



TÍTULO

CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE ARABIDOPSIS PARA EL ESTUDIO DE LA SUPRESIÓN DE SILENCIAMIENTO TRANSCRIPCIONAL EN GEMINIVIRUS

AUTORA

Ana Belén Moreno Cárdenas

Directora	Esta edición electrónica ha sido realizada en 2013
Curso	Araceli Castillo Garriga
ISBN	Máster en Biotecnología Avanzada 2011/2012
©	978-84-7993-892-5
©	Ana Belén Moreno Cárdenas
	De esta edición: Universidad Internacional de Andalucía



Reconocimiento-No comercial-Sin obras derivadas

Usted es libre de:

- Copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra.

Bajo las condiciones siguientes:

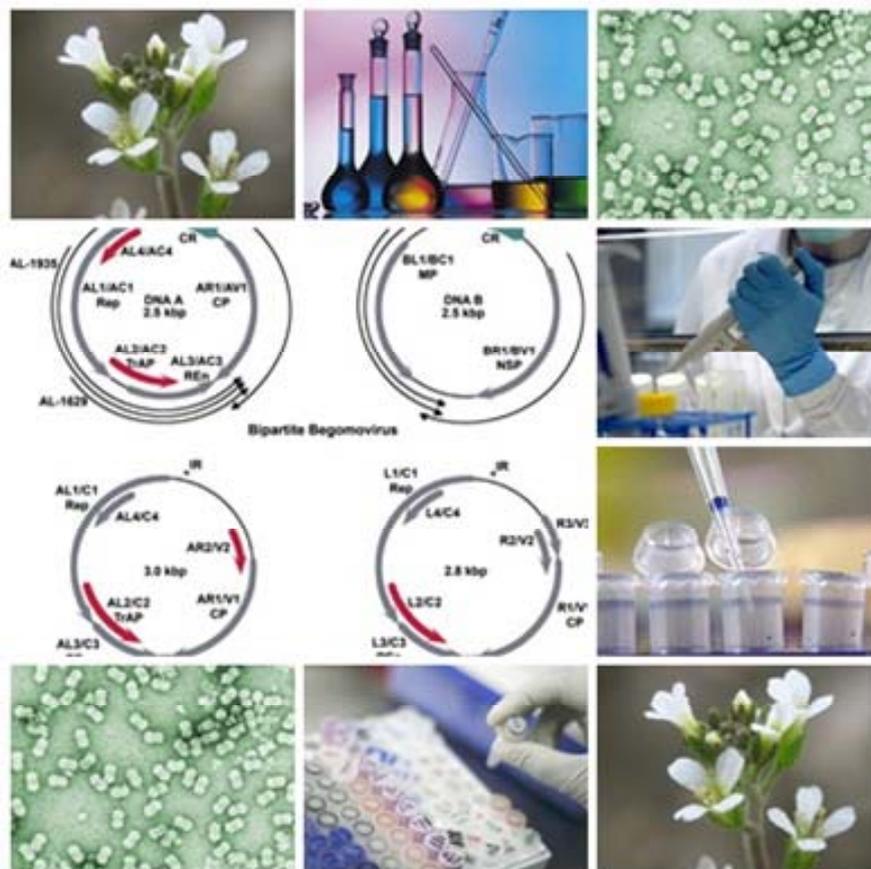
- **Reconocimiento.** Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciador (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o apoyan el uso que hace de su obra).
 - **No comercial.** No puede utilizar esta obra para fines comerciales.
 - **Sin obras derivadas.** No se puede alterar, transformar o generar una obra derivada a partir de esta obra.
-
- *Al reutilizar o distribuir la obra, tiene que dejar bien claro los términos de la licencia de esta obra.*
 - *Alguna de estas condiciones puede no aplicarse si se obtiene el permiso del titular de los derechos de autor.*
 - *Nada en esta licencia menoscaba o restringe los derechos morales del autor.*



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE ARABIDOPSIS PARA EL ESTUDIO DE LA SUPRESIÓN DE SILENCIAMIENTO TRANSCRIPCIONAL EN GEMINIVIRUS



Ana Belén Moreno Cárdenas
Curso 2011/2012

ÍNDICE

	Páginas
I. Introducción	3-12
1.1 Geminivirus	
1.1.1 Clasificación	
1.1.2 El género <i>Begomovirus</i>	
1.2 Silenciamiento génico	
1.2.1 Los <i>geminivirus</i> y el silenciamiento génico	
1.2.2 Supresión del silenciamiento	
1.2.3 Supresores del silenciamiento geminivirales	
1.3 Antecedentes del grupo	
II. Objetivos	13
III. Resultados	14-24
IV. Discusión	24-25
V. Conclusiones	26
VI. Material y métodos	27-28
6.1 Material biológico empleado	
6.2 Análisis de segregación de plantas transgénicas	
6.3 Condiciones de crecimiento	
6.4 Análisis de RNA	
6.5 Tinción histoquímica de la actividad GUS	
VII. Referencias	29-40

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Geminivirus

Los geminivirus pertenecen a una familia de virus fitopatógenos denominada *Geminiviridae*, cuyo genoma es un ADN monocatenario circular de aproximadamente 3000 pares de bases, que se replica usando moléculas intermediarias de ADN doble cadena dentro de las células vegetales infectadas (Briddon y Markham 1995). Los viriones están constituidos por dos icosaedros incompletos, y cada uno consta de 110 subunidades de proteína de cubierta, de 29-30kD cada una.

La estructura de los viriones ha sido resuelta por criomicroscopía electrónica combinada con una reconstrucción de imágenes y modelado bioinformático de las proteínas de cubierta de *Mastrevirus* y *Begomovirus* usando un virus de ARN isométrico Satellite tobacco necrosis virus (STNV) como referencia. La proteína que forma los icosaedros es una proteína multifuncional, que no solo protege el ADN viral durante la transmisión al vector, y provee especificidad por el vector, sino que también está involucrada en el transporte del ADN viral célula a célula, el transporte a través del poro del núcleo y el transporte a grandes distancias a través de las plantas.

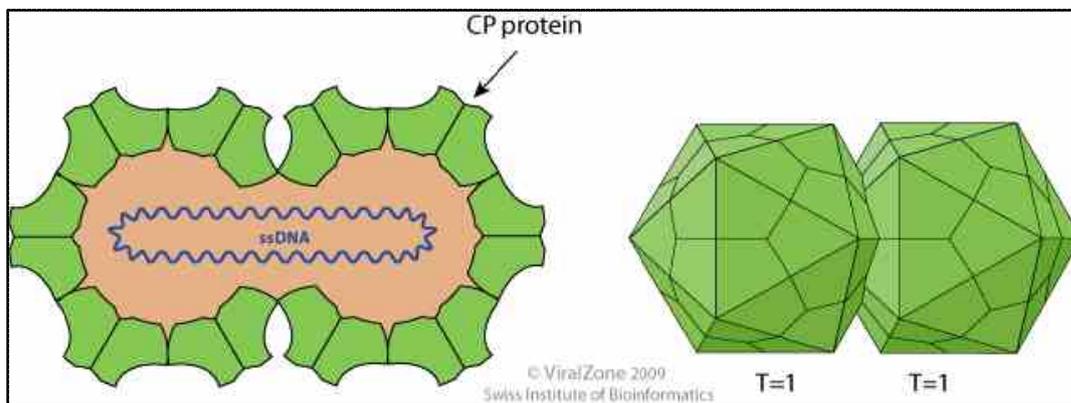


Fig 1; Sin envoltura, alrededor de 38 nm de longitud y 22 nm de diámetro (para Maize streak virus; MSV), formado por dos icosaedros (T=1). La cápsida contiene 22 capsómeros pentaméricos formados por 110 proteínas de la cápsida (CP). Cada partícula contiene sólo un ADN circular de cadena simple

1.1.1 Clasificación

La familia *Geminiviridae* está dividida en 4 géneros:

- *Mastrevirus*: el virus representante de este género es el *Maize streak virus*, MSV
- *Curtovirus*: el virus representante de este género es el *Beet curly top virus*, BCTV
- *Topocuvirus*: el virus representante de este género es el *Tomato pseudo-curly top virus*, TPCTV
- *Begomovirus*: el virus representante de este género es el *Tomato yellow leafcurl virus*, TYLCV

Estos virus contribuyen sólo con unos pocos factores para su replicación y transcripción y son dependientes de las ARN y ADN polimerasas nucleares de la planta hospedadora. (Hamilton *et al.* 1983, Harrison 1985, Davies y Stanley 1989,

Bisaroet *al.* 1990, Fauquet y Fargette 1990, Lazarowitz 1992, Mayo y Martelli 1993, Fonteset *al.* 1994b, Laufset *al.* 1995).

Los virus son asignados a un género de acuerdo a su similitud en la secuencia, insectos vectores que los transmiten y plantas hospedadoras. Como se indicó antes, los pequeños genomas de los geminivirus no codifican su propia ADN polimerasa y las polimerasas de reparación del huésped podrían no ser lo suficientemente eficientes para propagar el ADN viral, por eso, los geminivirus son capaces de inducir la entrada en fase S en células diferenciadas que se encuentran en G0.

En el genoma de los geminivirus, los marcos abiertos de lectura (ORFs) están orientados bidireccionalmente y una región intergénica (IR) contiene promotores en ambas direcciones y el origen de replicación. Las señales de terminación se localizan de forma opuesta a la región intergénica.

Los genes responsables de la regulación de la replicación y la transcripción se encuentran codificados en la cadena que se encapsida o cadena del virión y los relacionados con el movimiento, en la cadena complementaria.

Algunos geminivirus tienen todos los genes necesarios para una infección completa en un componente. Estos virus se denominan monopartitos (son todos los miembros de los géneros Mastrevirus, Curtovirus y Topocuvirus y algunos de los Begomovirus).

1.1.2 El género Begomovirus

El genoma de begomovirus puede ser monopartito o bipartito. Los genomas bipartitos con dos componentes, llamados ADN A y ADN B, aparecen sólo en el género *Begomovirus*. Con el incremento del conocimiento acerca de la función de los genes, se acuñan nombres como *Rep* (proteína asociada a la replicación), *TrAP* (proteína activadora de la transcripción), *REN* (enhancer de replicación), *CP* (proteína de cubierta), *PCP* (proteína de pre-cubierta), *MP* (proteína de movimiento), y *NSP* (proteína lanzadera nuclear). Estos nombres describen las funciones iniciales identificadas, aunque se sabe que los productos de estos genes cumplen múltiples funciones.

La organización del genoma de geminivirus refleja una regulación temporal por la expresión de genes tempranos y genes tardíos (Shimada-Beltran y Rivera-Bustamante 2007).

Una vez que el virus es inoculado en la planta por el insecto vector, se deshace de la proteína de cubierta y alcanza el núcleo celular, donde sintetiza la cadena complementaria a partir de la cadena viral que entra a la célula vegetal. Esta síntesis se realiza completamente con la maquinaria de replicación del hospedador y usando un primer de secuencia corta, que es complementaria a los nucleótidos que se encuentran en la región en común (Xiong 1998).

Esto le permitirá al virus expresar los genes que se localizan en la cadena complementaria, y multiplicarse por el mecanismo del círculo rodante.

Los genomas de los begomovirus bipartitos constan de dos moléculas de ADN circulares (ADN A y B) de aproximadamente el mismo tamaño que presentan genes

tanto en la cadena del virión (V) como en la cadena complementaria (C) resultante del proceso de replicación. Se localizan cinco genes en la molécula de ADN A (AC1, AC2, AC3, AC4, AV1) y dos genes en la molécula de ADN B (BC1, BV1) (Davies y Stanley 1989, Lazarowitz 1992, Hanle-Bowdoin *et al.* 1999) (Fig. 2)

El ADN A codifica para las proteínas necesarias para la replicación (Elmer *et al.* 1988, Hanley-Bowdoin *et al.* 1990) y la encapsidación del ADN viral (Sunter *et al.* 1987). El gen Rep codifica la única proteína esencial, la proteína Rep de 41 kD, (Fontes *et al.* 1992, Lazarowitz 1992).

En begomovirus bipartitos, ambos componentes son necesarios para una infección eficiente y el ADN B no puede duplicarse en la ausencia del ADN A (Gilbertson *et al.* 1991, Hamilton *et al.* 1983, Liu *et al.* 1997, Stanley 1983).

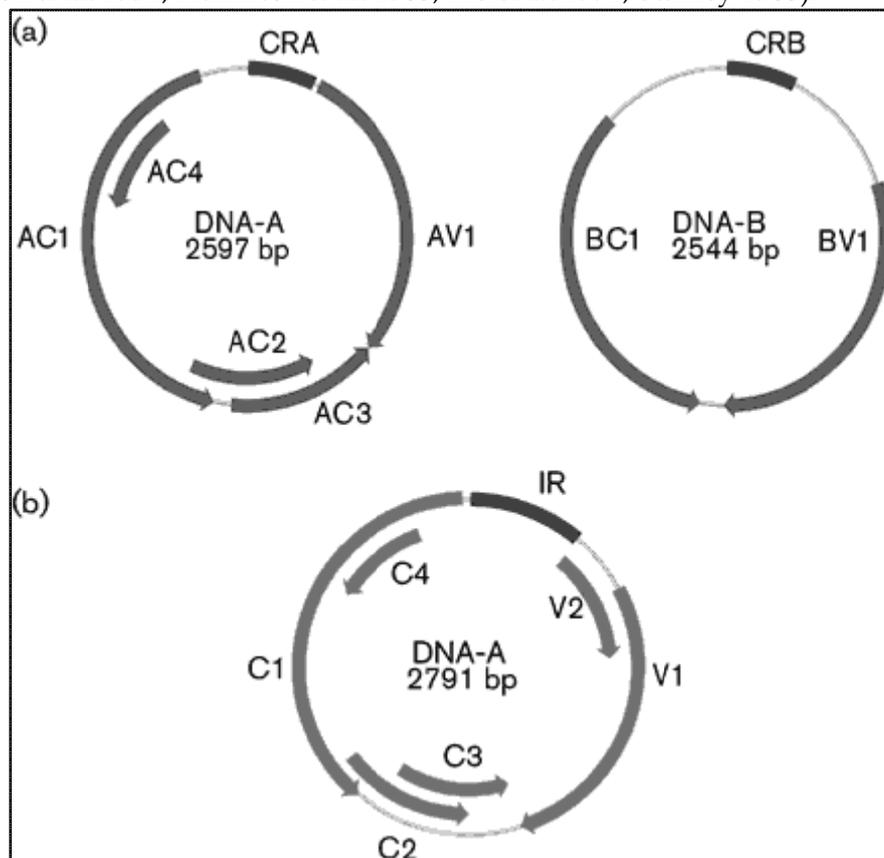


Fig 2: Organización del genoma (a) un begomovirus bipartito *Tomato mottle virus* (TMV) y de (b) un begomovirus monopartito *Tomato yellow leafcurl virus* (TYLCV)

Los begomovirus monopartitos presentan un único componente genómico donde se localizan todos los genes esenciales para la replicación, transcripción, encapsidación y movimiento viral. Su ADN presenta 6 genes, de los cuales 4 de ellos están ubicados en la cadena complementaria (C1, C2 y C3) y los dos restantes en la cadena del virión (V1 y V2). Los genes ubicados en la cadena complementaria codifican proteínas con funciones implicadas en la replicación, transactivación de los genes que se encuentran en la cadena del virión y multiplicación viral. Por otro lado, los genes ubicados en la cadena del virión codifican proteínas implicadas en la encapsidación y movimiento del virus (Vanitharani *et al.*, Chepallan *et al.* y Fauquet *et al.*, 2005)

La enfermedad del rizado amarillo del tomate fue descrita por primera vez en Israel en 1939, encontrándose actualmente distribuida por las zonas cálidas y templadas de todo el mundo. La enfermedad está causada por un complejo de virus que pertenecen al género *Begomovirus*. Las plantas de tomate infectadas por *Tomato yellow leafcurl virus* (TYLCVs) presentan enanismo, con los fillos de la hoja rizados en ambos sentidos y las hojas jóvenes son ligeramente cloróticas. En las plantas con una infección reciente, los frutos puede que no se produzcan y si se producen son enanos y carentes de valor comercial (Díaz-Pendón et al. 2010)

Los genes del *begomovirus* monopartitos, *Tomato yellow leafcurl virus*, TYLCV son el objeto de nuestro estudio. De los 6 ORFs, dos de ellos están en la cadena del virión y el resto en la cadena complementaria. Las proteínas para las que codifican son las siguientes:

- **V1 o CP:** es la proteína de la cápside y es necesaria para la infección sistemática y la transmisión a través del insecto vector (Wartig et al., 1997)
- **V2:** es una proteína relacionada con el movimiento del virus y sólo se encuentra en geminivirus monopartitos (Wartig et al., 1997). Se ha visto que tiene una función como supresor del silenciamiento postranscripcional (PTGS), interfiriendo en la amplificación del proceso de silenciamiento (Zrachya et al., 2007)
- **C1 o Rep:** proteína esencial para la replicación (Elmer et al., 1988). Posee actividades catalíticas de corte y ligación que son necesarias para la replicación de las moléculas virales a través del mecanismo de círculo rodante. Es capaz de reclutar a la maquinaria celular necesaria para la progresión de la fase S mediante su interacción con la proteína retinoblastoma (Rb), la cual es un regulador maestro de ciclo celular. Además, Rep actúa como un autorregulador transcripcional mediante su unión a su propio promotor (Laufs et al., 1995; Clérot et al., 2006; WeiShen et al., 2006).
- **C2 o TrAP:** es un factor de transcripción de los genes tardíos (Wartig et al., 1997) y se ha visto que tiene actividad supresora del silenciamiento postranscripcional (PTGS) por múltiples mecanismos (Voinnet et al., 1999; Van et al., 2002; Trinks D et al., 2005; Bisaro D.M. et al., 2006; Yang X et al., 2007). Esta proteína inhibe además el silenciamiento transcripcional (TGS) a partir de la interacción con quinasas relacionadas con la metilación del ADN y activando la expresión de algunos genes celulares que lo regulan negativamente (Buchmann et al., 2009)
- **C3 o REn:** proteína de estimulación o potenciadora de la replicación (Sunter et al., 1990; Laufs et al., 1995).
- **C4:** es una proteína pequeña que se encuentra dentro de la secuencia de Rep pero en una fase de lectura distinta, y es imprescindible para el movimiento sistémico del virus (Jupin et al., 1994). Además se ha visto en otros geminivirus que tiene actividad supresora del PTGS (Vanitharani et al., 2004 y 2005)

1.2. Silenciamiento génico

A lo largo de la evolución, las plantas han desarrollado mecanismos de defensa ante la entrada o movimiento de ácidos nucleicos invasores. Uno de estos mecanismos es el silenciamiento mediado por ARN de interferencia o "RNA

Silencing” en el cual los genes homólogos a secuencias de ARN de doble cadena son silenciados de una manera específica. Este tipo de defensa es utilizada por las plantas en presencia de virus invasores, tanto de ARN como de ADN, para evitar el progreso de la infección.

El silenciamiento génico está presente en todos los organismos eucariotas y participa en la defensa contra virus y viroides, protege el genoma de transposones y regula la expresión génica (Baulcombe, 2004). Se denomina “quelling” en hongos, silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) en plantas e interferencia debida por ARN (RNAi) en animales (Baulcombe, 2004). El componente más importante del mecanismo de silenciamiento es el pequeño ARN interferente, que le permite al resto de la maquinaria (a través del apareamiento de bases) llevar a cabo el silenciamiento de genes específicos a varios niveles de la expresión génica.

Estos pequeños ARNs pueden tener entre 19 y 28 nucleótidos. En las plantas existen dos rutas de silenciamiento bien diferenciadas (Baulcombe, 2004), el silenciamiento génico transcripcional (TGS), que está relacionado con la metilación de ADN e histonas y el silenciamiento génico postranscripcional (PTGS), que guía la inhibición de la traducción de ARNm endógeno o bien conduce a la degradación de ARNm de virus, viroides, transgenes y transposones.

El PTGS es un mecanismo descrito en plantas y mediante el cual la maquinaria celular desencadena la degradación de un ARNm. Se dice que esta degradación es “específica de secuencia”, ya que sólo serán degradadas las moléculas de ARNm que contengan una secuencia en particular y no otros.

A pesar de que el fenómeno de silenciamiento génico fue descrito por primera vez hace más de 15 años, aún no se conoce con precisión su mecanismo molecular. Sin embargo, se ha avanzado mucho en estudios que lo describen parcialmente.

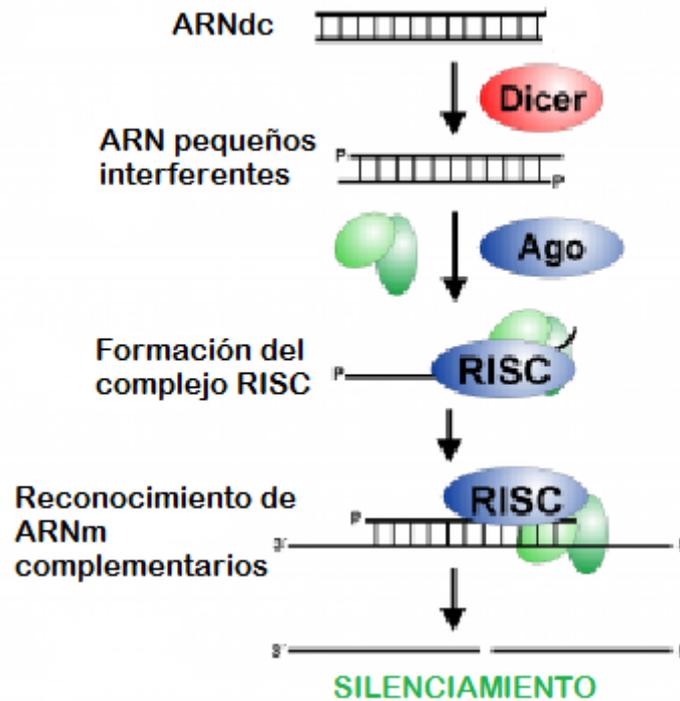
Utilizando análisis bioquímicos y genéticos se ha podido establecer un modelo que describe cómo se produce el PTGS. En este modelo, el silenciamiento puede dividirse en una etapa de iniciación y en otra etapa efectora y de mantenimiento.

La etapa de iniciación comienza con la presencia de un ARN doble cadena (ARNdc). Este ARNdc puede ser un intermediario de replicación de un virus, puede haber sido introducido artificialmente o puede provenir de un transgén. El ARNdc es reconocido y es digerido por la enzima Dicer, que posee dominios de ARNasa tipo III (enzimas que degradan moléculas de ARN) para formar moléculas de ARN pequeñas de 21-26 nucleótidos de longitud, también llamados “ARN guía”.

En la etapa efectora, el ARN guía se une a un complejo con actividad de nucleasa (enzimas que degradan ácidos nucleicos) para formar el complejo RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN). La actividad helicasa de RISC separa las dos hebras del ARN guía y sólo una de ellas permanece unida al complejo. A este complejo se le asocian otros complejos enzimáticos, llamados proteínas argonautas (proteínas efectoras del silenciamiento génico, son las proteínas que proporcionan la funcionalidad al complejo). Una vez que RISC está activado, tiene como blanco la degradación de los ARN mensajeros homólogos a dichos ARNs guía.

En plantas existe además una etapa de amplificación que ocurre mediante la producción de copias del ARNdc que originó el silenciamiento, generando más moléculas de ARNs guía; o directamente mediante la replicación de los ARN guía.

En estos fenómenos interviene una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP, capaz de sintetizar moléculas de ARN empleando ARN como molde). Por otro lado, el silenciamiento desencadenado en un punto particular de la planta genera una señal móvil que es capaz de disparar el fenómeno en tejidos alejados del sitio de inicio. Si bien todavía no se conoce con exactitud la naturaleza de esta señal, existen pruebas contundentes que involucran a los ARNs guía como participantes en este proceso.



1.2.1 Los geminivirus y el silenciamiento génico

Los virus vegetales de ARN así como los de ADN (como los geminivirus), pueden ser inductores y/o blancos del sistema de silenciamiento.

Los virus vegetales de ARN se replican a través de la formación de intermediarios de ARN de cadena doble (ARNdc), los cuales son los inductores del silenciamiento. A diferencia de los virus de ARN, los geminivirus no emplean intermediarios de ARNdc durante su replicación por lo que se postula que los geminivirus son capaces de disparar el silenciamiento a partir de ARNdc producidos por estructuras secundarias provenientes de los transcritos y transcritos convergentes.

Además de ser blanco del sistema de silenciamiento a nivel postranscripcional (PTGS), existe evidencia de que los geminivirus también son blanco de procesos epigenéticos mediados por las rutas de silenciamiento a nivel transcripcional (TGS) en el núcleo de las células hospedadoras. Genes chivatos transgénicos cuya expresión está controlada por promotores geminivirales, son transcripcionalmente silenciados después de que las plantas transgénicas de tabaco que los contienen sean infectadas con el virus homólogo. El silenciamiento del gen chivato está asociado con la hipermetilación del ADN de los promotores virales (Seemanpillai et al., 2003). Estos resultados sugieren que las señales que inducen el TGS (pequeños ARN virales) son

producidas durante la infección y que éstas son capaces de regular negativamente al transgen y posiblemente a las moléculas virales episomales.

Por otra parte, estudios recientes empleando diferentes fondos mutantes de *A. thaliana* deficientes en la ruta de silenciamiento transcripcional, han mostrado que plantas deficientes en enzimas claves para la metilación del ADN como las metiltransferasas, son hipersusceptibles a la infección por algunos geminivirus (Buchmann et al., 2009). Estos resultados remarcan la importancia del TGS como mecanismo de defensa contra los geminivirus.

1.2.2 Supresión del silenciamiento

Actualmente, existen crecientes evidencias de que la mayoría, si no todos, los virus de plantas han adoptado estrategias para escapar de esta capacidad defensiva de la planta y asegurarse la invasión sistémica. La forma más habitual, aunque no la única, de contrarrestar este mecanismo defensivo basado en el silenciamiento de ARN es la expresión de factores proteicos de origen viral que actúan suprimiendo el silenciamiento génico inducido por virus a diferentes niveles (revisado en Roth et al., 2004). Como ejemplos de estos supresores virales, se han descrito la proteína 2b del Virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV), la p25 del Virus X de la patata (*Potato virus X*, PVX), la P1-HcPro del Virus del grabado del tabaco (*Tobacco etch potyvirus*, TEV) o la p19 del Virus del enanismo ramificado del tomate (*Tomato bushy stunt virus*, TBSV), entre otros. Estos ejemplos pertenecen a virus no relacionados filogenéticamente, lo que hace pensar que la capacidad de supresión del silenciamiento génico de ARN es una propiedad generalizada de los virus (revisado por Dunoyer y Voinnet, 2005; Qu y Morris, 2005; Brodersen y Voinnet, 2006).

Concretamente, la P1-HcPro de TEV, que es una proteína determinante de patogenicidad en el sinergismo y movimiento a larga distancia, previene la degradación del ARN ya que interfiere con el ARN guía, impidiendo que el enzima Dicer lo procese. Sin embargo, no elimina la señal móvil que propaga el silenciamiento (Chapman et al., 2004; Dunoyer et al., 2004).

1.2.3 Supresores de silenciamiento geminivirales

Se ha visto que los *Curtovirus* y *Begomovirus* codifican proteínas capaces de suprimir el silenciamiento.

Los geminivirus han desarrollado estrategias eficientes para escapar de las respuestas de las plantas hospedadoras contra el virus.

Hasta la fecha se han descrito que tres de las proteínas de los geminivirus, además de realizar otras funciones, actúan como supresores del silenciamiento. Estas proteínas son C2, V2 y C4

El gen C2 es el más extensamente estudiado y caracterizado como supresor del silenciamiento en distintos geminivirus, el cual es capaz de interferir tanto en la ruta de silenciamiento post-transcripcional (PTGS) como en la metilación del ADN dirigida por ARN guía (TGS). C2 es un factor de transcripción que se necesita para la expresión de genes virales tardíos. Actúa en el núcleo, por un mecanismo que depende de la

interacción con el ADN y la activación transcripcional. Se han obtenido evidencias de que C2 juega un papel en la modificación del transcriptoma de la planta huésped. C2 induce la expresión de aproximadamente 30 genes, incluyendo el gen WEL1 (Wernedexonuclease-like 1). El análisis de WEL1 indica que es capaz de suprimir el silenciamiento indirectamente por activación de la expresión de una proteína que podría funcionar como regulador endógeno negativo del sistema. El mecanismo por el que ocurre esta supresión no está todavía claro (Trinks et al., 2005). Se han obtenido pruebas de que existe una supresión del silenciamiento independiente de la transcripción. C2 interactúa con la adenosina kinasa (ADK) inactivándola. ADK juega un papel principal manteniendo los niveles celulares de la S-adenosil-metionina (SAM), la cual es necesaria para el correcto funcionamiento de las metiltransferasas celulares (Lecoq et al., 2001; Moffatt et al., 2002; Weretilnyk et al., 2001). Que las plantas deficientes en ADK presenten defectos en el silenciamiento implica una función indirecta en el ciclo de la metilación en el proceso de silenciamiento (Moffatt et al., 2002; Wang et al., 2003). Numerosas evidencias sugieren que C2 participa en un mecanismo de supresión indirecta relacionado con la inhibición metabólica de la transmetilación dirigida a ARN pequeño interferente, que podría interferir en las modificaciones epigenéticas del genoma viral.

Existen evidencias de que la proteína V2 también es otro supresor de silenciamiento que actúa a nivel postranscripcional. Ésta evita la unión de ARNdc a Dicer en la ruta de silenciamiento después de la producción de ARN guía a través de su interacción con la proteína SGS3, la cual tiene un importante papel en el proceso de amplificación de las señales de silenciamiento. Posiblemente, V2 también interfiera en la ruta de silenciamiento de microARN (Chellappan et al. 2005; Sunter et al. 2001)

Finalmente, se sabe que C4 suprime el silenciamiento citoplasmático y la ruta por microARN interfiriendo en una etapa común a ambos. Se ha propuesto que el mecanismo de acción es a través de su interacción directa con pequeños ARN irrumpiendo así la cascada río abajo de la ruta (Vanitharani et al. 2004)

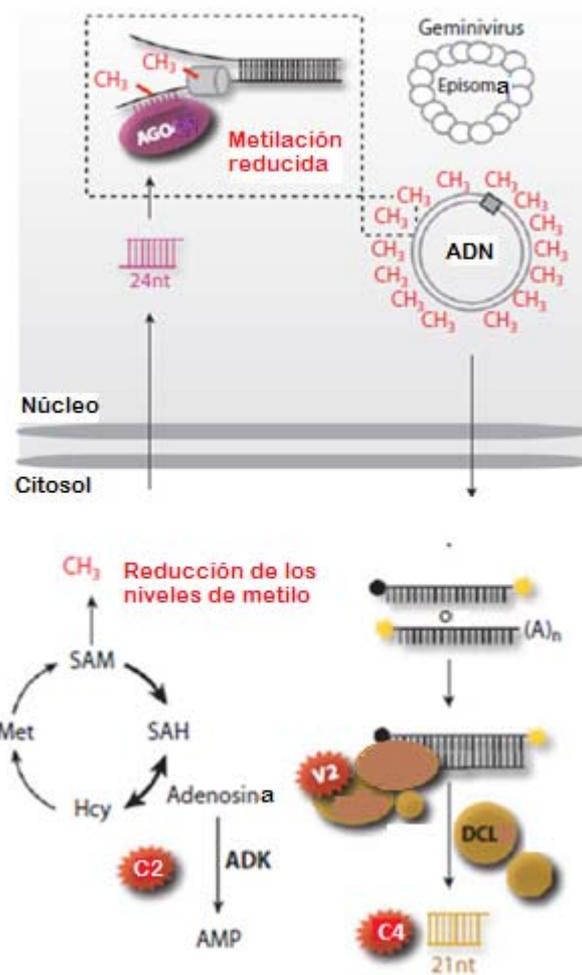


Fig 3: Modos de acción de los supresores de silenciamiento en geminivirus. Inhibición de la polimerasa dependiente de ARN mediada por V2 y supresión por metilación del DNA a través de la proteína C2.

1.3 Antecedentes del grupo

Actualmente solo la proteína C2 ha sido descrita como supresor de silenciamiento a nivel transcripcional, pero cabe la posibilidad de que alguna otra proteína de los geminivirus pudiese actuar a este nivel. Por tal motivo en nuestro laboratorio decidimos analizar las distintas proteínas del virus TYLCSV (*Tomato yellow leaf curl sardinia virus*) como posibles supresores del TGS. Como herramienta se empleó la línea de *A. thaliana* denominada L5 (Elmayan et al., 2005). Esta línea fue obtenida por transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* silvestres del ecotipo Columbia (Col-0) con ADN-T compuesto por el gen marcador β -Glucoronidasa (GUS), el promotor 35S de *Citomegalovirus* (CMV) y el gen NptII, que confiere resistencia a kanamicina (Elmayan et al., 1998). La línea L5 es homocigótica para el transgén 35S:GUS, y éste se encuentra en múltiples copias y además, está metilado, lo cual hace que esté silenciado a nivel transcripcional.

Mediante análisis genéticos y moleculares de la línea L5, se ha determinado que al menos 11 genes relacionados con la ruta de silenciamiento transcripcional son responsables del mantenimiento del silenciamiento del gen chivato. La expresión en estas plantas L5 de una proteína viral que actúe como supresor de silenciamiento transcripcional, debería de producir el alivio del silenciamiento previamente establecido.

Para obtener una expresión uniforme en las plantas L5 (en todas las células) de las proteínas virales, el grupo de la Dra. Castillo, decidió generar plantas transgénicas que sobreexpresaran de manera individual las seis proteínas de TYLCSV.

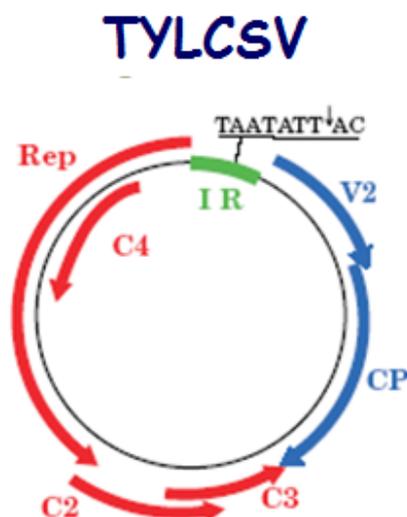
Debido a que varios de los productos de los genes virales producen alta toxicidad, se decidió clonar los genes virales bajo el control de un promotor inducible por estradiol denominado pER8. En un trabajo muy reciente en fase de publicación, el grupo ha mostrado que las proteínas Rep y C4 de TYLCSV son capaces de interferir con la maquinaria de silenciamiento transcripcional a través de la represión de la expresión de las metiltransferasas de ADN (MET1 y CMT3), lo cual conlleva a una hipometilación del genoma de la planta en presencia de ambas proteínas virales (Rodríguez-Negrete et al., en revisión en *New Phytologist*). Por tal motivo el análisis de la capacidad para revertir el silenciamiento en las líneas L5 por parte de Rep y C3 sería de gran utilidad para corroborar la actividad supresora de estas proteínas.

II. OBJETIVOS

1. Caracterización genética de las líneas transgénicas de *A. thaliana* que expresan las proteínas virales Rep y C3 en el fondo L5: comprobación del número de inserciones del transgen viral
2. Caracterización molecular de las líneas transgénicas de *A. thaliana* que expresan las proteínas virales Rep y C3 en el fondo L5: niveles de expresión de las proteínas virales en presencia y ausencia de β - estradiol
3. Identificación de la posible actividad supresora del silenciamiento transcripcional de las proteínas virales Rep y C3 en las plantas transgénicas previamente caracterizadas

III. RESULTADOS

Previamente a este trabajo de fin de máster, el grupo de la Dra. Castillo construyó una versión mutante de TYLCSV para el gen que codifica C4. La versión de Rep sin C4 se obtuvo sustituyendo la Timina del codón de inicio de C4 por una Citosina. Esta mutación elimina el codón de inicio de C4 sustituyéndolo por una tirosina. Al mismo tiempo, la mutación introducida es silenciosa para el marco de lectura de Rep, por lo cual la traducción de dicha proteína no se ve afectada.



TYLCSV C4 WT	ATG GGC AAC CTC ATC TCC ACA TGC TCA TTC AGT TCG
Mut C4	ACG GGC AAC CTC ATC TCC ACA TGC TCA TTC AGT TCG

La versión del marco de lectura abierta de Rep que contiene C4 mutado fue obtenida por la técnica de extensión de fragmentos de PCR superpuestos previamente descrita (Ho et al., 1989). Dos pares de iniciadores fueron empleados en las dos reacciones de PCR iniciales: OTYRep1/ RepmC42 y RepmC42/OTYRep4 (Tabla1). Los primers RepmC42 y RepmC42 contienen la mutación necesaria para introducir un codón de parada en el aminoácido número 9 (TGA-TCA) del marco de lectura de C4 sin alterar la fase de lectura de Rep. Posteriormente, se emplearon los iniciadores RepmC42/OTYRep4 para obtener el producto de fusión deseado. El producto de PCR obtenido, fue clonado en el plásmido pBluescriptSKII+ (Invitrogen) en el sitio como EcoRV para obtener la construcción pBSTSRep-C4.

OTYRep1	CATTGACCCCATGGCTCAGCCTAAG
OTYRep4	ACAGTCCGCATCCACCCTTCTACG
RepmC41	CATGCTGATTTCAGTTCGAGGG
RepmC42	CCCTCGAACTGAATCAGCATG

(Tabla 1)

Por otro lado, el marco de lectura abierto de C3 fue amplificado por PCR con los iniciadores C3TSFw y C3TSRv. El producto de PCR fue clonado en pBlueScriptSKII+ en el sitio romo EcoRV para obtener la construcción pBSTSC3.

Las construcciones pBSTSRep-C4 y pBSTS C3 fueron digeridas con SpeI y XhoI. Los fragmentos que contienen la versión de Rep con C4 mutado y C3 fueron subclonados en el vector PER 8 que contiene un promotor inducible por β - Estradiol (Jianru et al., 2000), digerido con las mismas enzimas para producir las construcciones PERTSRep-C4 y PERTSC3 respectivamente. Ambas construcciones fueron propagadas y almacenadas en E. coli DH5 α . Posteriormente, las construcciones fueron introducidas en la cepa GV3103 de *Agrobacterium tumefaciens* mediante electroporación.

Las cepas de *A. tumefaciens* obtenidas, fueron empleadas para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* L5, las cuales contienen un transgen GUS bajo el control del promotor 35S silenciado epigenéticamente (Elmayan et al., 2005) mediante la técnica de inmersión floral (Clough and Bent, 1998). De estas plantas, se obtuvieron semillas T1, y estas semillas se hicieron germinar. Se utilizaron para este trabajo semillas T2 (semillas de las plantas T1).

Posteriormente, estas semillas fueron esterilizadas superficialmente y aproximadamente 200 semillas procedentes de las diferentes líneas transgénicas fueron germinadas en medio MS suplementado con 30 μ g/ml de Hygromicina B y crecidas en un fotoperiodo de día largo durante dos semanas. Las plántulas sensibles y resistentes al antibiótico fueron cuantificadas, y la segregación del transgen fue analizado mediante la prueba de χ^2 (Cuzzi et al., 1972). Los datos de segregación permiten la determinación del número de insertos presentes en las plantas transformadas. Aquellas líneas con segregación 3:1 (aparecen plantas con resistencia a Hygromicina y plantas sin esta resistencia en proporción 3:1 de acuerdo a las leyes de Mendel), en las cuales se asume que existe una sola integración del transgen que proporciona resistencia a la Hygromicina, fueron utilizadas para los posteriores análisis.

Líneas	Total	Sensibles a Hyg		Resistentes a Hyg		Valor de χ^2 *	Relación
		Observadas	Esperadas	Observadas	Esperadas		
RL5-1	162	53	40,5	109	121,5	5,144	3:1
RL5-2	164	13	41	151	123	**25,49	-
RL5-3	159	59	39,75	100	119,25	**12,43	-
RL5-4	147	22	36,75	125	110,25	**7,89	-
RL5-5	144	38	36	106	108	0,148	3:1
CL5-1	163	12	40,75	151	122,25	**26,69	-
CL5-2	175	44	43,75	131	131,25	0,0019	3:1
CL5-3	163	34	40,75	129	122,25	1,49	3:1
CL5-4	163	19	30,97	144	132,03	**5,71	-
CL5-5	132	43	33	89	99	4,04	3:1

(Tabla 2)*Si el valor de Chi-cuadrado calculado para un experimento es mayor que el correspondiente al de la probabilidad del 5% se rechaza la hipótesis. El valor calculado es menor que el valor encontrado en la tabla de Chi-cuadrado por lo que se acepta la hipótesis de que los datos se ajustan a una distribución 3:1.

**No cumple la segregación mendeliana 3:1 ($p \leq 0.05$)

También se germinaron semillas de la línea L5 no transformadas en medio MS sin Hygromicina B para usar este material como control.

Parte de las plántulas seleccionadas como resistentes según los valores obtenidos de χ^2 correspondientes a las líneas RL5-1, RL5-5, CL5-2, CL5-3 y CL5-5, fueron transferidas a un medio inductivo de MS con β -estradiol ($0,2\mu\text{M}$) y fueron recolectadas a los 1, 3, 5 y 7 días de inducción.

Se aisló el ARN de las plántulas inducidas homogeneizando el tejido y se trató el ARN con DNasa I libre de RNasa como control interno para asegurarnos de que no existen contaminación con ADN. A continuación se llevó a cabo una reversotranscripción para obtener ADNc que posteriormente, fue usado como molde para PCR semicuantitativa. La PCR semicuantitativa se realizó para comprar los cambios en la expresión de genes en diferentes tiempos de inducción.

En las figuras 1 y 2 podemos observar el resultado de la RT-semiqPCR que se realizó con el fin de estudiar la expresión de las proteínas virales a los 1,3,5 y 7 días de inducción. En ambas figuras podemos apreciar un decaimiento progresivo a partir del día 3 de inducción en la expresión de proteínas virales. Esto podría explicarse por la bajada en la concentración de agente inductor.

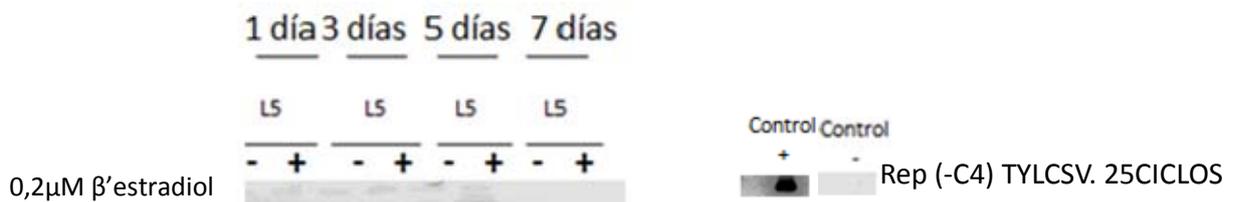
Además en la figura 1 podemos indicar que la línea transgénica RL5-5 parece tener una mayor expresión que la línea transgénica RL5-1.

Figura 1

A) Cinética de inducción de las líneas PER8 Rep (-C4)



B) Controles internos



C) Cuantificación de la expresión de Rep (-C4)

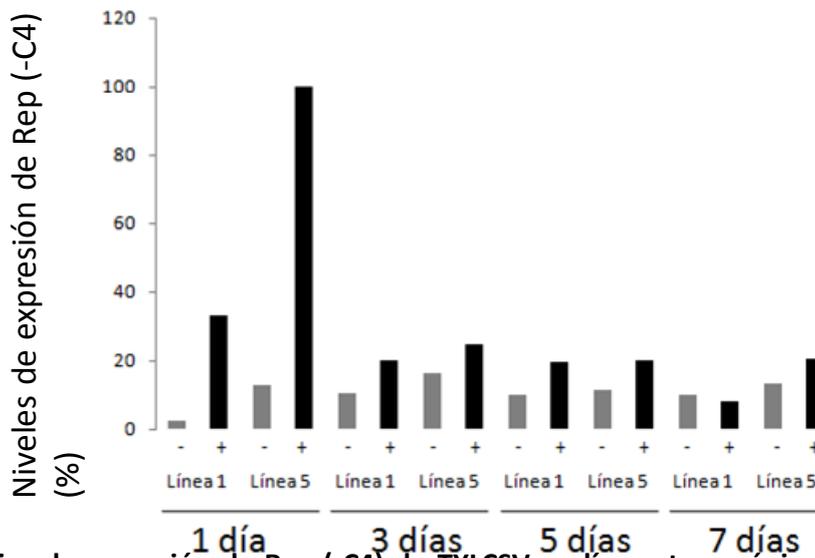
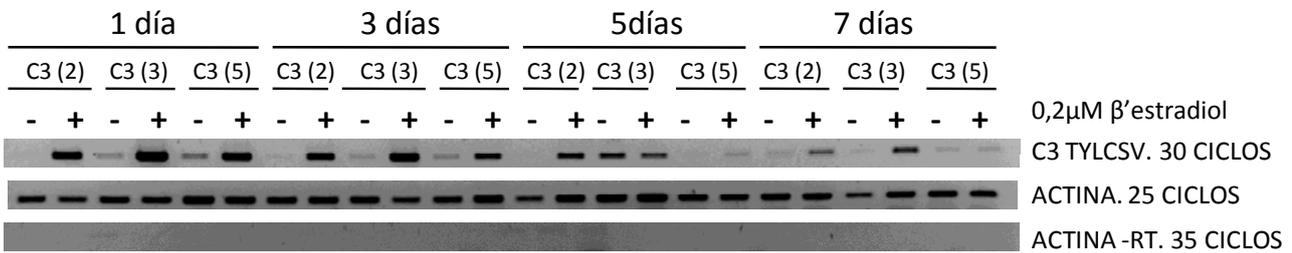


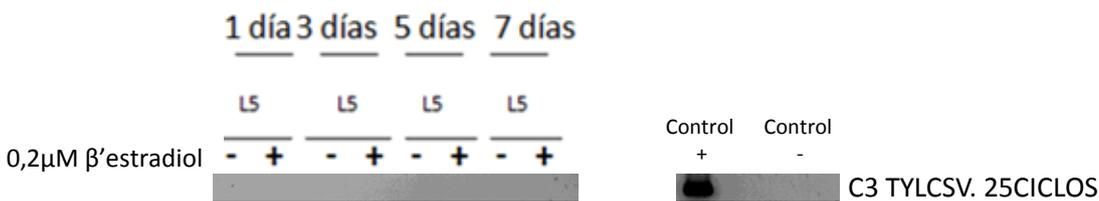
Figura 1. Cinética de expresión de Rep (-C4) de TYLCSV en líneas transgénicas. (A) Ensayo de RT-PCR semicuantitativa (sqRT-PCR) para determinar los niveles de expresión de Rep (-C4) de TYLCSV en líneas transgénicas después de la inducción del transgen con 0,2μM de β-estradiol a distintos tiempos. La imagen muestra los distintos productos de PCR separados en un gel de agarosa al 2%. Rep (-C4) (panel superior), actina usado como control de expresión constitutiva (panel medio), y control de actina -RT (sin reversotranscriptasa) (panel inferior) (B) Controles internos de la PCR en donde se muestra que las líneas control (L5) no presentan expresión del transgen. (C) Cuantificación de los niveles de expresión de Rep (-C4) en líneas transgénicas. Las bandas fueron cuantificadas empleando el programa imageJ. La intensidad de las bandas de expresión de Rep (-C4) fueron normalizadas con su correspondiente valor de banda de actina , y los valores fueron graficados como porcentaje.

Figura 2

A) Cinética de inducción de las líneas PER8-C3



B) Controles internos



C) Cuantificación de la expresión de C3

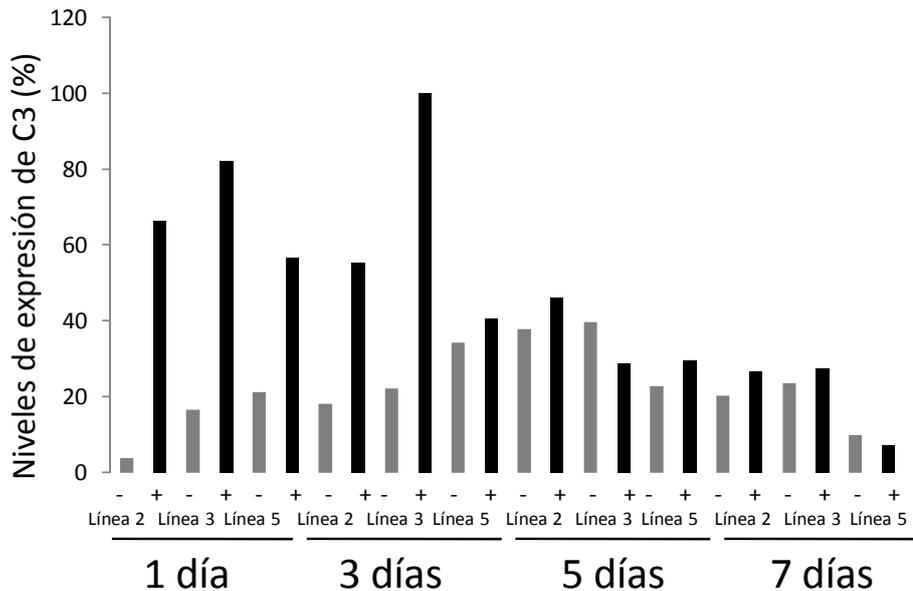


Figura 2. Cinética de expresión de C3 de TYLCSV en líneas transgénicas. (A) Ensayo de RT-PCR semicuantitativa (sqRT-PCR) para determinar los niveles de expresión de C3 de TYLCSV en líneas transgénicas después de la inducción del transgen con 0,2µM de β-estradiol a distintos tiempos. La imagen muestra los distintos productos de PCR separados en un gel de agarosa al 2%. C3 (panel superior), actina usado como control de expresión constitutiva (panel medio), y control de actina –RT (sin reversotranscriptasa) (panel inferior) (B) Controles internos de la PCR en donde se muestra que las líneas control (L5) no presentan expresión del transgen. (C) Cuantificación de los niveles de expresión de C3 en líneas transgénicas. Las bandas fueron cuantificadas empleando el programa imageJ. La intensidad de las bandas de expresión de C3 fueron normalizadas con su correspondiente valor de banda de actina, y los valores fueron graficados como porcentaje.

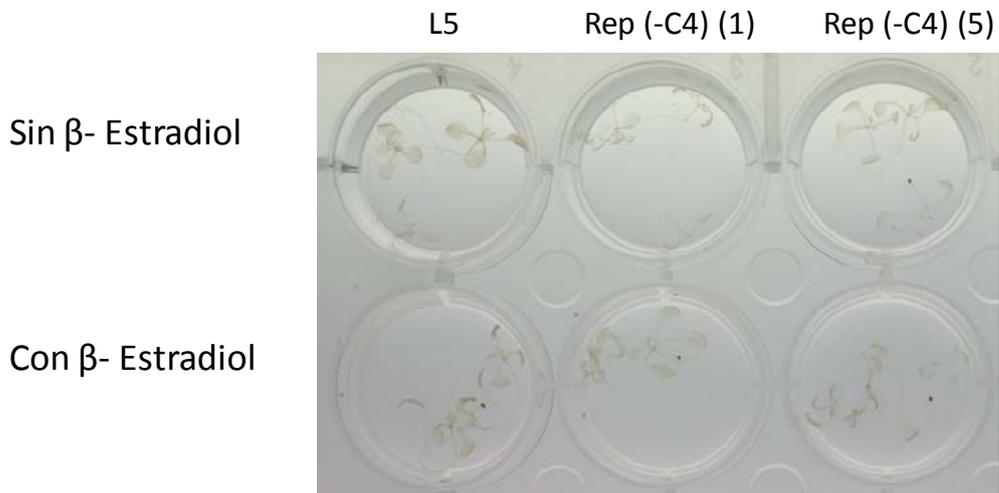
Se realizó otro experimento en el cual se sometieron a estas plántulas a una tinción histoquímica para comprobar el posible papel del gen Rep y C3 como supresores del silenciamiento previamente establecido, ya que la línea L5 es homocigótica para el transgén 35S:GUS, y éste se encuentra en múltiples copias y además, está metilado, lo cual hace que esté silenciado a nivel transcripcional. La aparición de tinción azul indicaría que los genes Rep y C3 actúan como supresores del silenciamiento.

Una parte de las plántulas se sumergieron en solución de tinción histoquímica GUS y se realizó una infiltración al vacío durante diez minutos, tres veces, seguido de una incubación a 37°C durante toda la noche. Después, las muestras fueron lavadas varias veces con etanol absoluto hasta que el tejido se clarificó lo suficiente como para poder observar la tinción.

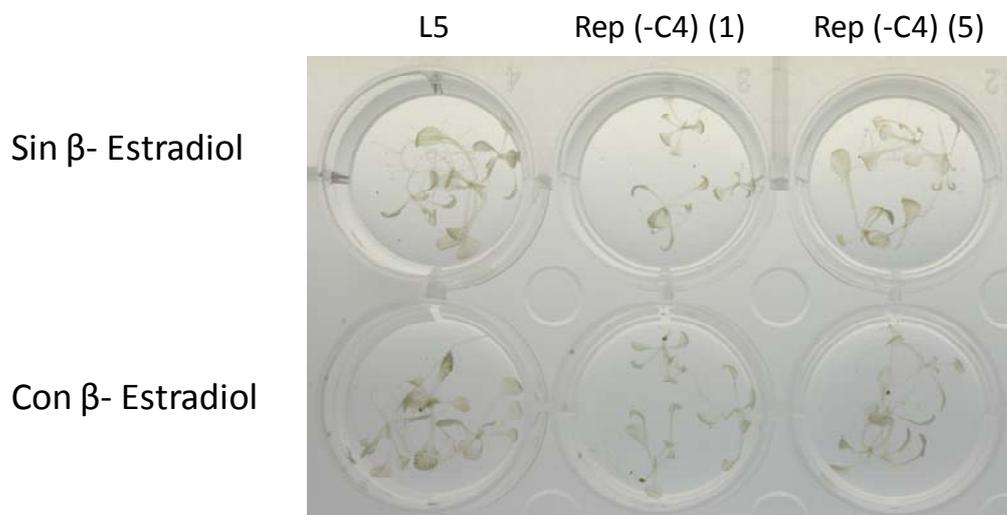
Figura 3

A) Tinción GUS Líneas L5 Rep (-C4)

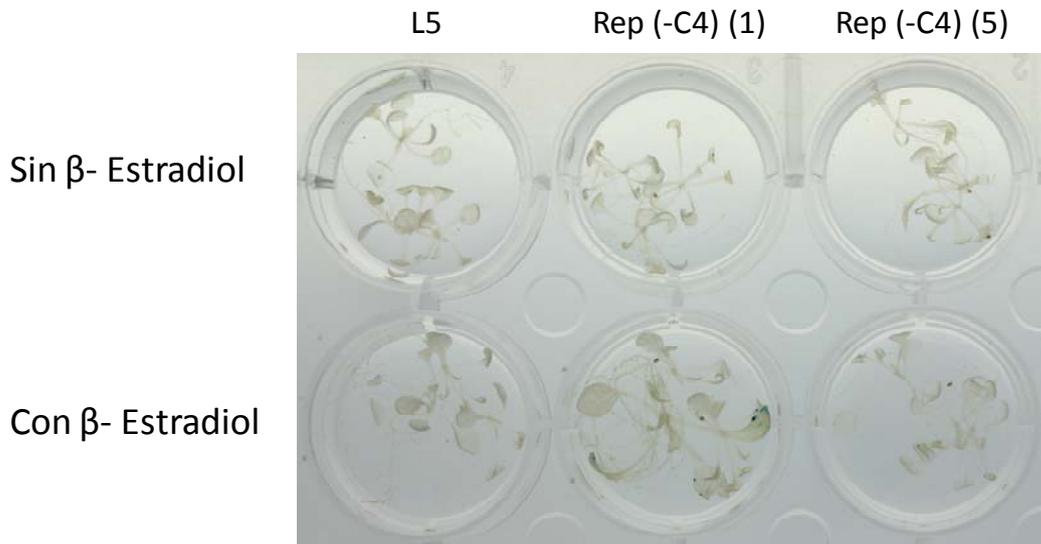
1 día



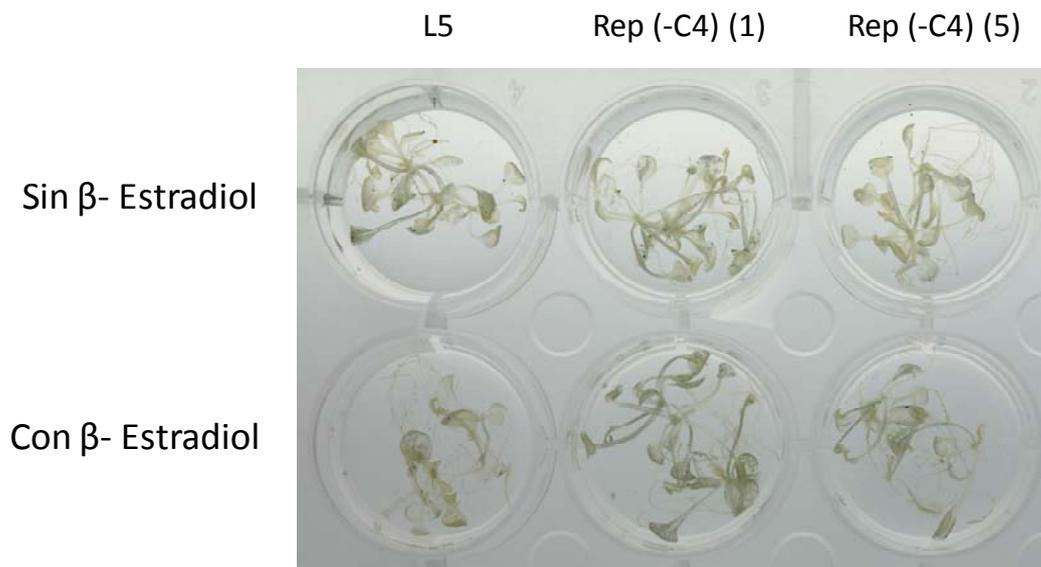
3 días



5 días

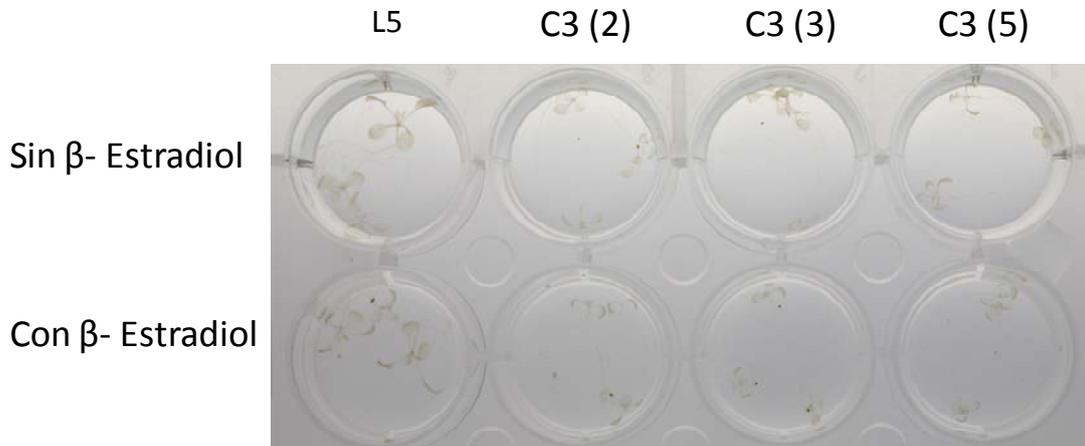


7 días

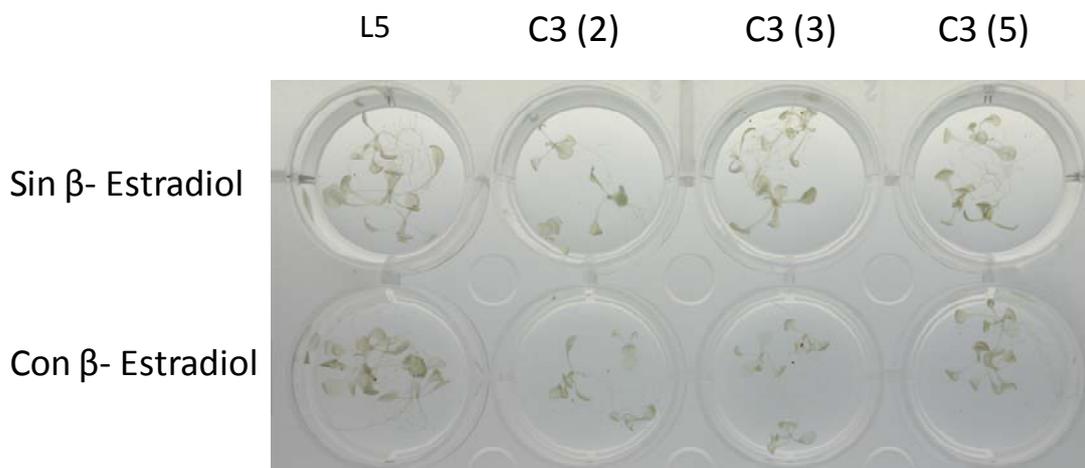


B) Tinción GUS Líneas L5 C3

1 día



3 días



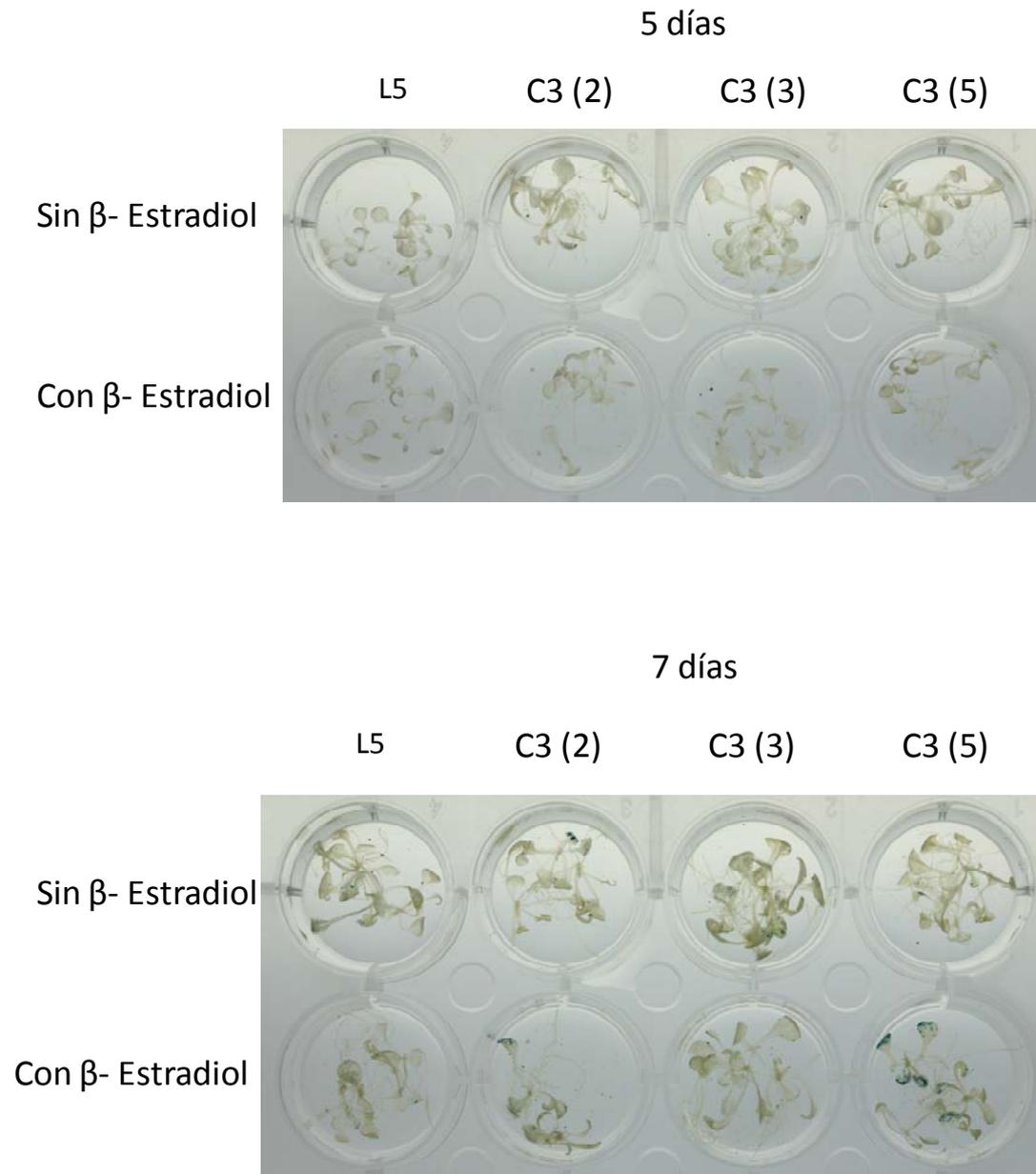
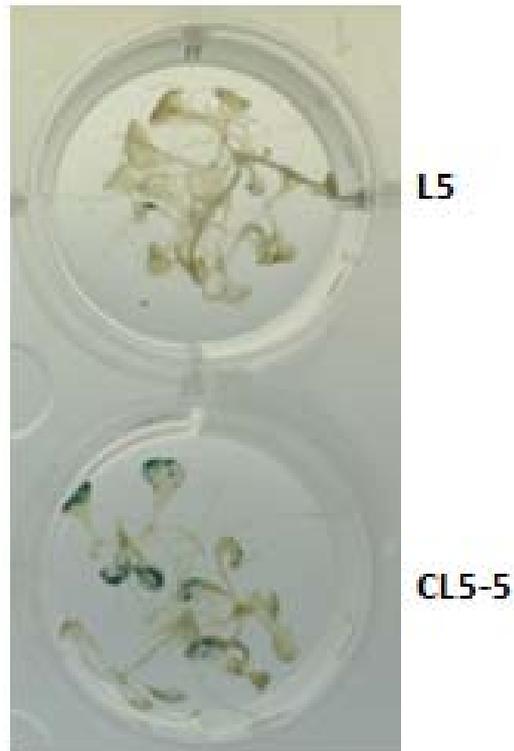


Figura 3. Tinción histoquímica de las líneas (A) Rep (-C4) y (B) C3. La imagen muestra los resultados de la tinción GUS, que fue llevada a cabo de acuerdo al protocolo previamente descrito (Ranjan et al., 2012) con pocas modificaciones. La inducción fue realizada con β ' estradiol con una concentración de $0,2\mu\text{M}$

7 DÍAS DE INDUCCIÓN



Las tinciones histoquímicas reflejan que en presencia del inductor se produce un alivio en el silenciamiento previamente establecido tanto en C3 como en Rep, aunque cabe destacar que en la línea CL5-5 en el séptimo día de inducción, se observa más claramente la tinción azul que en las demás líneas.

El estudio de la RT-semiqPCR junto con los resultados obtenidos de la tinción histoquímica muestran que en presencia del inductor, los genes virales Rep (-C4) y C3 se expresan.

IV. DISCUSIÓN

A lo largo de la evolución, las plantas han desarrollado mecanismos de defensa ante la entrada o movimiento de ácidos nucleicos invasores. Uno de estos mecanismos es el silenciamiento mediado por ARN de interferencia o “RNA Silencing” en el cual los genes homólogos a secuencias de ARN de doble cadena son silenciados de una manera específica. Este tipo de defensa es utilizada por las plantas en presencia de virus invasores, tanto de ARN como de ADN, para evitar el progreso de la infección.

Sin embargo, los virus también han desarrollado estrategias para contrarrestar los mecanismos de defensa propios de la planta. Uno de estos es la codificación de proteínas que tienen funciones supresoras de la respuesta de silenciamiento de la planta. Tal es el caso de la proteína codificada por C2, la cual es un transactivador de

los genes virales tardíos y además, presenta las actividades supresoras del silenciamiento en algunos *Begomovirus*.

El paso en la ruta de silenciamiento en el cual actúa C2 para suprimir el silenciamiento no está bien definido todavía. Sin embargo, se sabe que otros supresores virales del silenciamiento en plantas actúan en diferentes niveles en esta ruta. De esta forma, cabe la posibilidad de que alguna otra proteína de los *Geminivirus* pudiese actuar a este nivel.

El grupo de la Dra. Castillo ha mostrado recientemente que las proteínas Rep y C3 del virus TYLCSV son capaces de interferir con la maquinaria de silenciamiento transcripcional a través de la represión de la expresión de las ADN metiltransferasas de mantenimiento (Rodríguez-Negrete et al., en revisión en *New Phytologist*). Esto parece indicar, junto con los resultados obtenidos en este trabajo de fin de máster, que Rep y C3 tienen capacidad para revertir el silenciamiento transcripcional.

Nuestros resultados muestran que C3 revierte el silenciamiento transcripcional del transgén GUS, indicando que C3 es un supresor del silenciamiento transcripcional. Ya que Rep, como C3 también reprime la expresión de los genes que mantienen la metilación del ADN en plantas (MET1 y CMT3), es sorprendente que no hayamos detectado de forma tan clara como en C3 la reactivación de GUS al inducir la presencia de Rep con estradiol en la tinción histoquímica. Por este motivo creemos necesario realizar otro ensayo independiente en el que se compruebe la reactivación del transgen GUS así como otro tipo de ensayos que permitan elucidar si Rep actúa también como supresor del silenciamiento transcripcional.

V. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pueden obtener a partir de este trabajo son:

1. El estudio de la RT-semiqPCR muestra que en presencia del inductor, los genes virales Rep (-C4) y C3 se expresan.
2. La línea transgénica RL5-5 tiene una mayor expresión que la línea transgénica RL5-1. Así, la línea transgénica RL5-5 parece tener más capacidad para revertir el silenciamiento transcripcional.
3. También podemos observar que la tinción histoquímica de la línea transgénica CL5-5 es más sobresaliente que en las demás líneas a los 7 días de inducción. Así, esta línea también podría tener más capacidad para revertir el silenciamiento transcripcional.
4. En la tinción histoquímica se puede observar el incremento del punteado en el tejido a medida que transcurren los días bajo inducción. Esto indica que tanto la proteína Rep como C3 actúan como supresores del silenciamiento previamente establecido.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material biológico empleado

En este estudio se utilizaron las líneas L5-Rep (-C4) 1, 2, 3, 4, 5 y L5-C3 1, 2, 3, 4, 5 las cuales fueron previamente obtenidas en nuestro laboratorio. Estas líneas contienen el marco de lectura abierta de Rep(-C4) y C3 de TYLCSV bajo el control de un promotor inducible por la hormona animal β -estradiol. Todas las líneas fueron obtenidas mediante transformación de las plantas L5 (Elmayan et al., 2005). Las plantas L5 sin transformar fueron empleadas como control en todos los ensayos.

6.2 Análisis de segregación de plantas transgénicas

200 semillas provenientes de las diferentes líneas transgénicas fueron germinadas en medio MS suplementado con 30 μ g/ml de Hygromicina B y crecidas en un fotoperiodo de día largo (16 horas de luz, 8 horas de oscuridad) durante dos semanas. Las plántulas sensibles y resistentes al antibiótico fueron cuantificadas, y la segregación del transgen fue analizado mediante la prueba de χ^2 (Cuzzi et al., 1972). Aquellas líneas con segregación 3:1 en las cuales se asume que existe una sola integración del transgen, fueron utilizadas para los posteriores análisis.

6.3 Condiciones de crecimiento

Las semillas de *Arabidopsis* de la línea L5 (Elmayan et al., 2005) transformadas fueron esterilizadas superficialmente y se mantuvieron en oscuridad durante 2 días a 4°C para sincronizar la geminación. Posteriormente, fueron sembradas en placas de Petri con medio MS-Agar, con una concentración de 15g/L de sacarosa. Las plantas se crecieron con orientación vertical a 20°C con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad durante 10 días. Se usó medio MS-Agar suplementado con 30 μ g/ml de Hygromicina B para seleccionar las plantas resistentes (transformadas) frente a las sensibles (no transformadas), y medio MS-Agar sin Hygromicina B para crecer plantas de la línea L5 no transformadas usadas como control. Quince plántulas seleccionadas fueron transferidas a un medio inductivo de MS con β -estradiol (0,2 μ M) y fueron recolectadas a los 1, 3, 5 y 7 días de inducción.

6.4 Análisis de ARN

Se aisló el ARN de las plántulas inducidas usando el reactivo Trisure (Biolab) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se trató 1-4 μ g de ARN con DNasa I libre de RNasa (TaKaRa) y se llevó a cabo la reversotranscripción usando la transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen), un mix de random primers 1:1 (Promega) y oligo dT de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Un microlitro del ADNc sintetizado fue usado como molde para PCR semicuantitativa (sq-PCR) usando los siguientes primers: a) para *Arabidopsis thaliana*, actina (actFW 5'actaaaacgcaaaacgaaagcggtt 3', actRV 5'ctaagctctcaagatcaaaggctta 3'), b) para TYLCSV, Rep (RepFW 5'tcccaaccagatcagcacat 3', RepRV 5'ttggcgtaagcgtcattgg 3') y C3 (C3FW 5'cacgataaccagacacaaccaacaacc 3', C3RV 5'gacataatcaactgctctaataacattggtt 3').

Condiciones de la PCR. 1 ciclo 94°C 30 seg, 25-35 ciclos (94°C 30 seg, 55°C 30 seg, 72°C 30 seg), 1 ciclo 72°C 15 min.

La PCR semicuantitativa se realizó para comprar los cambios en la expresión de genes en diferentes tiempos de inducción.

La intensidad de las bandas obtenidas fue cuantificada empleando el programa Image J. Los datos fueron representados como intensidad relativa de las bandas normalizadas con su respectiva amplificación del gen endógeno actina.

5.5 Tinción histoquímica de la actividad GUS

La tinción GUS fue llevada a cabo de acuerdo al protocolo previamente descrito (Ranjan et al., 2012) con algunas modificaciones. Las plántulas se sumergieron en solución de tinción histoquímica GUS (100 mM NaPO₄, 0.5 mM K₃[Fe(CN)₆, 0.5 mM K₄[Fe(CN)₆, 10 mM EDTA, 1 mg/ml 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-gluc)) y se realizó una infiltración al vacío durante diez minutos, tres veces, seguido de una incubación a 37°C durante toda la noche. Después, las muestras fueron lavadas varias veces con etanol absoluto hasta que el tejido se clarificó lo suficiente como para poder observar la tinción.

VI. REFERENCIAS

- Akbergenov, R., Si-Ammour A., Blevins, T., Amin, I., Kutter, C., Vanderschuren, H., Zhang, P., Gruissem, W., Meins, F., Hohn, T., Pooggin, M.M. (2006). Molecular characterization of geminivirus-derived small RNAs in different plant species. *Nucleic Acids Res.* **34**: 462-471.
- Al Kaff, N.S., Covey, S.N., Kreike, M.M., Page, A.M., Pinder, R., Dale, P.J. (1998). Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. *Science.* **279**: 2113–2115.
- Anandalakshmi R, Pruss GJ, Ge X, Marathe R, Smith TH, Vance VB (1998) A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13079–13084
- 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.
- Ascencio-Ibáñez, J.T., Monsalve-Fonnegra, Z.I., Pruna-Camacho, M.B., Díaz-Plaza, R., y Rivera-Bustamante, R.F. (1999). Los Geminivirus. *Rev. Mex. Fitopatol.* **17**: 113-127.
- Ascencio-Ibáñez, J.T., Settlage, S.B. (2007). DNA abrasion onto plants is an effective method for geminivirus infection and virus-induced gene silencing. *J. Virol. Methods.* **142**: 198-203.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell.* **116**: 281-297.
- Baulcombe DC (2004) RNA silencing in plants. *Nature* 431:356–363
- Bernstein, E., Denli, A.M., Hannon, G.J. (2001). *RNA.* **7**:1509-21.
- Bian, X.Y., Rasheed, M.S., Seemanpillai, M.J., Rezaian, M.A. (2006). Analysis of silencing escape of Tomato leaf curl virus: An evaluation of the role of DNA methylation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**: 614-624.

- Biochemistry, S. (2004). Reprogramming plant gene expression: a prerequisite to geminivirus DNA replication. *G E M I N I V I R U S R E P L I C A T I O N*: *T H E P L A Y E R S*, 5, 149–156. doi:10.1111/J.1364-3703.2004.00214.X
- Bisaro DM (2006) Silencing suppression by geminivirus proteins. *Virology* 344:158–168
- Blevins, T., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P.V., Beknazariants, D., Si-Ammour, A., Park, H.S., Vazquez, F., Robertson, D., Meins, F., Hohn, T., Pooggin, M.M. (2006). Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Res.* **34**: 6233-6246.
- Bonilla-Ramírez, G.M. (1997). Caracterización de los genes del componente B del Virus huasteco del chile. Tesis doctoral, CINVESTAV Irapuato, México.
- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P.E., Sunkar, R., Zhu, J.K. (2005). Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell.* **123**:1279-1291.
- Boucheron, E., Guivarc'h, A., Azmi, A., Dewitte, W., Van Onckelen, H. and Chriqui, D. (2002) Competency of *Nicotiana tabacum* L. stem tissues to dedifferentiate is associated with differential levels of cell cycle gene expression and endogenous cytokinins. *Planta*, 215, 267–278.
- Briddon RW, Markham PG (2001) Complementation of bipartite begomovirus movement functions by topocuviruses and curtoviruses. *Arch Virol* 146:1811–1819
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.-X., Ji, L.-H., Ding, S.-W., Baulcombe, D.C. (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* **17**: 6739– 6746.
- Brough, C.L., Gardiner, W.E., Inamdar, N.M., Zhang, X.Y., Ehrlich, M., Bisaro, D.M. (1992). DNA methylation inhibits propagation of tomato golden mosaic virus DNA in transfected protoplasts. *Plant Mol. Biol.* **18**: 703-712.
- Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L., Zurcher, E. (Eds.) (1996). Plant viruses Online: Description and lists from the VIDE database. <http://image.fs.uidaho.edu/vide/refs.htm>.
- Cano-Alvarado, M. F. (1998). El cultivo de chile (*Capsicum spp.*) Una revisión bibliográfica.

<http://www.monografias.com/trabajos/cultivochiles/cultivochiles/shtm>
1.

- Carrillo-Tripp, J. (2006). Estudio de la remisión de síntomas en plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) inoculadas con el geminivirus del mosaico dorado del chile (PepGMV). Tesis doctoral, CINVESTAV Irapuato, México.
- Carrillo-Tripp, J., Lozoya-Gloria, E., Rivera-Bustamante, R. (2007). Symptom remission and specific resistance of pepper plants after infection by pepper golden mosaic virus. *Phytopathology*. **97**:51-59.
- Carrington, J.C., Ambros, V. (2003). Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*. **301**:336-338.
- Castillo AG, Collinet D, Deret S, et al (2003) Dual interaction of plant PCNA with geminivirus replication accessory protein (Rep) and viral replication protein (Rep). *Virology* 312:381-394
- Chapman EJ, Prokhnevsky AI, Gopinath K, Dolja VV, Carrington JC. 2004. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev*. 18:1179-86
- Chellappan P, Vanitharani R, Fauquet CM (2004) Short interfering RNA accumulation correlates with host recovery in DNA virus-infected hosts, and gene silencing targets specific viral sequences. *J Virol* 78:7465-7477
- Chellappan P, Vanitharani R, Fauquet CM (2005) MicroRNA-binding viral protein interferes with Arabidopsis development. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:10381-10386
- Clerot D, Bernardi F (2006) DNA helicase activity is associated with the replication initiator protein rep of tomato yellow leaf curl geminivirus. *J Virol* 80:11322-11330
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735-743
- Covey, S.N., Al-Kaff, N.S., Langara, A., Turner, D.S. (1997). Plants combat infection by gene silencing. *Nature*. **385**: 781-782.
- Davies JW, Stanley J (1989) Geminivirus genes and vectors. *Trends Genet* 5:77-81

- Dickinson VJ, Halder J, Woolston CJ (1996) The product of maize streak virus ORF V1 is associated with secondary plasmodesmata and is first detected with the onset of viral lesions. *Virology* 220:51-59
- Dogar, A. M. (2006). RNAi dependent epigenetic marks on a geminivirus promoter. *Virology J.* 3:5.
- Eagle, P.A., Orozco, B.M., Hanley-Bowdoin, L. (1994). A DNA sequence required for geminivirus replication also mediates transcriptional regulation. *Plant Cell.* 6: 1157-1170.
- Earley, K., Lawrence, R. J., Pikaard, C. S., Murfett, J., & Furner, I. (2004). Arabidopsis Histone Deacetylase HDA6 Is Required for Maintenance of Transcriptional Gene Silencing and Determines Nuclear Organization of rDNA Repeats. *Gene*, 16(April), 1021-1034. doi:10.1105/tpc.018754.1
- Elmayan, T., Proux, F., & Vaucheret, H. (2005). Arabidopsis RPA2: a genetic link among transcriptional gene silencing, DNA repair, and DNA replication. *Current biology* □: CB, 15(21), 1919-25. doi:10.1016/j.cub.2005.09.044
- Ermak, G., Paszkowski, U., Wohlmuth, M., Scheid, O.M., Paszkowski, J. (1993). Cytosine methylation inhibits replication of African cassava mosaic virus by two distinct mechanisms. *Nucleic Acids Res.* 21: 3445-3450.
- Fauquet, C.M., Stanley, J. (2003). Geminivirus classification and nomenclatures: progress and problems. *Ann. Appl. Biol.* 142:165-189.
- Fontes, E.P., Galdelfter, H.J., Schaffer, R.L. (1994). Geminiviruses replication origin has a modular organization. *Plant Cell.* 4: 597-608.
- Frommer, M., McDonald, LE., Millar, D. S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L., Paul, C.L. (1992). A genomic sequencing protocol that yield a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 1827-1831.
- Garzón-Tiznado, J.A., Torres-Pacheco, I., Ascencio-Ibáñez, J.T., Herrera-Estrella, E.L., Rivera-Bustamante R.F. (1993). Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by biolistic procedure. *Phytopathology.* 83:514-521.

- Gronenborn, B. (1995) In vitro cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 3879–3883.
- Grunau, C., Clark, S.J., Rosenthal, A. (2001). Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res.* **29**: E65-5.
- Guo, H.S., Ding, S.W. (2002). A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO J.* **21**: 398–407.
- Guo, H.S., García, J.A. (1997). Delayed resistance to plum pox potyvirus mediated by a mutated RNA replicase gene: involvement of a gene-silencing mechanism. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**: 160–170.
- Gutiérrez, C. (1999). Geminivirus DNA replication. *Cell. Mol. Life Sci.* **56**: 313–329.
- Hamilton, A., Baulcombe, D.C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science.* **286**:950–952.
- Hao, L., Wang, H., Sunter, G., Bisaro, D.M. (2003). Geminivirus AL2 and L2 Proteins Interact with and Inactivate SNF1 Kinase. *Plant Cell.* **15**:1034-1048.
- Harrison BD (1985) Advances in geminivirus research. *Annu Rev Phytopathol* **23**:55–82
- Heyraud, F., Matzeit, V., Kammann, M., Schaefer, S., Schell, J., Gronenborn, B. (1993). Identification of the initiation sequence for viral-strand DNA synthesis of wheat dwarf virus. *EMBO J.* **12**: 4445-4452.
- Holguín-Peña, R.J., Rivera-Bustamante, R.F., Carrillo-Tripp, J. (2007). Pepper golden mosaic virus and related Geminiviruses affecting tomato crops. Characterization, Diagnosis and Management of Plant Viruses. *Vegetable and Pulse Crops*. Capítulo 7. pp. 163-193.
- Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51-59.

- Hutvágner, G., Mlynárova, L., Nap, J.P. (2000). Detailed characterization of the posttranscriptional gene-silencing-related small RNA in a GUS gene-silenced tobacco. *RNA*. **6**: 1445-1454.
- Jeske, H. (2009). H. Jeske.
- Johansen, L.K., Carrington, J.C. (2001). Silencing on the spot: induction and suppression of RNA silencing in the Agrobacterium-mediated transient expression system. *Plant Physiol.* **126**: 930-938.
- Jones, L., Ratcliff, F., Baulcombe, D.F. (2001). RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Current Biol.* **11**: 747-757.
- Jupin I, De Kouchkovsky F, Jouanneau F, et al (1994) Movement of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV): involvement of the protein encoded by ORF C4. *Virology* 204:82-90
- Kanno, T., Aufsatz, W., Jaligot, E., Mette, M.F., Matzke. M., Matzke, A.J.M. (2005). A SNF2-like protein facilitates dynamic control of DNA methylation. *EMBO Reports* **6**: 649-654.
- Khan, J.A., Dijkstra, J. (1984). Plant Viruses as Molecular Pathogens. FPP press. USA.
- Lakatos, L., Szittyá, G., Silhavy, D., Burgyan, J. (2004). Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by the p19 protein of tombusviruses. *EMBO J.* **23**: 876- 884.
- Laufs, J., Traut, W., Heyraud, F., Matzeit, V., Rogers, S.G., Schell, J. and Gronenborn, B. (1995) In vitro cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 3879-3883.
- Lazarowitz, S.G. (1992). Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Crit. Rev. Plant Sci.* **11**: 327-349.
- Lecoq, K., Belloc, I., Desgranges, C., Daignan-Fornier, B. (2001). Role of adenosine kinase in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of the ADO1 gene and study of the mutant phenotypes. *Yeast*. **18**: 335-342.

- Li, L.C., Dahiya, R. (2002). MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*. **18**:1427-1431.
- Lindbo, J.A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W.M., Dougherty, W.G. (1993). Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell*. **5**: 1749-1759.
- Lindbo, J.A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W.M., Dougherty, W.G. (1993). Induction of a Highly Specific Antiviral State in Transgenic Plants: Implications for Regulation of Gene Expression and Virus Resistance. *Plant Cell*. **5**:1749-1759.
- Lippman, Z., Martienssen, R.T. (2004). The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature*. **431**:364-70.
- Liu HT, Boulton MI, Davies JW (1997) Maize streak virus coat protein binds single- and doublestranded DNA in vitro. *J Gen Virol* 78:1265-1270
- Llave C, Kasschau KD, Carrington JC (2000) Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13401-13406
- Lucas, J.A. (1998). *Plant Pathology and Plant Pathogens*. Blackwell Science. Third Edition. USA. pp. 140-149.
- Matthews, R.E.F. (1991). *Plant virology*. Academic Press. San Diego. pp. 835.
- Matthews, R.E.F. (1992). *Host Plant Responses to Virus Infection*. Academic Press, San Diego.
- Meister, G., Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. **431**: 343-349.
- Mette, M. F., Aufsatz, M., van der Widen, J., Matzke, M. A., Matzke, A. J. (2000). Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J*. **19**: 5194-5201.
- Moffatt, B.A., Stevens, Y.Y., Allen, M.S., Snider, J.D., Periera, L.A., Todorova, M.I., Summers, P.S., Weretilnyk, E.A., Martin-Caffrey, L., Wagner, C. (2002). Adenosine kinase deficiency is associated with developmental abnormalities and reduced transmethylation. *Plant Physiol*. **128**: 812- 821.

- Moissiard, G., Voinnet, O. (2006). RNA silencing of host transcripts by cauliflower mosaic virus requires coordinated action of the four Arabidopsis Dicer-like proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**:19593-19598.
- Morales, F. J., Jones, P. G. (2004). The ecology and epidemiology of whitefly-transmitted viruses in Latin America. *Virus Res*. **100**: 57-65.
- Morel, J., & Mourrain, P. (n.d.). DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in Arabidopsis Jean-Benoit Morel *, Philippe Mourrain *, Christophe Béclin. *Current Biology*, 1591-1594.
- Muangsan N, Robertson D (2004) Geminivirus vectors for transient gene silencing in plants. *Methods Mol Biol* 265:101-115
- Muangsan, N., Beclin, C., Vaurechert, H., Robertson, D. (2004). Geminivirus VIGS of endogenous genes requires SGS2/SDE1 and SGS3 and defines a new branch in the genetic pathway for silencing in plants. *Plant J*. **38**: 1004-1014.
- Pantaleo, V., Szittyá, G., Burgyán, J. (2007). Molecular Bases of Viral RNA Targeting by Viral Small Interfering RNA-Programmed RISC. *J. Virol*. **81**: 3797-3806.
- Pérez-Moreno, L., Rico-Jaramillo, E., Sánchez-Palé, J.R., Ascencio-Ibáñez, J.T., Díaz -Plaza, R., Rivera-Bustamante, R.F. (2004). Identificación de virus fitopatógenos de importancia económica en el estado de Guanajuato, México. *Rev. Mex. Fitopatol*. **22**: 187-197.
- Pickersgill, B. (1969). The domestication of chili peppers. En: P. J. Ucko y G. W. Dimbley (eds.). *The domestication and exploration of plants and animals*. Duckworth. London. UK. pp. 443-450.
- Pickersgill, B. (1971). Relationships between weedy and cultivated forms in some species of chili peppers (genus *Capsicum*). *Evolution*. **25**:683-691.
- Pilartz, M., Jeske, H. (1992) Abutilon mosaic geminivirus double-stranded DNA is packed into minichromosomes. *Virology*. **189**: 800-802.

- Polston, J. E., Anderson, P.K. (1977). The emergence of whitefly-transmitted Geminiviruses in Tomato in the Western Hemisphere. *Plant Dis.* **81**: 1358-1369.
- Pons-Corona, M. (2001). Transformación genética de papaya (*Carica papaya* L.) mediante biobalística. Tesis de maestría. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Santa Clara Cuba.
- Pooggin, M., Hohn, T. (2003). RNAi targeting of DNA virus in plants. *Nature Biotechnology.* **21**: 131-132.
- Ratcliff, F., Harrison, B.D., Baulcombe, D.C. (1997). A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science.* **276**: 1558-1560.
- Ratcliff, F.G., MacFarlane, S.A., Baulcombe, D.C. (1999). Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell.* **11**: 1207-1215.
- Rentería-Canett, I. (2004). Mecanismos de la interacción sinérgica en la mezcla del virus huasteco del chile y el virus del mosaico dorado del chile a nivel de replicación. Tesis de maestría, Cinvestav-Irapuato.
- Rentería-Cannet, I., Ruiz-Medrano, R., Rivera-Bustamante, R. (2007). Geminivirus mixed infection in pepper plants: "Effects in localization and replication of *PHYV* and *PepGMV* viruses". XIII INTERNATIONAL CONGRESS ON MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS. Sorrento, Italia. PS 12-601.
- Ribeiro, S.G., Lohuis, H., Goldbach, R., Prins, M. (2007) Tomato chlorotic mottle virus is a target of RNA silencing but the presence of specific short interfering RNAs does not guarantee resistance in transgenic plants. *J. Virol.* **81**: 1563-1573.
- Ruiz, M.T., Voinnet, O., Baulcombe, D.C. (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell.* **10**: 937-946.
- Ruiz-Ferrer, V., & Voinnet, O. (2009). Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annual review of plant biology*, *60*, 485-510. doi:10.1146/annurev.arplant.043008.092111

- Ruiz-Medrano, R., Guevara-González, R.G., Argüello-Astorga, G.R., Monsalve-Fonnegra, Z., Herrera-Estrella, L.R., Rivera-Bustamante, R.F. (1999). Identification of a sequence element involved in AC2-mediated transactivation of the pepper huasteco virus coat protein gene. *Virology*. **20**: 162-169.
- Rushing, A.E., Sunter, G., Gardiner, W.E., Dute, R.R. and Bisaro, D.M. (1987) Ultrastructural aspects of tomato golden mosaic virus infection in tobacco. *Phytopathology*, *77*, 1231-1236.
- Seemanpillai, M., Dry, I., Randles, J., Rezaian, A. (2003). Transcriptional silencing of geminiviral promoter-driven transgenes following homologous virus infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**: 429-438.
- Sharma, P., & Ikegami, M. (2008). RNA-silencing suppressors of geminiviruses. *Journal of General Plant Pathology*, *74*(3), 189-202. doi:10.1007/s10327-008-0085-5
- Shimada-Beltran H, Rivera-Bustamante RF (2007) Early and late gene expression in pepper huasteco yellow vein virus. *J Gen Virol* *88*:3145-3153
- Silhavy, D., Molnar, A., Lucioli, A., Szittyá, G., Hornyik, C., Tavazza, M., Burgyan, J. (2002). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J.* **21**: 3070-3080.
- Stenger, D.C., Revington, G.N., Stevenson M. (1991). Replication release of geminiviruses genomes from tandemly repeat copies: Evidence of rolling-circle replication of a plant viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 8029-8033.
- Sunter G, Hartitz MD, Hormuzdi SG, et al (1990) Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. *Virology* *179*:69-77
- Sunter G, Sunter J, Bisaro DM (2001) Plants expressing Tomato golden mosaic virus AL2 or beet curly top virus L2 transgenes show enhanced susceptibility to infection by DNA and RNA viruses. *Virology* *285*:59-70

- Torres-Pacheco, I. (1997). Geminivirus involucrados en el rizado amarillo del chile. Interacciones entre PHV y PepGMV. Tesis doctoral, Cinvestav-Irapuato.
- Trinks D, Rajeswaran R, Shivaprasad PV, Akbergenov R, Oakeley EJ, Veluthambi K, Hohn T, Pooggin M (2005) Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *J Virol* 79:2517-2527
- Van Regenmortel, M.H., Bishop, D.H., Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Calisher, C.H. (1977). Guidelines to the demarcation of virus species. *Arch. Virol.* **142**: 1505-1518.
- Vanitharani R, Chellappan P, Fauquet CM (2005) Geminiviruses and RNA silencing. *Trends Plant Sci* 10:144-151
- Vanitharani R, Chellappan P, Pita JS, et al (2004) Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *J Virol* 78:9487-9498
- Vargason, J.M., Szittyá, G., Burgýan, J., Tanaka Hall, T.M. (2003). Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell.* **115**: 799-811.
- Voinnet O, Pinto YM, Baulcombe DC (1999) Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:14147-14152
- Voinnet, O. (2005). Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infection. *Nature Rev. Genet.* **6**:206-220.
- Wang H, Hao L, Shung CY, et al (2003) Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Plant Cell* 15:3020-3032
- Wang, H., Buckley, K.J., Yang, X.J., Buchmann, R.C., Bisaro, D.M. (2005). Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *J. Virol.* **79**: 7410-7418.
- Warnecke, P.M., Stirzaker, C., Song, J., Grunau, C., Melki, J.R., Clark, S. J. (2002). Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing. *Methods.* **27**: 101-107.

Wartig L, Kheyr-Pour A, Noris E, Dekonchkovsky F, Jouanneau F, Gronrnborn B, 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., Fusaro, A. F. (2006). Viruses Face a Double Defense by Plant Small RNAs. *Plant Science*. **313**: 54-55.

Weretilnyk, E.A., Alexander, K.J., Drebenstedt, M., Snider, J.D., Summers, P.S., Moffatt, B.A. (2001). Maintaining methylation activities during salt stress. The involvement of adenosine kinase. *Plant Physiol*. **125**: 856– 865.

Westeijn, E.A. (1981). Lesion growth and virus localization in leaves of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. after inoculation with tobacco mosaic virus and incubation alternatively at 22°C or 32°C. *Phys. Plant Pathol*. **18**: 357-369.

Xie, Z., Allen, E., Wilken, A., Carrington, J.C. (2005). DICER-LIKE 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**: 12984-12989.

Xie, Z., Johansen, L.K., Gustafson, A.M., Kasschau, K.D., Lellis, A.D., Zilberman, D., Jacobsen, S. E., Carrington, J.C. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol*. **2**:E104.

Yang X, Baliji S, Buchmann RC, Wang H, Lindbo JA, Sunter G, Bisaro DM (2007) Functional modulation of the geminivirus AL2 transcription factor and silencing suppression by self interaction. *J Virol* 81:11972-11981

Zrachya A, Glick E, Levy Y, et al (2007) Suppressor of RNA silencing encoded by Tomato yellow leaf curl virus-Israel. *Virology* 358:159-165

Imagen 1: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/109.html

Imagen 2: *Journal of General Virology* (2005), 86, 1525-1532