian D. (1998) Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *PNAS*, 95: 6531-6536.

Cao M., Ye X., Willie K., Lin J., Zhang X., Redinbaugh M.G., Simon A.E, Morris J. y Qu F. (2010). The Capsid Protein of *Turnip crinkle virus* overcomes two separate defense barriers to facilitate systemic movement of the virus in *Arabidopsis*. *Journal of virology*, 84: 7793–7802.

Collins T., Stone J.R. y Williams A.J. (2001). All in the family: The BTB/POZ, KRAB, and SCAN domains. *Mol. Cell. Biol.*, 21: 3609–3615.

Carrington J.C., Kristin D.K., Sunita K M. y Mary C.S. (1996). Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *The Plant Cell*, 8: 1669-1681.

CAPÍTULO II

Chern, M.S., Fitzgerald, H.A., Canlas, P.E., Navarre, D.A., and Ronald, P.C. (2005) Over-expression of a rice *NPR1* homologue leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. *Mol Plant Microbe Interact* 18: 511–520.

Chung E., Seong E., Kim Y.C., Chung E.J., Oh S.K., Lee S., Park J.M., Joung Y.H. y Choi D. (2004). A method of high frequency virus-induced gene silencing in chili pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Bukang). *Mol Cells*, 7: 377–380.

Després C., DeLong C., Glaze S., Liu E. y Fobert P.R. (2000). The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell*, 12: 279-290.

Dolja V. J., Haldeman-Cahill R., Montgomery A. E., Vandenbosch K.A. y Carrington, J. C. (1995). Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long-distance movement of *Tobacco etch potyvirus*. *Virology*, 206: 1007-1016.

Dong X. (2001). Genetic dissection of systemic acquired resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4: 309-314.

Dong X. (2004). NPR1, all things considered. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7: 547–552.

Doyle J.J. y Doyle J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

Ekengren S.K., Liu Y., Schiff M., Dinesh-Kumar S.P. y Martin, G.B. (2003). Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in *Pto*-mediated disease resistance in tomato. *Plant J.*, 36: 905–917.

Friedrich L., Lawton K., Reuss W., Masner P., Specker N., Gut Rella M., Meier B., Dincher S., Staub T. y Uknes S. (1996). A benzothiadiazole induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant J.*, 10: 61-70.

Golenberg E.M., Sather D.N., Hancock L., Kenneth B., Villafranco J. N. y Bisaro D.M. (2009). Development of a gene silencing DNA vector derived from a broad host range geminivirus. *Plant Methods*, 5:9.

Goodin M., Zaitlin D., Naidu R. y Lommel S. (2008). *Nicotiana benthamiana*: Its History and Future as a Model for Plant–Pathogen Interactions. *The American Phytopathological Society*, 21:1015–1026.

Hanley-Bowdoin L., Settlage S.B., Orozco B.M., Nagar S., Robertson D. (2000). Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 35:105–140.

Hepworth S.R., Zhang Y., McKim S., Li X. y Haughna G. (2005). *BLADE-ON-PETIOLE-Dependent Signaling Controls Leaf and Floral Patterning in Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17:1434–1448.

Huang Z., Yeakley J.M., Garcia E.W., Holdridge J.D., Fan J.B. y Whitham S. (2005). Salicylic acid-dependent expression of host genes in compatible Arabidopsis-virus interactions. *Plant Physiol.*, 137: 147–1159.

Hosseini Tafreshi S.A., Shariati M., Mofid M.R., Khayam Nekui M y Esmâeili A. (2012). Heterologous virus-induced gene silencing as a promising approach in plant functional genomics. *Mol Biol Rep.*, 39: 2169–2178.

Kjemtrup S., Sampson K.S., Peele C., Nguyen L.V., Conkling M.A., Thompson W.F. y Robertson D. (1998). Gene silencing from plant DNA carried by a Geminivirus. *Plant J.*, 14: 91–100.

Kinkema M., Fan W. y Dong, X. (2000). Nuclear localization of NPR1 is required for activation of *PR* gene expression. *Plant Cell*, 12: 2339–2350.

Le Henanff G., Heitz T., Mestre P., Mutterer J., Walter B. y Chong J. (2009). Characterization of *Vitis vinifera* *NPR1* homologs involved in the regulation of Pathogenesis-Related gene expression. *BMC Plant Biology*, 9: 1-14.

Liu Y, Schiff M M., Marathe R. y Dinesh-Kumar S.P. (2002). Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* like genes are required for N-mediated resistance to *Tobacco mosaic virus*. *Plant J.*, 30: 415–429.

Love A.J., Laval V., Geri C., Laird J., Tomos A.D., Hooks M.A., y Milner J.J. (2007). Components of *Arabidopsis* defense- and ethylene-signaling pathways regulate susceptibility to *Cauliflower mosaic virus* by restricting long-distance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20: 659–670.

Love A.J., Wook Yun B., Laval V., Loake G.J. y Milner J. (2005). *Cauliflower mosaic virus*, a compatible pathogen of *Arabidopsis*, engages three distinct defense-signaling pathways and activates rapid systemic generation of reactive oxygen species. *Plant Physiol.*, 139: 935–948.

Malnoy M., Jin Q., Borejsza-Wysocka E.E., He S.Y. y Aldwinckle H.S. (2007). Overexpression of the Apple *MpNPR1* gene confers increased disease resistance in *Malus × domestica*. *The American Phytopathological Society*, 20: 1568–1580.

CAPÍTULO II

Meur G., Budatha M., Srinivasan T., Kumar K., Gupta D. y Kirti B.P. (2008). Constitutive expression of *Arabidopsis NPR1* confers enhanced resistance to the early instars of *Spodoptera litura* in transgenic tobacco. *Physiol. Plant.*, 133: 765-75.

Peele C., Jordan C. V., Muangsan N., Turnage M., Egelkrou E., Eagle P., Hanley-Bowdoin L. y Robertson D. (2001). Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived Vectors. *The Plant Journal*, 27: 357-366.

Peraza-Echeverria S., Santamaría J.M., Fuentes G., Menéndez-Cerón M.A, Vallejo-Reyna M.A. y Herrera-Valencia V.A. (2012). The NPR1 family of transcription cofactors in papaya: insights into its structure, phylogeny and expression. *Genes and Genomics*, 34: 379-390.

Pintard L., Willems A. y Peter, M. (2004). Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *EMBO J.*, 23: 1681–1687.

Priya D.B., Somasekhar N., Prasad J.S. y Kirti P.B. (2011). Transgenic tobacco plants constitutively expressing *Arabidopsis NPR1* show enhanced resistance to root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *BMC Research Notes*, 4: 1-5.

Qin S., Ward B.M. y Lazarowitz S.G. (1998). The Bipartite geminivirus coat protein aids BR1 function in viral movement by affecting the accumulation of viral single-stranded DNA. *Journal of virology*, 72: 9247–9256.

Rensink W.A., Lee Y., Liu J., Iobst S., Ouyang S. y Buell C. R. (2005). Comparative analyses of six Solanaceous transcriptomes reveal a high degree of sequence conservation and species-specific transcripts. *BMC Genomics*, 6:124.

Senthil G., Liu H., Puram V.G., Clark A., Stromberg A. y Goodin M. M. (2005). Specific and common changes in *Nicotiana benthamiana* gene expression in response to infection by enveloped viruses. *J. Gen. Virol.*, 86: 2615-2625.

Senthil-Kumar M., Hema R., Anand A., Kang L., Udayakumar M., y Mysore K.S. (2007). A systematic study to determine the extent of gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and other Solanaceae species when heterologous gene sequences are used for virus-induced gene silencing. *New Phytol.*, 176: 782-91.

Shi Z., Maximova S.N., Liu Y., Verica J. y Guiltinan M.J. (2010). Functional analysis of the *Theobroma cacao NPR1* gene in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 10: 1-17.

Sticher L., Mauch-Mani B. y Métraux J.P. (1997). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 35: 235-270.

Spoel S.H., Mou Z., Tada Y. Spivey N.W., Genschik P. y Dong X. (2009). Proteasome-

mediated turnover of the transcription co-Activator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. *Cell*, 137: 860–872.

Tada Y., Spoel S.H., Pajerowska-Mukhtar K., Mou Z., Song J., Wang C., Zuo J., Dong X. (2008). Plant Immunity Requires Conformational Changes of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins. *Science*, 321: 952-955.

Thomas L., Jones L., Baulcombe D. y Maule A. (2001). Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a *Potato virus X* vector. *The Plant Journal*, 25: 417-425.

Tindall K.R. y Kunkel T.A. (1988). "Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry*, 27: 6008-6013.

Turnage M.A., Muangsan N., Peele C.G. y Robertson D. (2002). Geminivirus-based vectors for gene silencing in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 30:107-114.

Tuttle J.R., Idris A.M., Brown J.K., Haigler C.H. y Robertson D. (2008). Geminivirus-Mediated gene silencing from *Cotton Leaf Crumple Virus* is enhanced by low temperature in cotton. *Plant Physiol.*, 148: 41–50.

Vanacker H., Lu H., Rate D.N. y Greenberg J.T. (2001). A role for salicylic acid and NPR1 in regulating cell growth in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 28: 209-216.

Van den Heuvel S. (2004). Protein degradation: CUL-3 and BTB-partners in proteolysis. *Curr. Biol.*, 4:R59–R61.

Van Loon L.C., Rep M. y Pieterse C.M. (2006). Significance of inducible defence-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44: 135–162.

Villanueva-Alonso H. (2013). Desarrollo de un vector de silenciamiento basado en el EuMV-YP. Tesis doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.

Whitham S.A., Yang C. y Goodin M.M. (2006). Global impact: elucidating plant responses to viral infection. *Mol. Plant Microbe Interact*, 19: 1207–1215.

Zhang Y., Cheng Y.T., Qu N., Zhao Q., Bi D. y Li X. (2006). Negative regulation of defense responses in *Arabidopsis* by two *NPR1* paralogs. *The Plant Journal.*, 48: 647–656.

Zhang Y., Fan W., Kinkema M., Li X. y Dong X. (1999). Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *PNAS*, 96: 6523–6528.

Zhang J.Y., Qiao Y.S., Lv D., Gao Z.H. Qu S.C. y Zhang Z. (2011). *Malus hupehensis*

CAPÍTULO II

NPR1 induces pathogenesis-related protein gene expression in transgenic tobacco. *Plant Biology*, 14: 46–56.

Zhou J-M., Trifa Y., Silva H., Pontier D., Lam E., Shah J. y Klessig D.F. (2000). *NPR1* differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the *PR-1* gene required for induction by salicylic acid. *Mol. Plant Microbe Interact*, 13: 191-202.

CAPÍTULO III**3. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS****3.1. CONCLUSIONES**

1. Se logró silenciar de forma exitosa a *NPR1* de plantas de *N. benthamiana* utilizando un fragmento de la secuencia del mismo gen de plantas de *C. annuum*.
2. El nivel máximo de silenciamiento de *NPR1* alcanzado en hoja, fue de un 85% a los 21 dpi, en tallo el nivel de silenciamiento alcanzó un 55% en el mismo tiempo.
3. El silenciamiento de *NPR1* favorece la generación de síntomas y el incremento de la concentración viral en la interacción compatible entre plantas de *N. benthamiana* y el vector VIGS *EuMV-YP:ΔAV1*.
4. Los resultados obtenidos indican que *NPR1* juega un papel importante en la tolerancia de plantas de *N. benthamiana* a la infección con el vector VIGS *EuMV-YP:ΔAV1*.

3.2. PERSPECTIVAS

1. Cuantificar la expresión de los genes que codifican a las proteínas relacionadas a la patogénesis (PR), en especial a la proteína PR-10 la cual ha sido implicada directamente en respuesta a infecciones virales.
2. Evaluar los niveles de la proteína NPR1 y su actividad durante el silenciamiento del gen y determinar si existe una correlación entre la disminución de los niveles de expresión de *NPR1* y la cantidad de proteína sintetizada.
3. Cuantificar los niveles de expresión de los genes que codifican a los factores de transcripción de tipo TGA en plantas de *N. benthamiana* silenciadas.
4. Correlacionar los niveles de expresión del gen NPR1 y de los factores de transcripción TGA con el título del virus en diferentes tiempos y tejidos.
5. Determinar los niveles de ácido salicílico durante el silenciamiento del *NPR1*.

CAPÍTULO III

6. Evaluar el papel en la defensa de *NPR1* en otras interacciones planta-patógeno utilizando al vector *EuMV-YP:ΔAV-NPR1* para silenciar al gen.